

UNESP

Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá

**Guaratinguetá
2016**

JAQUELINE SILVA BASTOS

**REPARO ÓSSEO EM SCAFFOLDS DE Ti6Al4V SINTERIZADOS PELA
TECNOLOGIA DE SINTERIZAÇÃO DIRETA DE METAIS A LASER (DMLS)
SUBMETIDOS A TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE ASSOCIADO À APLICAÇÃO
DE ULTRASSOM DE BAIXA INTENSIDADE (LIPUS)**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia
do Campus de Guaratinguetá, Universidade
Estadual Paulista, para obtenção do título de
Doutora em Engenharia Mecânica na área de
Materiais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Rosifini Alves Claro

GUARATINGUETÁ (SP)
2016

B237r	Bastos, Jaqueline Silva Reparo ósseo em Scaffolds de Ti6Al4V sinterizados pela tecnologia de Sinterização Direta de Metais a Laser (DMLS) submetidos a tratamento de superfície associado à aplicação de ultrassom de baixa intensidade (LIPUS) / Jaqueline Silva Bastos– Guaratinguetá, 2016. 145 f. : il. Bibliografia : f. 116-124 Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, 2016. Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Paula Rosifini Alves Claro 1. Metais - Superfícies 2. Sinterização 3. Biomimética 4. Ultrassonografia I. Título CDU 669.018.25(043)
-------	--

JAQUELINE SILVA BASTOS

ESTA TESE FOI JULGADA ADEQUADA PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
“DOUTOR EM CIÊNCIAS”

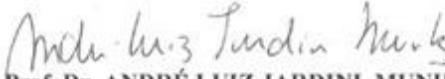
PROGRAMA: ENGENHARIA MECÂNICA
ÁREA: MATERIAIS

APROVADA EM SUA FORMA FINAL PELO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO


Prof. Dr. Edson Cocchieri Botelho
Coordenador

BANCA EXAMINADORA:


Prof. Dr. ANA PAULA ROSIFINI ALVES CLARO
Orientadora UNESP/FEG


Prof. Dr. ANDRÉ LUIZ JARDINI MUNHOZ
UNICAMP


Prof. Dr. RICARDO TADEU LOPES
UFRJ/COPPE


Prof. Dr. ORIVALDO LOPES DA SILVA
USP/SÃO CARLOS


Prof. Dr. ANA LIA ANBINDER
FOSJC/UNESP

Janeiro de 2016

DADOS CURRICULARES

JAQUELINE SILVA BASTOS

NASCIMENTO 11/11/1972 – Pedro Leopoldo – Minas Gerais

FILIAÇÃO Esmael Soares Bastos
 Maria José Silva Bastos

1998-2002 Curso de Graduação em Fisioterapia
 Universidade Severino Sombra – Vassouras – Rio de Janeiro

2005-2006 Curso de Especialização em Fisioterapia Neurofuncional
 Universidade Castelo Branco – Volta Redonda- Rio de Janeiro

2009- 2011 Curso de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica (Mestrado)
 Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá da FEG/UNESP.

DEDICATÓRIA

Dedico esta pesquisa aos homens de bem que buscam no seu dia a dia contribuir para evolução da paz, da ciência e do trabalho.

Dedico ao Homem Simples e Simples Homem, que foi meu pai que embora tenha tido um pequeno ciclo de vida, deixou em mim a semente da hombridade e do amor ao próximo.

Dedico a Grande Mulher que é minha mãe que me fez crescer entre os livros e me apresentou o universo do conhecimento os livros são como asas para alçar novos mundos. Ao trabalho fiel e ao amor ao ensino como um todo.

Dedico aos irmãos parceiros de sangue, DNA e do carinho e respeito ao presente maior chamado FAMÍLIA.

Dedico aos sobrinhos que de alguma forma entendem minha ausência física e nunca me excluem de sua educação materna.

Dedico a meus tios e tias que são também pais e mães, sempre nos confortando com seus olhares e carinhos e que tanto ajudaram minha mãe a nos criar.

Dedico a todas as minha amigas-irmãs que são parceiras de alma. E aos meus amigos que sempre estão ao meu lado.

Enfim, dedico ao amor de Deus a todos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Esmael e Maria José que me ensinaram o amor à vida, a alegria como energia provedora do bem.

À minha Professora e Orientadora, Ana Paula Rosifini Alves Claro, pela parceria generosa e competente.

À minha querida Hosana Cesar e seu filho Pietro Cesar Mautoni pela companhia das estradas, parceria constante e ajuda na execução das imagens que compõem esta tese.

Aos alunos Reginaldo Toshihiro Konatu, André Luis Reis Rangel e Liliane Lelis de Oliveira, Ana Lúcia Escada que me ajudaram nos trabalhos efetuados no laboratório da FEG.

Ao professor Dr. Andre Luiz Jardini Munhoz (UNICAMP) na fabricação dos scaffolds utilizados na pesquisa.

Ao aluno Javier Munoz Chaves e sua esposa pela acolhida em seu lar em São Carlos.

Ao professor Dr. Orivaldo Lopes da Silva (USP São Carlos), pela gentileza na calibração do aparelho de ultrassom terapêutico utilizado na pesquisa.

Ao professor Dr. Ricardo Tadeu Lopes e suas alunas Alessandra de Castro Machado e Olga Maria Oliveira de Araújo do Laboratório de Instrumentação Nuclear PEN- COPPE – Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela aquisição e reconstrução das imagens microtomográficas das amostras ósseas.

À Fundação Educacional Dom André Arcoverde (Valença – RJ) que disponibilizou o setor de Biotério e os animais para os experimentos.

Aos Professores Dr. Rodrigo Neto Ferreira e Dra. Verônica Clemente Vilar Martins que me acolheram e orientaram nos experimentos in vivo.

Aos alunos de Medicina da Fundação Educacional Dom André Arcoverde, Allysson Lucas Martins, Ana Karolina G. C. Lopes e Gabriel S.Thiago Cavalleiro que tanto me ajudaram no processo de tratamento dos animais. Alunos parceiros, disciplinados, estudiosos, amigos que com certeza serão excelentes médicos.

Ao setor de radiologia veterinária da Fundação Educacional D. André Arcoverde (Valença–RJ) e ao profissional Bruno pelo empenho durante o procedimento de raios-X dos animais.

Às minhas queridas amigas Eliana Moraes Santos e Regina Aragão que sempre me acolhem em seu lar.

Ao Professor Ulisses Rodrigues Dias e Márcio Leonardo Souza Gomes pela colaboração na aquisição das imagens das lâminas de Histologia.

À minha amiga Eneida Guerreiro pela ajuda na execução e organização da tese.

Ao querido amigo e professor Carlos Otávio Ribeiro pelos ensinamentos da língua inglesa.

Aos meus sempre queridos amigos que, com tamanha generosidade e companheirismo me ajudam a vencer todas as etapas e conquistas da minha vida.

Embora ninguém possa voltar atrás e fazer
um novo começo, qualquer um pode
começar agora e fazer um novo fim.

Chico Xavier

BASTOS, J. S. REPARO ÓSSEO EM SCAFFOLDS DE Ti6Al4V SINTERIZADOS PELA TECNOLOGIA DE SINTERIZAÇÃO DIRETA DE METAIS A LASER (DMLS) SUBMETIDOS À TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE ASSOCIADO À APLICAÇÃO DE ULTRASSOM DE BAIXA INTENSIDADE (LIPUS). 2016 145f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2016.

RESUMO

O objetivo desse estudo *in vivo* foi verificar a resposta óssea de scaffolds porosos revestidos processados pela técnica de Sinterização Direta de Metais a laser (DMLS) associado à terapia de ultrassom de baixa intensidade. Os scaffolds foram processados empregando a técnica DMLS e tratados termicamente a 1000°C por 24 horas. Três tipos de tratamento de superfície foram avaliados: Alcalino, biomimético e imobilização de alendronato de sódio. Para o tratamento alcalino, as amostras foram imersas na solução de NaOH (5M) a 60°C por 24 horas. O tratamento biomimético consistiu na imersão dos scaffolds em solução SBF (SimulatedBodyFluid) enquanto a imobilização do alendronato foi realizada a partir da imersão dos scaffolds em uma solução formada por SBF e medicamento durante 5 dias. As superfícies dos scaffolds foram avaliadas para cada etapa empregando microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análise por difração de raios-X. Os scaffolds foram implantados na tíbia direita de 85 ratos machos da raça wistar com idade média de 12 semanas. A microtomografia computadorizada (μ CT) e análise histológica foram realizadas para avaliar o reparo ósseo no defeito. As micrografias das superfícies obtidas mostraram mudanças no aspecto da superfície e composição química de acordo com o tratamento. O tratamento biomimético promoveu o crescimento da apatita sobre a superfície enquanto a imobilização com alendronato suprimiu sua formação. As imagens obtidas na microtomografia mostraram elevado valor de densidade óssea para o último grupo. No entanto, análises histológicas mostraram a formação de cápsula fibrosa em torno dos scaffolds a qual foi minimizada usando ultrassom pulsado de baixa intensidade. No entanto, mais estudos precisam ser realizados para avaliar a influência da geometria dos scaffolds na incorporação de medicamentos.

PALAVRAS – CHAVE: Scaffold, reparo ósseo, DMLS, tratamento de superfície, ultrassom pulsado de baixa intensidade

BASTOS, J. S. BONE REPAIR IN Ti6Al4V POROUS SCAFFOLDS PROCESSED BY DIRECT SELECTIVE LASER MELTING SUBMITTED TO SURFACE TREATMENT ASSOCIATED LOW INTENSITY PULSED ULTRASOUND – (LIPUS) . 2016 145f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2016.

ABSTRACT

The objective of this *in vivo* study was to verify the bone response of coated Ti6Al4V porous scaffolds processed by Direct Metal Laser Sintering (DMLS) technique associated to low intensity pulsed ultrasound therapy. Scaffolds were processed by using Direct Metal Laser Sintering technique (DMLS) and heat treated at 1000 °C for 24 hours. Three types of surface treatments were evaluated: alkaline, biomimetic and sodium alendronate immobilization. For alkaline treatment, samples were immersed in a NaOH (5M) solution at 60°C for 24 hours. Biomimetic treatment consisted in the immersion of the scaffolds into Simulated Body Fluid solution while for sodium alendronate immobilization the scaffolds were immersed in the solution formed by SBF plus drug during 5 days. The scaffolds surfaces were evaluated after each step employing SEM (Scanning Electron Microscopy) and X-rays diffraction analysis (XRD). Scaffolds were implanted into right tibia of 85 male Wistar rats with average age of 12 weeks. X-rays micro-computed tomography (μ CT) and histological analysis were carried out to evaluate the bone repair on the defect. Micrographs analysis showed that the aspect of the surfaces and chemical composition changed according treatment. Biomimetic treatment promoted the growth of the apatite on the surface; in contrast the immobilization of alendronate suppressed apatite formation. Micro CT images showed higher value of bone density for the last group. However, histological analysis showed the formation of encapsulation fibrous around the scaffolds. This formation was minimized by using low intensity pulsed ultrasound technique, however, more studies can be carried out to evaluate the influence of scaffolds geometry in the drug incorporation.

Key words: Scaffold, bone repair, DMLS, surface treatment, low intensity pulsed ultrasound

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UNESP	Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”
PR	Prototipagem Rápida
DMLS	Sinterização Direta de Metais por Laser
μCT	Microtomografia Computadorizada
ROI	Região de Interesse do Objeto
VOI	Volume de Interesse do Objeto
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
BMD	Densidade Mineral Óssea
BV	Volume Ósseo
Tb.Pf	Fator Padrão Trabecular
Conn	Conectividade
Tb.Th	Espaçamento entre as Trabéculas
Tb.N	Número de Trabéculas
Tb.Sp	Separação Trabecular
US	Ultrassom
LIPUS	Ultrassom Pulsátil de Baixa Intensidade
ISATA	Intensidade Média Temporal e Espacial
MHz	Mega Hertz
mW/cm²	Miliwatts por Centímetro Quadrado
μm	Micrometro
nm	Nanômetro
W	Watt
mW	Miliwatt
HA	Hidroxiapatita

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Dedo artificial encontrado em múmia enterrada perto de Luxor (Tebas).	16
Figura 02 - Propriedades de matriz óssea quanto a sua mineralização e colagenica.	23
Figura 03 - Aspecto macroscópico do osso longo; Estrutura de um osso longo e seu suprimento sanguíneo.	24
Figura 04 - Esquema do osso cortical compacto: ósteons, lamelas, canais de Volkmann, canais de Havers, periósteo e endósteo.	25
Figura 05 - Esquema biomecânico do estímulo mecânico no tecido ósseo.	26
Figura 06 - Esquema do processo de reparação da fratura.	28
Figura 07 - Calo imaturo após nove dias da fratura.	29
Figura 08 - Prototipagem Rápida - Modelo Geométrico 3D modelo Físico.	30
Figura 09 - Produção de prótese ortopédica por Prototipagem Rápida.	31
Figura 10 - Interface osso/implante metálico.	33
Figura 11- Formação de cápsula fibrosa em interface osso/implante.	34
Figura 12 - Modificação da superfície do suporte de titânio – tratamento biomimético.	37
Figura 13 – Ação do Bisfosfanato sobre o osteoclasto.	38
Figura 14 – Redução da absorção da onda de ultrassom terapêutico.	40
Figura 15 - Comportamento do feixe sônico.	42
Figura 16 - Fluxograma da Etapa 1.	46
Figura 17 - Fluxograma da Etapa 2.	47
Figura 18 - Projeto do scaffold desenvolvido pelo programa CAD 3D.	48
Figura 19 - Equipamento DMSL M270 do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biofabricação (Biofabris)	49
Figura 20 - Formo tubular empregado para tratamento térmico dos scaffolds de Ti6Al4V.	50
Figura 21- Grupo Piloto.	54
Figura 22 - Grupo Experimental.	56
Figura 23 - Tricotomia da tíbia direita do animal.	57
Figura 24 - Sequência do procedimento cirúrgico.	58
Figura 25 - Alojamento no Biotério.	60

Figura 26 - Método de imobilização do animal.	61
Figura 27 - Acompanhamento radiográfico do processo de formação do calo ósseo.	62
Figura 28 - Coleta das amostras tratadas.	63
Figura 29 - Equipamento Microtomógrafo (SKYSCAN).	64
Figura 30 - Reconstrução das projeções e histograma das imagens da microtomografia.	66
Figura 31 - Função “Fine-Tuning”.	67
Figura 32 - Esquema para análise quantitativa microestrutural do reparo da fratura.	69
Figura 33 - Produção das lâminas histológicas.	72
Figura 34 - Imagem dos scaffolds.	75
Figura 35 - Aspecto da superfície dos scaffolds após processamento (menor e maior aumento); mapa EDS	76
Figura 36 – Aspecto da superfície dos scaffolds após processamento e tratamento térmico (menor e maior aumento); mapa EDS	77
Figura 37 – Aspecto da superfície dos scaffolds após tratamento alcalino (menor e maior aumento); mapa EDS	79
Figura 38 – (a) (b) Aspecto da superfície dos scaffolds após tratamento biomimético (menor e maior aumento); (c) mapa EDS	80
Figura 39 – (a) (b) Aspecto da superfície dos scaffolds após incorporação de alendronato (menor e maior aumento); (c) mapa EDS	81
Figura 40 - Análise de difração de raios X dos scaffolds.	83
Figura 41 - Fator Padrão Trabecular do Reparo Ósseo do Grupo Piloto Obtido Pela Microtomografia por raio-X	87
Figura 42 - Conectividade do Reparo Ósseo do Grupo Piloto Obtido Pela Microtomografia por raio-X.	88
Figura 43 - Porosidade do Reparo Ósseo do Grupo Piloto Obtido Pela Microtomografia por raio-X.	88
Figura 44 - Separação Trabecular do Reparo Ósseo do Grupo Piloto Obtido Pela Microtomografia por raio-X.	89
Figura 45 - Porosidade do Grupo Experimental sem scaffold (GE1).	92
Figura 46 - Fator Padrão Trabecular do grupo experimental com scaffold e sem tratamento de ultrassom (GE2, GE3 e GE4).	99

Figura 47 - Conectividade do grupo experimental com scaffold e sem tratamento de ultrassom (GE2, GE3 e GE4).	99
Figura 48 - Porosidade do grupo experimental com scaffold e sem tratamento de ultrassom (GE2, GE3 e GE4).	100
Figura 49 - Separação Trabecular do grupo experimental com scaffold e sem tratamento de ultrassom (GE2, GE3 e GE4).	100
Figura 50 - Porosidade do grupo experimental com scaffold e submetido ao tratamento de ultrassom de 1MHz (GE2, GE3 e GE4).	101
Figura 51 - Separação Trabecular do Grupo Experimental com scaffold e submetido ao tratamento de ultrassom de 1MHz (GE2, GE3 e GE4).	101
Figura 52 - Fator Padrão Trabecular do Grupo Experimental com scaffold e submetido ao tratamento de ultrassom de 3MHz (GE2, GE3 e GE4).	102
Figura 53 - Número de Trabéculas do Grupo Experimental com scaffold e submetido ao tratamento de ultrassom de 3MHz (GE2, GE3 e GE4).	102
Figura 54 - Separação Trabecular do Grupo Experimental com scaffold e submetido ao tratamento de ultrassom de 3MHz (GE2, GE3 e GE4).	103
Figura 55- Separação Trabecular do Grupo Experimental com scaffold e submetido ao tratamento de ultrassom (GE2).	104
Figura 56 - Separação Trabecular do Grupo Experimental com scaffold e submetido ao tratamento de ultrassom (GE3).	104
Figura 57 - Separação Trabecular do Grupo Experimental com scaffold e submetido ao tratamento de ultrassom (GE4).	105
Figura 58 - Reparo do defeito ósseo grupo GE1 aos 30dias após ato cirúrgico. Aumento original 2,5X. HE.	107
Figura 59 - Reparo do defeito ósseo implantado com scaffold poroso grupo GE2 aos 30 dias após ato cirúrgico aumento original 2,5x coloração Azul de Stevenels e Alizarina Red S31.	109
Figura 60 – Reparo do defeito ósseo implantado com scaffold poroso grupo GE3 aos 30 dias após ato cirúrgico aumento original 2,5x coloração Azul de Stevenels e Alizarina Red S31.	111
Figura 61 – Reparo do defeito ósseo implantado com scaffold poroso grupo GE4 aos 30 dias após ato cirúrgico aumento original 2,5x coloração Azul de Stevenels e Alizarina Red S31.	113

LISTA DE QUADROS

Quadro 01 - Tecnologias de Prototipagem rápida que utilizam pó para fabricação dos modelos físicos.	31
Quadro 02 - Composição iônica do plasma sanguíneo e do SBF	35
Quadro 03 - Relação do modo de pulso do ultrassom terapêutico	40
Quadro 04 - Coeficiente de absorção da onda ultrassônica	41
Quadro 05 - Valores de impedância acústica	43
Quadro 06 - Parâmetros utilizados no processo de fabricação dos scaffolds	49
Quadro 07 - Composição do SBF5x	51
Quadro 08 - Condições de aquisição utilizadas na análise microtomográficas das amostras ósseas.	65
Quadro 09 - Parâmetros de correção utilizados no processo de reconstrução de imagens microtomográficas.	68
Quadro 10 - Parâmetros microtomográficos determinados para análise da regeneração óssea.	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Análise EDS dos elementos encontrados na superfície dos scaffolds após imersão em SBF 5x e imobilização com bisfosfanato.	82
Tabela 02 – Projeto Piloto - Grupo Submetido à Modificação de Superfície (Médias e Desvio Padrão dos parâmetros ósseos obtidos por Microtomografia por Raio-X).	85
Tabela 03 – Reconstrução Microtomográfica 2D e 3D da Região do Reparo Ósseo em uma Amostra Representativa do Projeto Piloto – Grupo Submetido à Modificação da Superfície.	86
Tabela 04 – Grupo Experimental (GE1) Sem Implante (Médias e Desvio Padrão dos Parâmetros Ósseos Obtidos por Microtomografia por Raio-X).	90
Tabela 05 – Reconstrução Microtomográfica 2D e 3D da Região do Reparo Ósseo em uma Amostra Representativa do Grupo Experimental Sem Implante (GE1).	91
Tabela 06 - Grupo Experimental Implantado Não Submetido ao Tratamento de Ultrassom (Médias e Desvio Padrão dos Parâmetros Ósseos Obtidos por Microtomografia por Raio-X).	93
Tabela 07 – Grupo Experimental Implantado Submetido ao Tratamento de Ultrassom de 1mhz (Médias e Desvio Padrão dos Parâmetros Ósseos Obtidos por Microtomografia por Raio-X).	94
Tabela 08 – Grupo Experimental (GE) Submetido ao Tratamento de Ultrassom de 3MHz (Médias e Desvio Padrão dos Parâmetros Ósseos Obtidos por Microtomografia por Raio X).	95
Tabela 09 – Grupo GE2 – Reconstrução Microtomográfica 2D e 3D da Região do Preparo Ósseo em uma amostra representativa do Grupo Experimental com Implante DMLS (GE2).	96
Tabela 10 – Grupo GE3 – Reconstrução Microtomográfica 2D e 3D da Região do Preparo Ósseo em uma amostra representativa do Grupo Experimental com Implante DMLS + Tratamento Térmico (GE3).	97
Tabela 11 – Grupo GE4 – Reconstrução Microtomográfica 2D e 3D da Região do Preparo Ósseo em uma amostra representativa do Grupo Experimental com Implante DMLS + Tratamento Biomimético + Alendronato de Sódio (GE4).	98

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVO GERAL	20
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	21
2.2 TECIDO ÓSSEO	22
2.2.1 Reparo Ósseo	27
2.3 PROTOTIPAGEM RÁPIDA	29
2.3.1 Sinterização Direta de Metais a Laser (DMLS)	32
2.4 MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE	32
2.4.1 Tratamento de Superfície Biomimético	34
2.4.2 Tratamento com Incorporação de Medicamento	37
2.5 USO DO ULTRASSOM DE BAIXA INTENSIDADE NO REPARO ÓSSEO	38
3 MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1 CONFECÇÃO DOS SCAFFOLDS	48
3.2 TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE	50
3.3 ESTUDO IN VIVO	52
3.3.1 Seleção dos Animais	52
3.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	57
3.5 TRATAMENTO DE ULTRASSOM TERAPÊUTICO	60
3.6 ACOMPANHAMENTO RADIOGRÁFICO	62
3.7 EUTANÁSIA E COLETA DAS AMOSTRAS	63
3.8 MICROTOMOGRÁFIA POR RAIO- X	64
3.8.1 Processo de Reconstrução	66
3.8.2 Parâmetros Analisados na Microtomografia	68
3.9 ANÁLISE HISTOLÓGICA	70
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	73
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	74
4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS SCAFFOLDS APÓS PROCESSAMENTO	74
4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS SCAFFOLDS APÓS TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE	78
4.3 ESTUDO <i>IN VIVO</i> - AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA PÓS CIRÚRGICO	84
4.3.1 Avaliação Microtomográfica Por Raio –X (μ CT)	84
4.3.2 Avaliação Histológica	106
5 CONCLUSÃO	115
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116
ANEXOS	

1 INTRODUÇÃO

As fraturas ósseas fazem parte do cotidiano dos profissionais de saúde que diariamente se deparam com o alto número de pacientes acometidos por lesões advindas de acidentes automobilísticos, acidentes domésticos e também resultantes de sequelas provenientes de doenças ósseas degenerativas frequentes com o avanço da idade.

Mesmo os povos antigos como os Assírios, Egípcios, Gregos e Maias mostravam a preocupação com a reconstrução estética e funcional dos órgãos e tecidos quando mutilados. A Figura 1 demonstra que há mais de 2600 anos, um dedo artificial feito de um plástico de linho, com cor semelhante à da pele e coberto com uma unha foi produzido. Com a rapidez da evolução humana e tecnológica é possível invenções que auxiliam na melhoria e meios inovadores de fabricação de implantes ortopédicos (DIAS, 2006; GREGOLIN et al, 2012).

Figura 1 - Dedo artificial encontrado em múmia enterrada perto de Luxor (Tebas)



Fonte: <http://antigoegito.org/dedao-de-mumia-egipcia-e-a-protese-mais-antiga-conhecida/>

No Brasil não há dados estatísticos sobre os custos com cirurgias ortopédicas e gastos hospitalares. Porém, estima-se que são realizados mais de 100.000 implantes de joelho ou quadril a um custo médio de 100 milhões/ano, onerando o SUS. Nos Estados Unidos, gastam-se 10 bilhões de dólares por ano, com uma previsão de 30 bilhões de dólares nos próximos anos. Em 1999, a ONU declarou “A década do osso e das juntas”, considerando um problema de saúde pública as doenças relacionadas à estrutura óssea (GUASTALDI e APARECIDA, 2010; CUNHA et al, 2008; SILVA et al, 2004).

O desenvolvimento de implantes é fundamental para tratar pacientes acometidos por fraturas que provocam alguma anomalia. O desenvolvimento de implantes cirúrgicos só ocorreu a partir do século 20, e integra diversas áreas, tais como ciência dos materiais, engenharia e biologia. As aplicações biomédicas passaram a ganhar importância e ocorreu um crescimento do desenvolvimento de materiais para serem implantados no corpo humano. Os biomateriais metálicos, cerâmicos, poliméricos e compósitos, são utilizados nos diversos campos de aplicação de implantes médicos (OLIVEIRA, 2003; BRITTO, 2014; GREGOLIN et al, 2012).

A engenharia tecidual desenvolve e manipula células ou tecidos para a reconstrução de novos órgãos e tecidos e a bioengenharia é um campo multidisciplinar que envolve métodos da engenharia e da saúde para assistir e acelerar a regeneração e o reparo de tecidos defeituosos ou danificados (TABATA, 2009; OLSSON et al, 2008).

Por definição, biomateriais são qualquer substância ou combinação de substâncias, naturais ou não, não farmacológicos que em aplicações biomédicas interagem com sistema biológico, tratando, aumentando ou substituindo quaisquer tecidos, órgãos ou função do corpo danificado. Todos os biomateriais artificiais usados para reparo ou restauração do corpo representam um ajuste de características e propriedades (ORÉFICE et al, 2006; OLIVEIRA et al., 2010).

Dessa forma, um dos maiores desafios é o desenvolvimento de biomateriais para a recuperação de tecido ósseo. Os scaffolds de regeneração óssea podem ser agrupados em dois tipos: suportes que induzem a migração e o crescimento celular e os suportes carregadores de células osteogênicas autógenas, colonizadas e subsequentemente reimplantados no paciente. O controle sobre a interface biomateriais e tecido é o problema neste campo de ciências de materiais (OLIVEIRA et al., 2010; ORÉFICE et al, 2006).

Nos últimos anos, implantes metálicos foram empregados para substituição de partes do corpo humano resultando no estudo de novos materiais para essas aplicações. As principais características desses biomateriais são seus potenciais de grande resistência à corrosão no ambiente *in vivo*. O titânio e suas ligas são empregados na fabricação de materiais para aplicações biomédicas, como próteses e implantes, devidos suas excelentes propriedades químicas, físicas e mecânicas quando comparado a outros materiais metálicos como, aço inoxidável e cobalto-cromo (SARGEANT et al, 2008; OLIVEIRA et al., 2010).

A demanda de biomateriais cresce de 5 a 15% a cada ano. O uso de pinos, placas e parafusos de fixação de fraturas chega a 1,5 milhões de procedimentos anuais só nos Estados Unidos. A liga Ti6Al4V tem sido muito empregada em implantes devido às ótimas

propriedades de corrosão, que permitem uma biocompatibilidade eficaz. Além disso, a alta resistência mecânica e o baixo módulo de elasticidade também são propriedades muito importantes pelos implantes (ORÉFICE et al, 2006; GREGOLIN et al, 2012).

Diversos estudos estão sendo realizados para preparar suportes porosos de titânio para crescimento ósseo, sendo nesse caso essencial a porosidade bem como o tamanho dos poros interligados. Para produzir suportes metálicos com uma geometria bem definida, os métodos convencionais (incluindo torner, fresar e perfurar) são muitas das vezes impraticáveis e dispendiosos. Atualmente com advento da tecnologia, destaca-se a Manufatura Aditiva (MA). Esta tecnologia tornou-se comercial na década de 1980, tendo sido inicialmente denominada Prototipagem Rápida (PR) (PALLAROLAS, 2013; HOFFMANN et al, 2014; WIEDING et al, 2012).

A Manufatura Aditiva é uma técnica relativamente nova para produzir rapidamente objetos sólidos 3D a partir de dados de computador 3D. Essa técnica fornece caminhos para construir uma variedade de peças de formas complexas. Existem diversos tipos de tecnologia de PR no mercado e estas se diferenciam na maneira como é acrescentado o material, mas todas se baseiam no princípio da adição por camadas. Os diferentes processos de PR podem ser divididos de acordo com a forma inicial da matéria prima, podendo ser classificados em líquido, sólido e pó (GREGOLIN et al, 2012; RUIZ, 2014).

Os suportes de geometria complexa, porosos ou reticulados com tamanho de poros de 200µm podem ser fabricados a partir de um conjunto de dados digitais predefinidos em três dimensões obtidos em software CAD. A porosidade permite a migração e proliferação de osteoblastos e células mesenquimais. A interconexão entre esses poros desempenha papel fundamental neste processo, por permitir adequada migração e proliferação dos vasos sanguíneos, condição que consiste na base para o crescimento tecidual. Além de fornecer nutrientes, a vascularização irá coordenar a atividade das células ósseas e sua migração para o sítio de implantação (HOFFMANN et al., 2014; MASTROGIACOMO et al., 2006).

A geometria e a topografia da superfície são importantes para o sucesso da integração osso-implante em curto e longo prazo. Independente da topografia da superfície do titânio, a bioatividade desta superfície não é grande o suficiente para induzir o crescimento do tecido ósseo em um curto período de tempo. Neste sentido, diferentes técnicas de recobrimentos, dentre elas o Tratamento Biomimético, estão sendo propostas para promover interações da composição química dos recobrimentos com os tecidos e células. A quantidade e a qualidade da osseointegração estão relacionadas às propriedades superficiais dos biomateriais. Tanto a composição química, a capacidade hidrofílica, quanto à rugosidade são parâmetros

importantes no aumento da união mecânica do implante ao osso (MACHADO, 2008; NISHIGUCHI, 2001; PIATTELLI et al., 1998).

O tratamento biomimético é baseado na precipitação heterogeneamente de fosfato de cálcio, como a hidroxiapatita em substratos metálicos por meio de solução de íons semelhantes ao plasma sanguíneo e visa obter uma camada de apatita na superfície dos implantes de titânio, aumentando sua osseocondutividade e consequentemente melhorando a osseointegração (BOYAN, 2003; ANDRADE et al., 2000).

A osseointegração é definida como uma união anatômica e funcional entre o osso remodelado e a superfície do implante. Para o estabelecimento da osseointegração o material do implante, o designer, acabamento, estado do osso, técnica cirúrgica e as condições de carga são parâmetros fundamentais (MACHADO, 2008; ALBREKTSSON et al., 1981).

Inúmeros fatores podem alterar o metabolismo ósseo e alguns recursos não invasivos têm se mostrado úteis para estimular e melhorar a qualidade do tecido ósseo. No início da década de 1950 se conseguiu com sucesso a primeira aplicação do ultrassom em medicina, sendo que a partir daí sua evolução ocorreu rapidamente. A energia ultrassônica é um dos recursos físicos amplamente utilizados nos tratamentos de fisioterapia, estéticos e de diagnósticos médicos (GUIRRO e GUIRRO, 2004; MEIRA et al., 2010).

O ultrassom interage com tecidos e produz mudanças biológicas através de vibrações produzidas causando compressão e expansão no tecido, além de micromassagem e mudanças na permeabilidade das células para o cálcio e outros íons, e aumento na permeabilidade vascular (AZUMA et al., 2001).

O método de uso do ultrassom para consolidar fraturas ósseas evidencia que o tempo de consolidação pode ser abreviado. O reparo ósseo é um processo regenerativo altamente complexo. Esse método tem demonstrado efeitos positivos na proliferação de células ósseas e na aceleração do processo de consolidação de fraturas. Duarte (1983) atribuiu à aceleração do processo de consolidação de fratura óssea por ultrassom de baixa intensidade ao mecanismo de piezoelectricidade (SENA, K et al., 2008; DUARTE, 1983).

1.1 OBJETIVO GERAL

A partir do exposto, o objetivo geral desta pesquisa é analisar a resposta do reparo da fratura entre os scaffolds porosos e o tecido ósseo.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para tal, os objetivos específicos foram determinados pelas seguintes etapas:

- Analisar a resposta tecidual dos implantes metálicos fabricados pela tecnologia de Sinterização Direta de metais a Laser (DMLS), a ação da geometria de poros sobre a conectividade entre o implante e o tecido ósseo.
- Caracterização da modificação da superfície dos suportes porosos de Ti6Al4V após a realização do tratamento de superfície por meio de estudo *in vivo* e *in vitro*.
- Avaliar a consolidação da fratura óssea induzida pelo ultrassom terapêutico de baixa intensidade após processamento, tratamento térmico e tratamento de superfície dos scaffolds com incorporação de medicamento.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

As fraturas ósseas representam um desafio para as cirurgias ortopédicas. Os materiais autólogos (enxertos de tecidos do próprio corpo) são considerados o padrão ouro para o tratamento deste tipo de fratura, por causa da sua elevada biocompatibilidade. Contudo, para o enxerto de material autólogo é necessário uma segunda cirurgia, provocando outras consequências para o paciente. O uso de materiais cerâmicos e metálicos para a construção de implantes utilizados para o reparo do tecido ósseo humano tem se tornado uma prática comum em diversas especialidades médicas nos últimos 20 anos (RIGO et al, 1999; WIEDING et al, 2012).

Os biomateriais substitutos ósseos devem atender a requisitos essenciais tais como: a biocompatibilidade, biofuncionalidade, resistência à corrosão e propriedades mecânicas que permitem um comportamento semelhante ao osso original quanto à resistência à fratura e à deformação (BERTOL et al, 2010). De acordo com a resposta induzida ao meio biológico, os biomateriais podem ser classificados em bioinertes, biotoleráveis e bioativos (ORÉFICE et al, 2006). A resposta induzida pelos materiais bioinertes e biotoleráveis, é a encapsulação do implante por uma camada de tecido fibroso não aderente, podendo levar à instabilidade e falha. Os materiais bioativos são capazes de interagir intimamente com o tecido vivo sem a interação de tecido fibroso (GUASTALDI e APARECIDA, 2010).

Entre os materiais usados na confecção de implantes destacam-se os materiais metálicos, usados devido a sua boa resistência mecânica e elevada tenacidade, facilidade de fabricação e baixo custo (ORÉFICE et al, 2006). Os primeiros biomateriais metálicos utilizados com sucesso para reparo ósseo foram o aço inoxidável e as ligas de cobalto e cromo, por volta de meados do século XX (OLIVEIRA et al, 2010). Porém, os elementos metálicos não são aceitos pelo corpo em quantidades elevadas, o que torna a corrosão metálica passível de ocorrer no ambiente fisiológico altamente agressivo. A corrosão pode ainda levar à deterioração das propriedades mecânicas do material, comprometendo o desempenho da função (ORÉFICE et al, 2006).

A osseointegração é definida como contato direto entre o osso vivo e o implante em um nível microscópico e a zona de interface entre o osso e o implante tem sido o foco (ALBREKTSSON et al, 1981). De acordo com os fundamentos de Branemark, há mais de 40 anos, consiste em uma conexão direta, estrutura e funcional entre o osso vital organizado e a

superfície de um implante de titânio capaz de receber carga funcional. E para tal, alguns fatores como biocompatibilidade, o desenho do implante, as condições da superfície do implante, o estado do hospedeiro, a técnica cirúrgica e o controle das cargas após a instalação são determinantes para o sucesso da osseointegração (BRANDÃO et al, 2010).

O titânio e suas ligas têm sido tradicionalmente utilizados em fabricação de implantes metálicos, demonstrando biocompatibilidade e osseointegração. A superfície do titânio se torna instantaneamente coberta com uma camada óxida quando a superfície metálica do titânio é exposta ao ar. Essa camada de óxido se comporta como isolante elétrico atuando como barreira de difusão iônica eletrônica, e dessa forma, diminui a velocidade de oxidação. Esse filme protetor quando é perdido por desgaste mecânico, o óxido é instantaneamente recomposto com a presença de átomos de oxigênio do meio. A elevada resistência à corrosão da barreira de óxido formado sobre o substrato metálico, a estabilidade química, a forte união com o substrato são aceitos como justificativas para a biocompatibilidade do titânio (BUSQUIM, 2012). A camada óxida é formada de uma combinação de TiO , TiO_2 , Ti_2O_3 e Ti_3O_4 . Essa camada previne o contato direto entre osso e metal. A importância desse fato para estabelecer uma durável osseointegração não deve ser descartada (ALBREKTSSON et al, 1981).

Existem pré-requisitos para que a osseointegração ocorra de forma eficiente, isso se processa através de combinações como: material do implante, designer do implante, o estado do osso, técnica cirúrgica e as condições de carga do implante (ALBREKTSSON et al, 1981).

A excelente ancoragem entre o osso e o titânio se dá porque este biomaterial minimiza o processo inflamatório agudo após a implantação e, desse modo, melhora as condições de osseointegração. E para otimizar a osseointegração, vários tratamentos superficiais são estudados e sugerem propiciar a aceleração da adesão de células ósseas ao implante (COSTA, 2012).

2.2 TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é constituinte principal do esqueleto, serve de suporte para as partes moles e protege órgãos vitais. O osso é uma forma especializada de tecido conjuntivo que semelhante a outros tecidos conjuntivos, consiste em células e matriz extracelular. O aspecto que diferencia o osso de outros tecidos conjuntivos é a mineralização de sua matriz. O mineral é o fosfato de cálcio, na forma de cristais de hidroxiapatita $[Ca_{10} (PO_4)_6(OH)_2]$

(JUNQUEIRA, 2004; ROSS, 2008). A mineralização da matriz confere a este tecido uma extrema dureza, permitindo-lhe desempenhar importantes funções de sustentação e proteção. Por sua vez, a matriz colagenica proporciona-lhe certa maleabilidade fornecendo-lhe algumas possibilidades de extensão e flexão. Como pode ser visualizada na Figura 02 (JUDAS, 2012).

Figura 02 - Propriedades de matriz óssea quanto a sua mineralização e colagenica.



Fonte: Adaptado de JUDAS et al, 2012.

Os ossos são estruturas altamente dinâmicas, crescem, remodelam-se e mantêm-se ativos durante toda a vida do organismo. As células do osso incluem células osteoprogenitoras, que se diferenciam em osteoblastos. Estes são responsáveis pela secreção da matriz. Quando estas células ficam envolvidas pela matriz, elas se tornam quiescentes e são denominadas osteócitos. Os espaços ocupados pelos osteócitos são denominados lacunas. Os osteoclastos, células gigantes multinucleadas originárias da fusão de precursores vindos da medula óssea, são responsáveis pela reabsorção e remodelação do osso (JUDAS et al, 2012; GARTINER, 2003).

Os osteoblastos são responsáveis pela síntese dos componentes orgânicos da matriz óssea. Os osteócitos são células ósseas maduras derivadas de osteoblastos que ficam

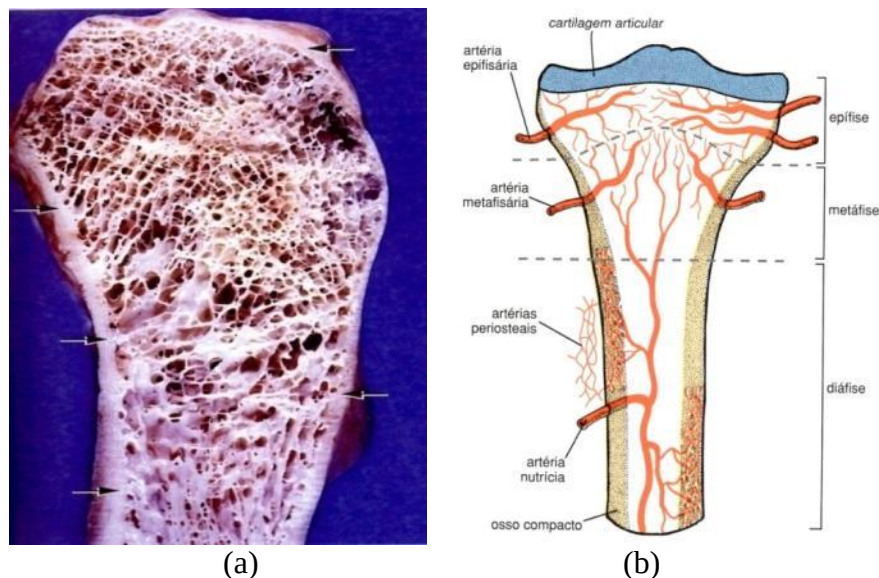
aprisionados dentro de lacunas. Os osteócitos se conectam por canalículos nos quais prolongamentos citoplasmáticos estabelecendo junções comunicantes das quais íons e pequenas moléculas podem movimentar-se entre as células. Os canalículos contêm fluidos extracelulares que transportam nutrientes e metabólicos nutrindo os osteócitos. Estas células respondem a estímulos que exercem tensão sobre o osso possuindo ação de mecanotransdução (GARTNER, 2003).

Os osteoclastos são células móveis, gigantes e removem tecidos ósseos. Secretam enzimas que atacam a matriz e liberam cálcio e são derivadas dos monócitos do sangue circulante (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004; LEITE, 2005).

Dois arranjos estruturais distintos do tecido ósseo podem ser reconhecidos, uma camada densa compacta forma o exterior do osso, osso compacto (cortical); uma rede esponjosa consistindo em trabéculas (espículas finas anastomosantes de tecido ósseo) forma o interior do osso, osso esponjoso. A conectividade das trabéculas é um fator importante para a qualidade do osso e o risco de fratura (ROSS e PAWLINA, 2008; ROQUE, 2014).

A Figura 03 representa o arranjo do osso longo com sua camada de osso esponjoso e compacto (cortical), as dimensões em uma diáfise e duas extremidades e o suprimento sanguíneo de um osso longo.

Figura 03 - (a) Aspecto macroscópico do osso longo, a porção externa do osso possui uma estrutura compacta (cortical) e interna uma configuração esponjosa (trabecular). (b) Estrutura de um osso longo e seu suprimento sanguíneo (ROSS e PAWLINA, 2008).

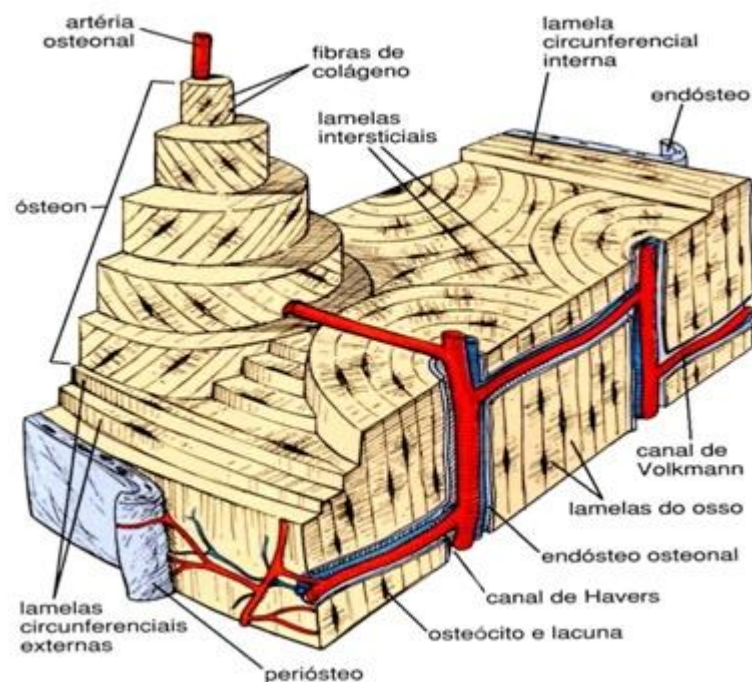


Fonte: Adaptado de ROSS e PAWLINA, 2008

A observação mais íntima do osso esponjoso mostra trabéculas ósseas ramificadas e espículas projetando-se da superfície interna do osso compacto para cavidade da medula. Não há sistemas de Havers no osso esponjoso, mas há arranjos irregulares de lamelas. Estas contêm lacunas abrigando osteócitos, que são nutridos por difusão da cavidade medular, que está cheia com medula óssea (GATNER, 2003).

Os ossos são revestidos externa e internamente por membranas denominadas periósteos e endósteos, respectivamente. Ambas são vascularizadas sendo importantes para nutrição e oxigenação das células do tecido ósseo, além de fornecer osteoblastos para o crescimento dos ossos e reparação de fraturas. A camada mais superficial do periósteo contém principalmente fibras colágenas e fibroblastos. As fibras de Sharpey são feixes de fibras colágenas do periósteo que penetram no osso realizando sua ancoragem. A camada mais interna do periósteo é composta por células osteoprogenitoras (PAOLILLO, 2013). Toda estrutura que compõe o osso cortical está representado na Figura 04.

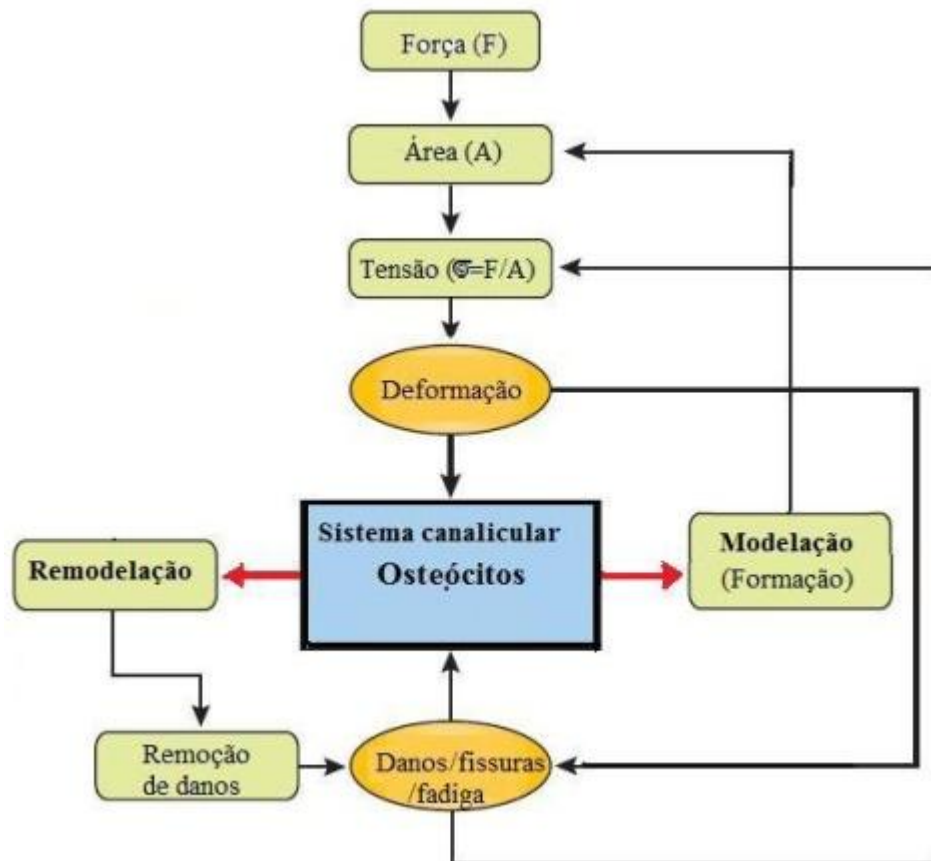
Figura 04 - Esquema do osso cortical compacto: ósteons, lamelas, canais de Volkmann, canais de Havers, periósteo e endósteo.



Fonte: Adaptado de ROSS e PAWLINA, 2008.

A resposta do metabolismo ósseo está diretamente relacionada a fatores hormonais e aos estímulos mecânicos associados à atividade fisiológica diária podendo desencadear processos de modelação ou de remodelação. O anatomista Julio Wolff, afirmava que os elementos trabeculares do esqueleto não foram concebidos apenas para realizar uma função específica de suporte, mas também para responder às forças a que estão sujeitos. As características geométricas dos ossos e a distribuição dos seus componentes microestruturais são determinadas pela magnitude e direção das tensões a que estão submetidas. A Figura 05 esquematiza o modelo biomecânico da deformação transmitida aos osteócitos (MEIRA et al, 2010; JUDAS et al, 2012).

Figura 05 - Esquema biomecânico do estímulo mecânico no tecido ósseo.



Fonte: Adaptado de JUDAS et al, 2012.

Os osteoblastos e osteócitos contêm um arsenal de proteínas mecano-sensíveis capazes de realizar a mecanotransdução do estímulo mecânico culminando em uma resposta que resultará em produção ou reabsorção óssea. Nos anos 1940 a bioeletricidade no osso foi descrita no qual ao aplicar estímulos térmicos, químicos e mecânicos a um osso longo,

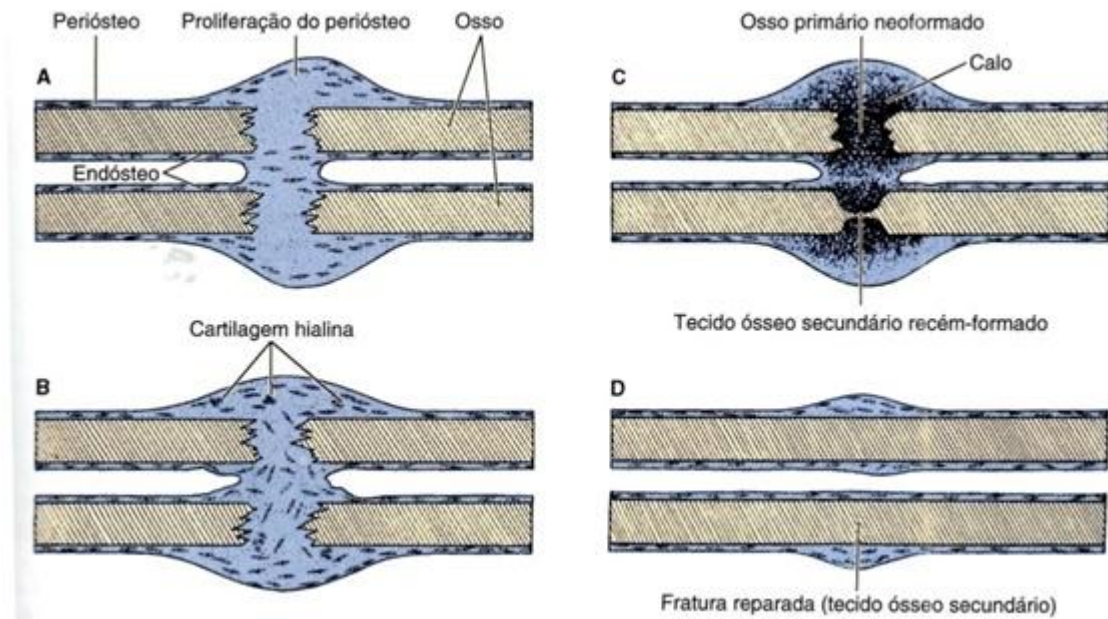
observaram a formação de calo ósseo mesmo na ausência de fratura que verificou o caráter piezoelétrico do osso aplicando uma força ao longo do eixo de um osso longo e registrando a geração de um sinal elétrico à sua superfície (GUSMÃO et al, 2007; BARROCA, 2008).

A piezoelectricidade é uma polarização elétrica produzida por certos materiais. A estrutura do colágeno ósseo sob deformação mecânica produz uma polarização elétrica. O efeito inverso também existe, isto é, quando se aplica um campo elétrico a um osso, ele se deforma mecanicamente. Esta deformação mecânica produzida atinge a atividade celular por estimular o movimento do fluido intersticial no osso, contribuindo para o aumento do transporte de nutrientes e metabólitos. Nos locais de carga mecânica há deslocamento do fluxo de fluido intersticial que promove força de cisalhamento sobre a membrana celular de osteócitos o qual resulta em aumento de nutrientes e de transporte metabólico dentro dos canalículos dos ossos, a mecanotransdução ocorre constantemente no tecido ósseo (PAOLILLO, 2013; LIRANI e LAZARETTI-CASTRO, 2005; GUSMÃO e BELANGERO, 2009).

2.2.1 Reparo Ósseo

A resposta inicial a uma fratura é similar à resposta a qualquer lesão que produza destruição tecidual e hemorrágica. Nos locais de fratura óssea, ocorre hemorragia, pela lesão dos vasos sanguíneos, destruição de matriz e morte de células ósseas. Para que a reparação se inicie, o coágulo sanguíneo e os restos celulares e da matriz devem ser removidos pelos macrófagos. O perióstio e o endóstio próximos a área fraturada respondem com uma intensa proliferação, formando um tecido muito rico em células osteoprogenitoras que constitui um colar em torno da fratura e penetra entre as extremidades ósseas rompidas (Figura 06 a e b). Nesse anel ou colar conjuntivo, que se localiza entre as extremidades ósseas fraturadas, surge tecido osso imaturo. Esse processo evolui de modo a aparecer, um calo ósseo que envolve a extremidade dos ossos fraturados. O calo ósseo é constituído por tecido ósseo imaturo que une provisoriamente à extremidade do osso fraturado (Figura 06 c e d) (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

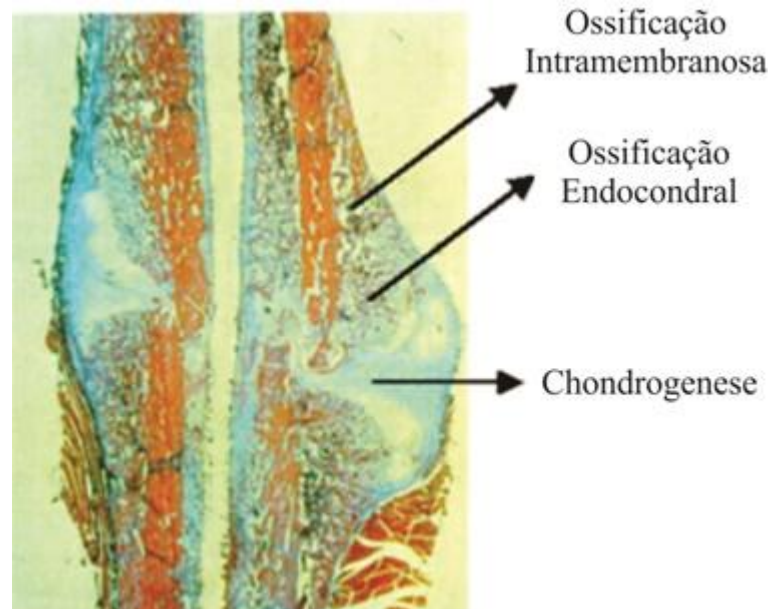
Figura 06 - Esquema do processo de reparação da fratura.



Fonte: Adaptado de JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004.

Os primeiros sete a dez dias envolvem o processo de condrogênese levando ao desenvolvimento da cartilagem adjacente no local da fratura e da formação de osso diretamente de células osteoprogenitoras presentes no perióteo (Figura 07).

Figura 07 - Calo imaturo após nove dias da fratura.



Fonte: Adaptado de INTROINI, 2011.

Após 14º dia ocorre uma maior formação de osso sob o periósteo e a cartilagem começa a se calcificar. No 21º dia do reparo ósseo animal, que corresponde a cerca de quatro ou cinco semanas em um ser humano, a fratura está bem unida. O calo é composto principalmente de cartilagem calcificada que deve ser removida e substituída por osso. Este tecido se torna alvo de condroblastos multinucleados que são células especializadas na reabsorção dos tecidos calcificados. Os condroblastos degradam a cartilagem calcificada, enviando um sinal que permite que vasos sanguíneos penetrem no tecido e tragam células tronco mesenquimais que se diferenciam em células osteoprogenitoras e em osteoblastos.

Entre 28 e 35 dias existe uma combinação de cartilagem calcificada e formação de tecido ósseo novo. Neste período os osteoclastos preenchem o tecido e remodelam o calo, o transformado em uma estrutura óssea lamelar capaz de suportar carga mecânica (INTROINI, 2011).

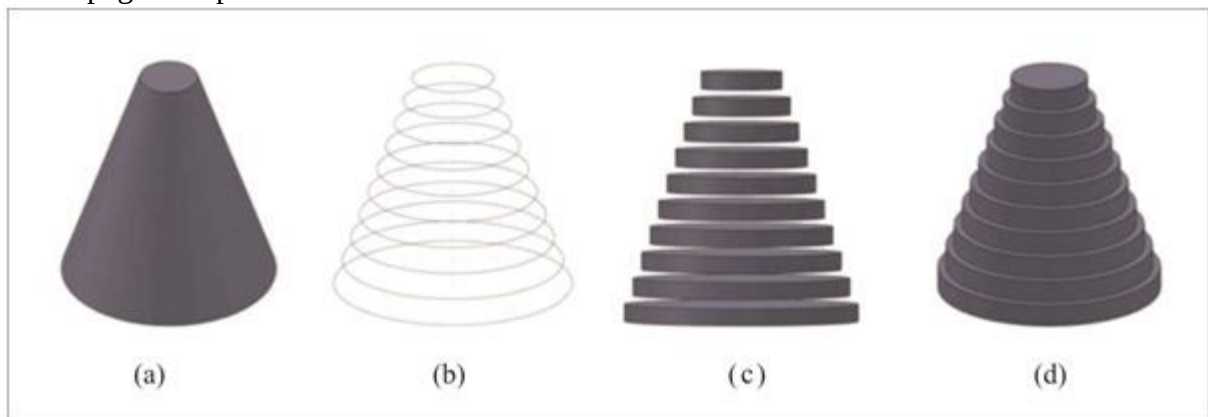
2.3 PROTOTIPAGEM RÁPIDA

A Prototipagem Rápida (PR) é um processo de construção aditiva de protótipos físicos, projetados a partir de um modelo digital tridimensional (CAD), que produz objetos sólidos 3D. A construção se processa através da adição sucessiva de finas camadas de material. Essas técnicas fornecem benefícios para se construir uma variedade de peças de geometria

complexa, rapidez de produção, quando comparada com técnicas convencionais, diminuição de custos, detecção precoce de problemas de produção (GREGOLIN et al, 2012; ANTAS, 2007).

Existem mais de 20 tipos diferentes de sistemas de prototipagem rápida, e a principal diferença entre eles é o estado inicial da matéria-prima utilizada para fabricação: Líquido, Sólido e Pó. Elas se diferenciam na maneira como é acrescentado material, mas todas se baseiam no princípio da adição por camadas (RUIZ, 2014; IPAR, 2012).

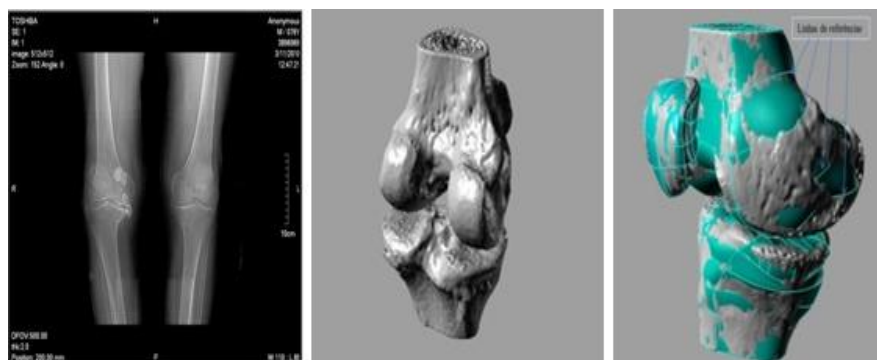
Figura 08 - Prototipagem Rápida - Modelo Geométrico 3D modelo Físico: (a) Modelo CAD; (b) Modelo CAD fatiado; (c) Fabricação e sobreposição das camadas; (d) Peça fabricada por Prototipagem Rápida.



Fonte: Adaptado de IPAR, 2012.

Na área médica a PR foi utilizada nos anos 90 e, através de informações de exames tridimensionais, criou-se software para reprodução de dados entre a interface dos resultados clínicos e a prototipagem. Podendo assim, ser aplicada em diversas áreas do conhecimento humano, para auxiliar no estudo e muitas vezes na própria fabricação dos componentes para uso. Com o auxílio de equipamentos de tomografia computadorizada e a ressonância magnética conseguimos reproduzir qualquer parte do corpo humano em imagens tridimensionais com grande perfeição, produzindo implantes e materiais de auxílio nas cirurgias (GREGOLIN et al, 2012). A Figura 09 demonstra a utilização da prototipagem rápida na área médica.

Figura 09: Produção de prótese ortopédica por Prototipagem Rápida.



<http://cienciahoje.uol.com.br/noticias/2012/08/joelho-de-laboratorio/>

Os protótipos dos biomodelos permitem a mensuração de estruturas, fabricação de implantes personalizados, simulação de técnicas de ressecção com excelente precisão. Como consequência, benefícios na redução do tempo cirúrgico, tempo de anestesia e do risco de infecção (MEURER, 2008).

O Quadro 01 apresenta algumas tecnologias de Prototipagem Rápida que utilizam pó para fabricação dos modelos físicos.

Quadro 01 - Tecnologias de Prototipagem Rápida que utilizam pó para fabricação dos modelos físicos.

Pó (Suporte: O próprio pó, camada formada e compactada por um rolo)				
Tecnologia PR	Feixe de Aglutinação	Controle de Varredura	Atmosfera de Processo	Matéria-Prima
SLS (SLSind,DMLS,SLM)	Laser	Espelhos	Nitrogênio Argônio	Polímero, Compósito, Metal, Cerâmica.
LENS*	Laser	Espelhos	Nitrogênio	Metal
EBM	Elétrons	Magnetos	Vácuo	Metal
3DP	Adesivo Liq.	IJP	Ambiente	Cerâmica

*Exceção. Na LENS o pó não é espalhado e comprimido por um rolo, mas dispensado por bicos injetores arranjados coaxialmente com o feixe de laser,

Fonte: Adaptado de GREGOLIN et al, 2012

2.3.1 Sinterização Direta de Metais a Laser (DMLS)

A metodologia de Sinterização Direta de Metais por Laser (DMLS) é utilizada para fabricação de componentes de geometrias complexas. A possibilidade de obtenção de peças com geometrias complexas, este método possui um grande potencial para a manufatura de implantes personalizados de reconstituição óssea (ROCHA, 2013).

Os implantes porosos de titânio têm sido usados para facilitar e/ou permitir o crescimento ósseo na estrutura porosa. Os poros devem ser interligados tridimensionalmente e fornecer espaços suficiente para a fixação e proliferação de tecido ósseo e para facilitar o transporte de fluidos pelo material (MACÊDO et al, 2011). O tamanho dos poros devem ser na ordem do tamanho do osso trabecular. Em geral, os implantes com poros de tamanho na faixa de 100-500 μ m são apropriados para o desenvolvimento ósseo (NOURI, HODGSON e WEN, 2010).

Os implantes fabricados por prototipagem rápida devem apresentar características funcionais e formais adequadas para cada tipo específico de fratura e paciente (BERTOL et al, 2010).

2.4 MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE

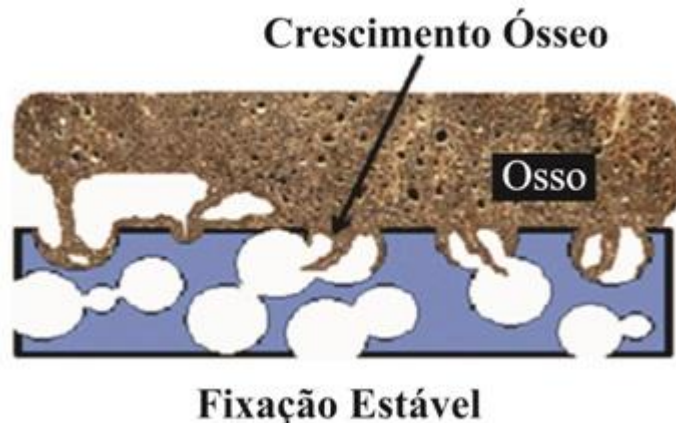
A eficiente fixação dos implantes de tecido ósseo requer não apenas um material de composição adequada, mas também, uma boa estrutura de propriedades mecânicas semelhantes á arquitetura do tecido hospede. A topografia do implante é um dos fatores que influencia o processo de reparação óssea, e abordagens para prover a ancoragem óssea é de fundamental importância no formato e estrutura dos implantes. Embora implantes de superfícies usinadas tenham sido utilizados por muitos anos, pesquisas demonstram que o aumento na rugosidade tende a aumentar, não só a área de superfície entre o osso e o implante, mas também a resistência de união da interface (NOURI, HODGSON e WEN, 2010; GOIA, 2013).

Diferentes materiais porosos foram desenvolvidos, incluindo cerâmica porosa, polímeros e materiais metálicos. Embora haja excelente resistência à corrosão e biocompatibilidade, os materiais cerâmicos são frágeis e trincam facilmente. Igualmente, os polímeros porosos não conseguem suportar as forças mecânicas presentes na substituição cirúrgica das articulações. Isso leva com que os pesquisadores busquem suportes metálicos

porosos devido a suas propriedades mecânicas adequadas de suporte de carga (NOURI, HODGSON e WEN, 2010).

A porosidade permite que o novo osso cresça para dentro da estrutura porosa, fornecendo uma fixação biológica adequada. A Figura 10 ilustra o osso crescendo dentro dos poros abertos de um implante, criando uma alta conectividade interfacial.

Figura 10 – Interface osso-implante metálico.

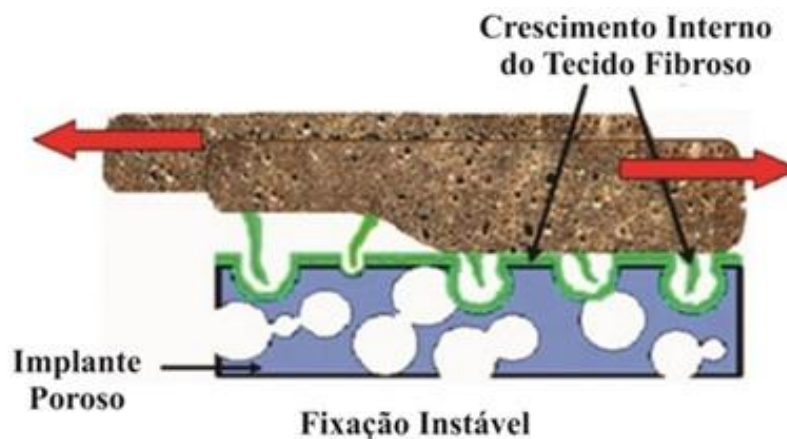


Fonte: Adaptado de NOURI, HODGSON e WEN, 2010.

Os implantes porosos são capazes de fornecer uma estabilidade primária entre implantes e estruturas ósseas vivas. Entretanto, quando implantados no corpo humano, as ligas de titânio são geralmente encapsuladas por um tecido conector macio e fibroso. Uma camada fibrosa interfere entre o implante e o osso, o qual reduz a estabilidade do implante e contribui para seu desacoplamento (NOURI, HODGSON e WEN, 2010). As células aderem à superfície do biomaterial levando a um processo inflamatório. A diferença entre o tamanho dos implantes e os macrófagos inicia uma inflamação crônica e os macrófagos se fundem formando células gigantes multinucleadas que persistem durante toda a vida do implante, revestindo o mesmo com um tecido fibroso de cerca de 50-200µm de espessura (OLIVEIRA, 2013).

Na Figura 11, o insucesso dos implantes é caracterizado por reações inflamatórias, infecciosas, deterioração funcional do órgão ou do local de implantação, migrações e extrusões com exposição total ou parcial do material implantado (TURRER e FERREIRA, 2008).

Figura 11- Formação de cápsula fibrosa em interface osso/implante.



Fonte: Adaptado de NOURI, HODGSON e WEN, 2010.

Apesar da excelente biocompatibilidade dos implantes de titânio, a capacidade desses materiais se unirem ao hospedeiro não é suficiente, levando a um comprometimento da osseointegração. Para aumentar e acelerar a osseointegração a partir da obtenção de superfícies bioativas, várias pesquisas estão sendo desenvolvidas empregando técnicas de modificação de superfície (XUE et al, 2005).

A bioatividade de implantes de titânio pode ser melhorada utilizando várias técnicas de modificação de superfície. Estes métodos podem ser categorizados em três classes: mecânica, física e química. Em métodos mecânicos uma superfície porosa ou lisa é formada por maquinários, lixando ou jateando. No método físico a formação da cobertura, no titânio e suas ligas, são na maior parte atribuída à energia termal, cinética e elétrica. Atualmente métodos químicos estão atraindo mais atenção, por seus custos mais baixos, maior facilidade de controle e melhor adesão entre osso e a superfície implantada, quando comparados a métodos mecânicos e físicos (NOURI, HODGSON e WEN, 2010).

2.4.1 Tratamento de Superfície Biomimético

As reações químicas ocorrem na interface entre o metal e a solução química, fornecendo propriedades exigidas pelo meio biológico. A hidroxiapatita sintética é considerada um material bioativo e biocompatível e pode diretamente se acoplar ao osso sem a ocorrência de encapsulação com tecido fibroso. A apatita é o principal componente do cristal ósseo e também preferencialmente absorve proteínas que servem como fatores de crescimentos (NOURI, HODGSON e WEN, 2010).

Fosfatos de cálcio têm sido utilizados como recobrimentos de implantes ortopédicos e odontológicos para promover um ambiente condutivo para a formação, crescimento ósseo e estabilização na superfície dos implantes a longo e curto prazo (GUASTALDI et al, 2010). O tratamento da superfície dos implantes de titânio com a utilização de soluções iônicas capazes de precipitar heterogeneamente fosfatos de cálcio em materiais metálicos é conhecido como tratamento biomimético (MACHADO, 2008).

O tratamento biomimético foi utilizado na pesquisa de Kim e Kokubo para aprimorar a bioatividade do titânio e suas ligas, demonstraram que após tratamento químico, uma formação de fina camada de titanato de sódio em sua superfície. Uma camada densa e uniforme de apatita, semelhante ao osso na superfície do substrato metálico, após sua imersão em uma solução eletroquímica que produz a parte inorgânica do plasma sanguíneo humano (SBF). A solução de composição similar ao plasma sanguíneo é denominada Simulated Body Fluid (SBF) é usada para mimetizar o processo biológico de formação óssea. Sua composição química é demonstrada no Quadro 02 (GUASTALDI e APARECIDA, 2010).

Quadro 02 - Composição iônica do plasma sanguíneo e da solução SBF (mmol DM-3)

	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HPO ₄ 2 ⁻	SO ₄ 2 ⁻	HCO ₃ ⁻
Plasma Sanguíneo	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	1,0	0,5	27,0
SBF	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8	1,0	0,5	4,2

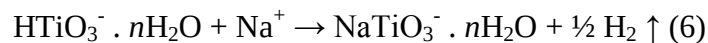
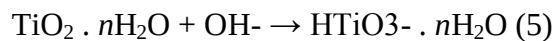
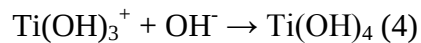
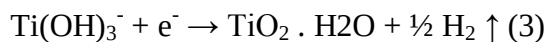
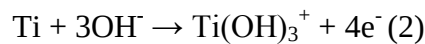
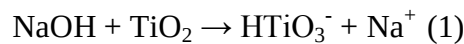
Fonte: Adaptado de GUASTALDI e APARECIDA 2010.

O método consiste na imersão em SBF o substrato a ser recoberto juntamente com um vidro bioativo de composição em peso (%) MgO 4,6, CaO 44,7, SiO₂ 34,0, P₂O₅ 16,2 e CaF₂ 0,5, denominado vidro G. O sistema era mantido a 37°C por sete dias, formando-se uma camada homogênea de 1mm de espessura, composta por HÁ carbonatada de baixa cristalinidade semelhante à HA biológica presente no tecido ósseo. Em seguida, o substrato era colocado em uma solução SBF 1,5 vezes mais concentrada, obtendo-se um recobrimento com a mesma composição, porém com cerca de 15 mm de espessura (GUASTALDI e APARECIDA, 2010).

Essa técnica possui quatro vantagens principais: é um processo que ocorre em temperaturas baixas podendo ser aplicável a substratos sensíveis a temperaturas elevadas; forma cristais de apatita semelhantes ao osso tendo elevada bioatividade e bioreabsorção.

Trata-se de um método atrativo para melhorar a qualidade da interface osso-implante (REZENDE, 2011). Além das vantagens de processamento em baixas temperaturas, podendo ser aplicáveis em substratos sensíveis á alta temperaturas, formação de cristais semelhantes ao osso elevando biatividade e a bioreabsorção. Pode ser empregado em materiais de geometria complexa e pode ser incorporada durante o crescimento ósseo (HABIBOVIC et al., 2002).

Durante o tratamento alcalino o óxido de TiO_2 presente na camada passiva reage da seguinte forma :



Essas espécies carregadas negativamente combinam com os íons alcalinos na solução aquosa, resultando na formação de uma camada alcalina de hidrogel de titanato (VERCIK et al, 2003).

Quando essa camada é exposta ao SBF, o revestimento de titânio formado por tratamento químico libera íons Na^+ da cam

ada de titanato de sódio em troca de íons H_3O^+ do fluido, o que aumenta o pH da solução e favorece o processo de nucleação de alguns fosfatos. Os grupos $Ti-OH$ carregados negativamente reagem com íons Ca^{2+} do fluido (formando titanato de cálcio amorfo), que por sua vez reagirão com os íons fósforo originando a camada de apatita. O tratamento alcalino com $NaOH$ resulta em uma filme poroso aderente ao substrato, enquanto a imersão em SBF resulta em uma camada de fosfato de cálcio (apatita - $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) (OLIVEIRA, 2012).

A Figura 12 apresenta esquematicamente as etapas da ativação da superfície do titânio através de tratamento químico em solução de $NaOH$ e posterior imersão em solução de SBF e formação da camada de apatita.

Figura 12 – Modificação da superfície do suporte de titânio – Tratamento biomimético.



Fonte: Adaptado de NOURI, HODGSON e WEN, 2010.

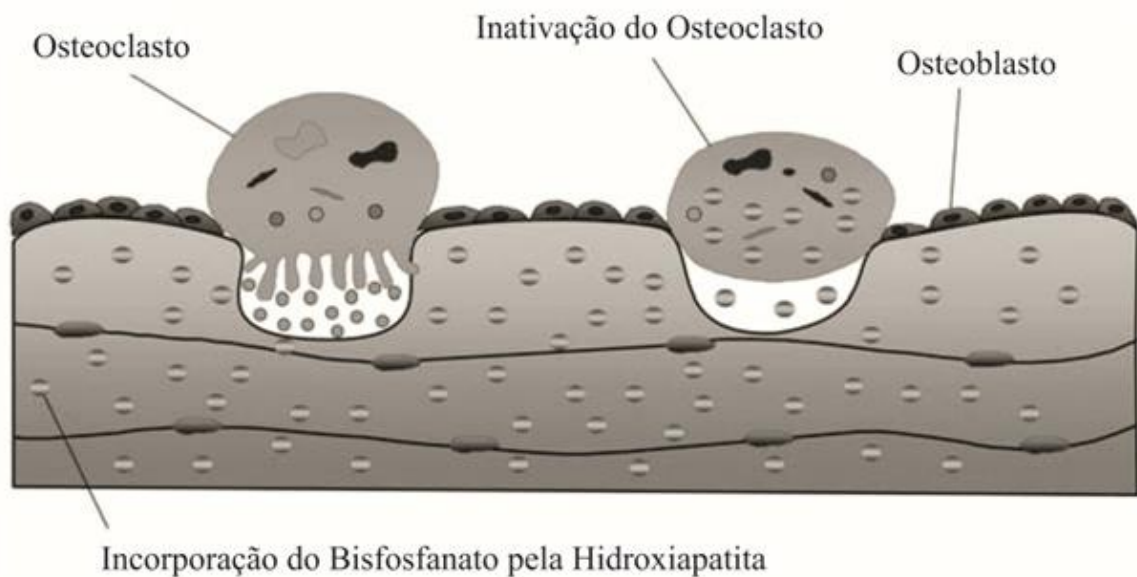
2.4.2 Tratamento com Incorporação de Medicamento

O fator mais importante que distingue um biomaterial é sua capacidade de interagir sem criar prejuízos inaceitáveis ao tecido receptor. Quanto mais biocompatível for o material, mais inerte será sua resposta final, o que levará maior sobrevida e qualidade.

Dentre as cerâmicas de fosfato de cálcio se destaca a hidroxiapatita, por ser o principal componente da matriz óssea (95%) e por suas propriedades biocompatíveis e bioativas (BUSQUIM, 2012).

A incorporação de medicamentos a superfícies de biomateriais podem trazer benefícios, com o aumento da osseointegração de superfícies implantadas, por exemplo, com de alendronato de sódio a revestimentos de fosfato de cálcio (CARVALHO, 2013). Como agente terapêutico, o alendronato de sódio é um fármaco pertencente ao grupo dos bisfosfanatos, análogos sintéticos ao pirofosfatos, potente inibidor da reabsorção óssea por osteoclastos, e aumentam a formação óssea (BUSQUIM, 2012). Os bisfosfanatos são fármacos utilizados para o tratamento de doenças ósseas que quando liberados no ambiente ácido das lacunas de reabsorção, impedem a ação dos osteoclastos, como demonstrado na figura 13 (CASTRO, 2004; MARIOTTI, 2008)

Figura 13 – Ação do Bisfosfanato sobre o Osteoclastos



Fonte: Adaptado de SHANBHAG, 2006.

O potencial de ação do uso dos bisfosfonatos sobre a conexão dos implantes e o osso é uma crescente investigação, devido seu efeito sobre as células para a prevenção da reabsorção óssea. Muitas vezes, as falhas verificadas em próteses estão relacionados com a qualidade do osso circundante ao implante, a qual pode ser melhorada pela ação dos bisfosfonatos. Esses medicamentos possuem habilidade de se ligar aos cristais de hidroxiapatita (HA), retardando a sua dissolução *in vitro* e a reabsorção do osso *in vivo* (SHANBHAG, 2006).

2.5 UTILIZAÇÃO DO ULTRASSOM DE BAIXA INTENSIDADE NO REPARO ÓSSEO

O uso de campos eletromagnéticos pulsados (PEMF) e ultrassom pulsado de baixa intensidade (LIPUS) no tecido ósseo como estimulação biofísica para melhorar a cicatrização da fratura foi objeto de uma ampla investigação na prática ortopédica desde 1953. Mais de 500.000 fraturas têm sido tratadas desta forma nos EUA, Europa e no Japão, nos últimos 20 anos (MASSARI et al, 2009).

Os tratamentos para reparo ósseo tem impacto econômico e social devido aos elevados custos. As áreas de pesquisas da bioengenharia têm contribuído na busca de novas terapias em quadros clínicos como atraso e ausência de consolidação de fraturas (PAOLILLO, 2013).

O reparo ósseo pode ser influenciado positivamente pelo uso do ultrassom terapêutico, por acelerar o metabolismo e auxiliar no controle do processo inflamatório, com consequente aumento da síntese de colágeno (FARCIC et al., 2012).

O ultrassom se propaga através da água e esse fato é usado na medicina já que a maioria dos tecidos corporais são constituídos principalmente de água e os comprimentos de ondas milimétricas nas baixas frequências de Mega-hertz usadas (0,75–10 Mhz) são comparáveis ao tamanho das estruturas tissulares com as quais é necessária a interação (YOUNG, 1998).

O equipamento de ultrassom terapêutico (UST) consiste de um gerador de corrente elétrica de alta frequência, conectado a uma cerâmica piezoelétrica sintética que se deforma na presença de um campo elétrico. O ultrassom é gerado a partir de um transdutor que transforma uma forma de energia em outra. O transdutor mais usado transforma a energia elétrica em energia mecânica usando o efeito piezoelétrico. O material piezoelétrico mais usado em fisioterapia é o titanatozirconato de chumbo – PZT (GUIRRO e GUIRRO, 2004).

O efeito da piezoelectricidade do osso foi estudado por Duarte (1981) e Pilla (1990). Os estímulos mecânicos exercem um papel na remodelação óssea, através dos osteoblastos e osteócitos que possuem proteínas mecanossensíveis produzindo resposta celular na produção e reabsorção óssea (GUSMÃO, 2007). A ação da energia mecânica nas integrinas, proteínas mecanoreceptoras, envolvidas no reparo ósseo e a quinase de adesão focal (FAK) foram investigadas por Gusmão (2007), Pounder& Harrison (2008).

O conhecimento sobre o comportamento da FAK em resposta aos estímulos mecânicos permanecem incompletos quando associados ao uso dos estímulos mecânicos produzidos pelo ultrassom no campo da mecanobiologia que envolve o reparo ósseo (GUSMÃO, 2007). Um estudo para avaliar a resposta da FAK sobre estímulos do ultrassom pulsado com diferentes frequências de repetição de pulsos a 100Hz e a 16Hz em fraturas de fíbula de ratos, demonstrou melhor resposta nos níveis sanguíneos de FAK e cálcio nos grupos com pulsos com repetição a 100Hz (LEITE, 2005).

A voltagem através do transdutor de ultrassom pode ser aplicada continuamente durante todo o tempo de tratamento (onda contínua) ou pode ser aplicada em pulsos- ligada por um tempo, desligada por um tempo, esse é conhecido como modo pulsado.

Quase todos os aparelhos de ultrassom tem uma frequência de repetição dos pulsos (no modo pulsado) fixa de 100 Hz. O modo pulsado pode ajustar-se segundo a relação entre a duração do pulso e o período de repetição dos pulsos de 1:5, 1:10 e 1:20 como ilustrado no Quadro 03. Quanto menor o tempo de pulso, menor o calor produzido (BORGES, 2006).

Quadro 03 – Relação do modo de pulso do ultrassom terapêutico.

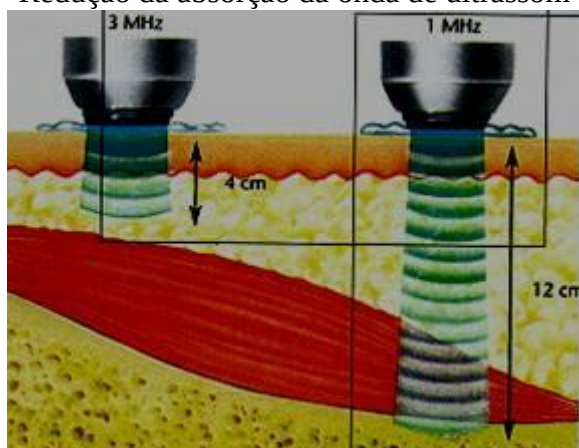
Relação	Duração dos pulsos	Pausa entre os pulsos
1:5	2ms	8ms*
1:10	1ms	9ms
1:20	0,5ms	9,5ms

* 20% de US / 80% de pausa (sem US). Fonte: BORGES, 2006.

Nos equipamentos de ultrassom terapêutico somente a onda longitudinal é utilizada, uma vez que os tecidos moles do corpo humano podem ser considerados como um fluido, e as ondas de polarização transversal propagam-se somente em meios sólidos. Os equipamentos disponíveis no mercado podem gerar pulsos com comprimentos de onda variando de 1,5 a 0,5mm no meio aquoso, nas frequências de 1 e 3MHz, respectivamente (GUIRRO e GUIRRO, 2004).

Tecidos ricos em colágeno absorvem grande parte da energia do feixe ultrassônico que os atravessa, e isso tende a gerar maior nível de aquecimento. A intensidade das ondas diminuirá à medida que elas penetram nas camadas teciduais e isto depende da frequência das ondas emitidas (Figura 13). Quanto maior a frequência do ultrassom, menor o comprimento de onda e maior absorção.

Figura 14 – Redução da absorção da onda de ultrassom terapêutico.



Fonte: <http://dermafisio.blogspot.com.br/>

A refração ocorre quando uma onda emitida passa para o outro meio e desvia sua direção sofrendo mudanças na velocidade, mas conservando sua frequência. Isso ocorre quando as interfaces têm impedâncias acústicas diferentes. Se as impedâncias acústicas forem semelhantes, ocorrerá pouca refração.

A absorção é caracterizada pela capacidade de retenção da energia acústica do meio exposto às ondas ultrassônicas; tais como são absorvidas pelo tecido e transformadas em calor. O tecido adiposo apresenta baixa quantidade de proteína estrutural e, dessa forma, absorve pouca a energia ultrassônica.

A reflexão, refração e absorção são as causas da diminuição da amplitude e intensidade à medida que as ondas de ultrassom passam através de qualquer meio.

Quadro 04 - Coeficiente de absorção da onda ultrassônica.

Estruturas	1MHz	3MHz
Osso	2,1mm	-----
Pele	11,1mm	4,0mm
Cartilagem	6,0mm	2,0mm
Ar	2,5mm	0,8mm
Tendão	6,2mm	2,0mm
Músculo (feixe perpendicular)	9,0mm	3,0mm
Músculo (feixe paralelo)	24,6mm	8,0mm
Gordura	50,00mm	16,5mm
Água	11.500,00mm	3.833,3mm

Fonte: BORGES, 2006

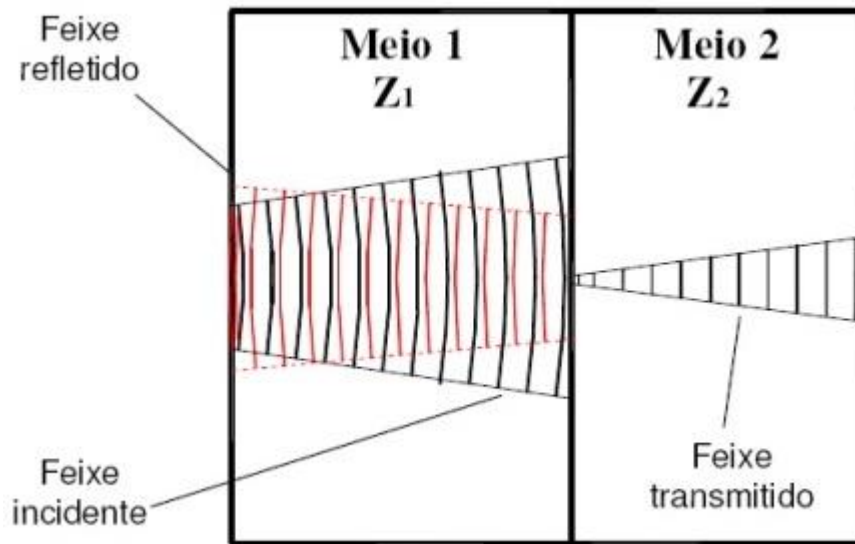
Enquanto as ondas ultrassônicas viajam pelo tecido, elas perdem energia, principalmente pela conversão em calor. Essa energia em uma região específica é dependente de absorção, divergência do emissor e reflexão. A temperatura de até 46°C em tecidos profundos (músculo/osso) é facilmente alcançada (KOCAOGLU et al, 2011).

A energia do US tem natureza mecânica e decresce em intensidade à medida que se propaga em um meio. Quando a onda acústica encontra a interface entre dois meios diferentes ela pode ser parcialmente refletiva e transmitida (refratada). A porcentagem de energia refletiva e refratada depende do ângulo de incidência e da diferença na impedância acústica dos meios. A impedância acústica (Z) é o produto da densidade do meio (p) pela velocidade (V) do ultrassom naquele meio.

$$Z = p.V$$

A onda refratada propaga-se no meio 2 com velocidade e comprimento de onda diferentes da do meio 1.

Figura 15: Comportamento do feixe sônico.



Fonte: Adaptado de GOMES, 2011.

As flutuações espaciais na densidade ou compressibilidade (as quais juntas determinam a impedância acústica característica) e absorção acústica promovem um aumento no espalhamento ou reflexão. A refração, reflexão, espalhamento e absorção, contribuem juntas para a perda total (atenuação) da energia sonora nos tecidos biológicos (MATOS, 2006).

Para cada interface que o feixe acústico encontre, haverá sempre uma porcentagem que se transmite ao outro meio e a uma porcentagem que reflete, sendo que, as quantidades transmitidas e refletidas dependem das velocidades dos meios e das suas densidades. Definimos os coeficientes de transmissão ou permeabilidade (T) e de reflexão (R) matematicamente através das relações:

$$R = I_r / I_i \quad T = I_t / I_i$$

Onde I_i , I_r e I_t são as intensidades (energia por unidade de tempo e por unidade de área) das ondas incidentes, refletida e transmitida, respectivamente. Como as intensidades das ondas sônicas são difíceis de calcular, precisamos relacionar os coeficientes R e T em função das características acústicas dos meios 1 e 2. As relações matemáticas abaixo, derivadas das anteriores, possibilitam o cálculo destes coeficientes:

$$R = (Z_1 - Z_2)^2 \quad T = 4 \cdot Z_1 \cdot Z_2$$

Onde Z_1 e Z_2 são as impedâncias acústicas dos meios que formam a interface.

A porção transmitida do som será tanto menor quanto maior for a diferença entre as impedâncias acústicas dos materiais. Quanto maior a diferença de impedância (menor a

transmissão ou permeabilidade, maior a reflexão na interface e maior a possibilidade de detectar uma interface no corpo em ensaio) (PAOLILLO, 2013). O Quadro 05 apresenta os valores de impedância acústica de alguns meios.

Quadro 05 - Valores de impedância acústica.

Meio	Impedância Acústica (Z) Rayls ($\text{Kg.m}^{-2}.\text{s}^{-1} \times 10^6$)
Ar	0.0004
Água	1.52
Gordura	1.35
Sangue	1.62
Músculo	1.65- 1.74
Osso	3.75 -7.38
Glicerina	2.4
Titânio	28
Aço	45

Fonte: Adaptado de PAOLILLO (2013)

<http://www.iem.unifei.edu.br/professores/edmilson/US.pdf>

Os agentes de acoplamento são utilizados nas aplicações de ultrassom terapêutico em virtude deste não se propagar no ar, fazendo com que o coeficiente de atenuação entre os dois meios envolvidos (metal/pele) tornem-se similares, e assim quase toda a intensidade incidente seja transmitida. Os materiais com maior eficiência são o gel hidrossolúvel e a água degaseificada, dependendo do ensaio ou da área a ser irradiada (GUIRRO e GUIRRO, 2004).

Apesar da glicerina não ter apresentado nenhuma perda da energia ultrassônica no modelo experimental proposto por Guirro e Guirro (2004) a sua não indicação como meio de acoplamento ainda deve ser mantida, por trata-se de um material no estado líquido que não

apresenta um bom contato entre o transdutor e a pele do paciente, principalmente na presença de pelos no local. Pelos resultados, mantêm-se a indicação do gel hidrossolúvel.

A intensidade acústica medida é a SATA (Space Average Time Average) que representa o quociente entre a potência acústica (W) medida e a área efetiva de radiação do transdutor (PAOLILLO, 2013). A intensidade pode variar entre 0,1 e 3,0 watts por centímetro para apresentar limites de intensidades mais compatíveis com a prática clínica, as quais variam de 0,01 a 2,0Wcm² (GUIRRO e GUIRRO, 2004).

A habilidade do ultrassom de interagir com tecidos e produzir mudanças biológicas são conhecidos há muito tempo e as vibrações produzidas por estas, causam compressão e expansão no tecido, além de produzir micromassagem e mudanças na permeabilidade das células para o cálcio e outros íons, aumento na permeabilidade vascular (AZUMA et al., 2005).

O reparo ósseo é um processo regenerativo altamente complexo, que inclui a interação de uma série de eventos, como síntese de genes e a ação de um grande número de células e proteínas, que irão restaurar a integridade do tecido ósseo (SENA et al,2005).

Segundo Duarte (1983), o ultrassom pulsado atinge o tecido por sucessão de impulsos, cada um deles resultando em um sinal elétrico como resposta do osso. Daí por diante, o processo de formação é regulado pelo campo elétrico assim formado e o metabolismo ósseo é estimulado eletricamente.

O mecanismo específico pelo qual o ultrassom pulsado de baixa intensidade acelera o reparo ósseo continua assunto de especulação científica; no entanto, em termos de mecanismos físicos, o ultrassom pode exercer uma força mecânica nas células de tecidos moles no local da fratura (LIRANI e LAZARETTI-CASTRO, 2005).

É importante ter em mente que, como um fármaco, a dose de estímulo físico é fundamental para se obter os efeitos positivos sobre a osteogênese. Os efeitos biológicos de estimulação biofísica dependem não só da duração do tempo de tratamento, mas também das características do sinal, como a intensidade, a forma de onda , a frequência e duração do sinal (MASSARI et al, 2009).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência dos tratamentos de superfície em scaffolds porosos da liga Ti6Al4V na regeneração óssea associado à técnica de ultrassom pulsado de baixa intensidade.

Dessa forma, a pesquisa foi dividida em duas etapas:

Etapa1 - A produção e caracterização dos scaffolds após tratamento de superfície. Estudo in vivo para escolha do grupo de melhor resposta após implantação. Foi realizado um estudo histomorfométrico empregando Microtomografia por Raios-X e a partir do melhor resultado realizada a segunda etapa.

Etapa2 - Essa etapa consistiu da melhor condição de resposta quantitativa do reparo ósseo determinada pelos valores adquiridos na Microtomografia por Raios-X da Etapa 1 associada à técnica de ultrassom pulsado de baixa intensidade.

A representação esquemática da metodologia empregada nas Etapas 1 e 2 pode ser visualizada nas Figuras 16 e 17, respectivamente

Figura 16 – Fluxograma da Etapa 1.

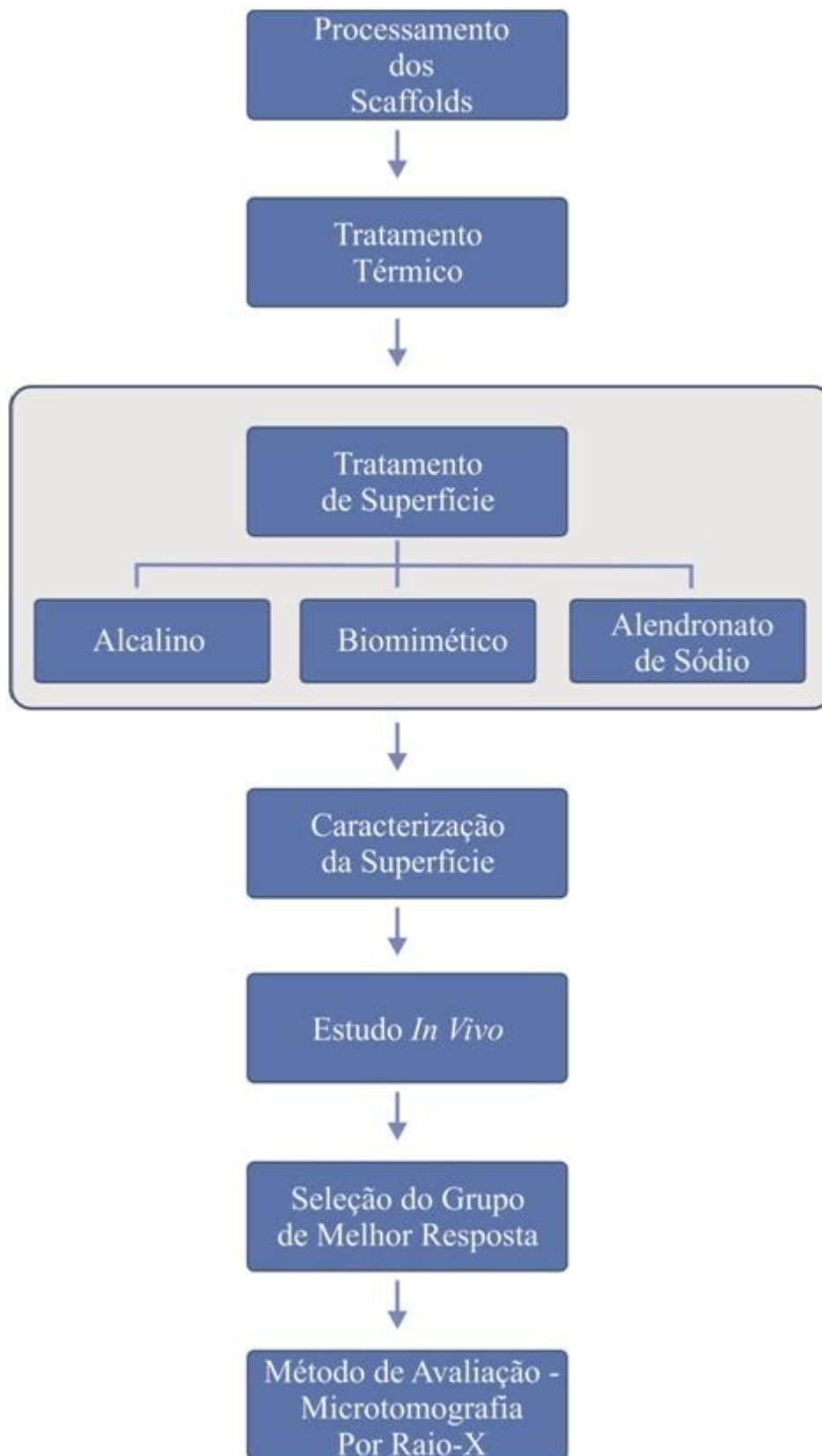
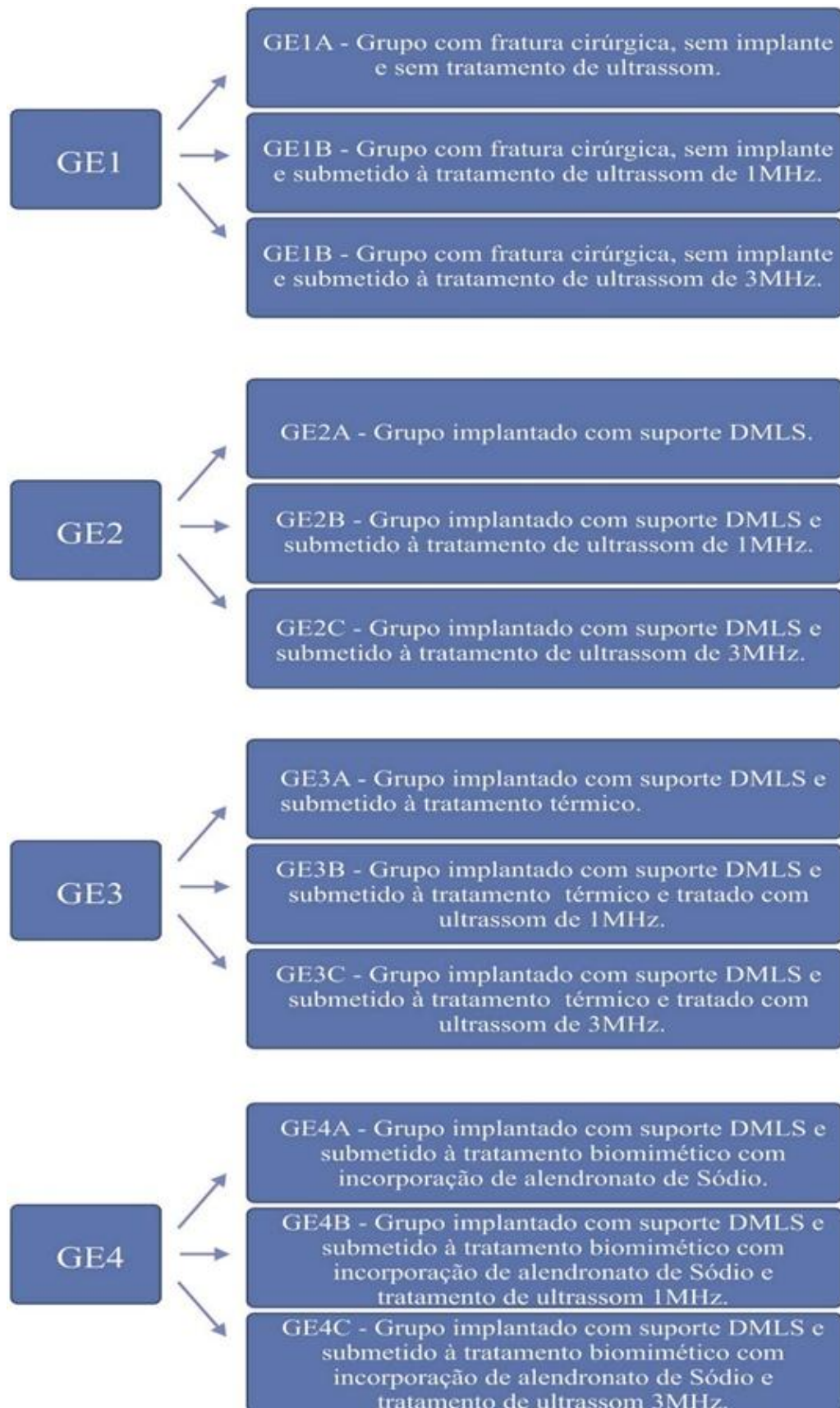


Figura 17 – Fluxograma da Etapa 2.



3.1 CONFECÇÃO DOS SCAFFOLDS

Os scaffolds porosos feitos sob medida foram confeccionados a partir do pó da liga Ti6Al4V (EOS Titanium Ti64) empregando a técnica de sinterização direta de metais por laser (DMLS - Direct Metal Laser Sintering) no equipamento (M270, EOS) no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biofabricação (Biofabris), Unicamp.

O projeto para confecção dos suportes de formato cilíndrico seguiu a mesma geometria de poros interconectados adotada por Gillot et al (2012). A Figura 18 demonstra o projeto desenvolvido pelo programa CAD 3D, com dimensões 2.5mm de diâmetro e 2.0 mm de altura com poros interconectados de diâmetro de 500µm. O equipamento de DMLS EOSINT M270 utilizado na fabricação dos suportes está representado na Figura 19.

Figura 18 - Projeto do scaffold desenvolvido pelo programa CAD 3D: (a) vista frontal da superfície do suporte e dimensão dos poros (b) vista lateral forma interconectada dos poros.

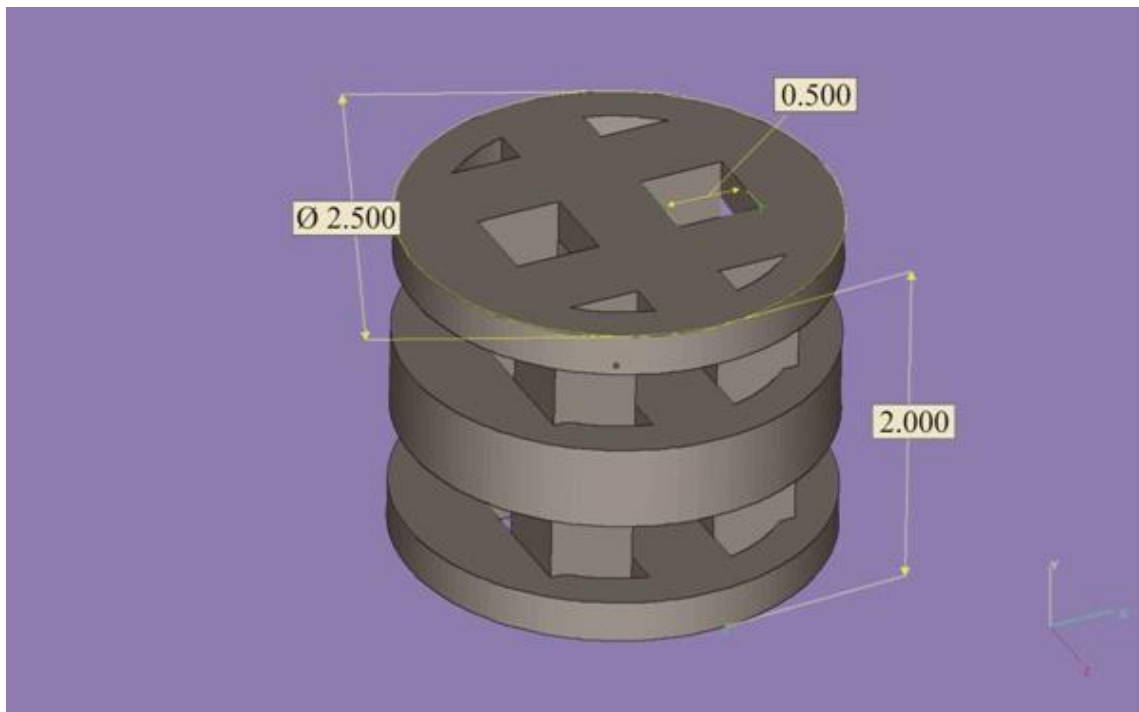


Figura 19 – Equipamento DMSL M270 do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biofabricação (Biofabris), UNICAMP. (RUIZ, 2014)



Os parâmetros escolhidos de acordo com as dimensões propostas pelo projeto estão apresentados no Quadro 06.

Quadro 06 - Parâmetros utilizados no processo de fabricação dos scaffolds.

Laser	Ytterbium
Potência do laser	170W
Velocidade de varredura	1250mm/s
Espessura da camada	30 μ m
Spot do laser	0,10mm

Para o tratamento térmico os suportes porosos foram levados ao forno tubular (Figura 19), com atmosfera inerte e submetidos à pressão negativa de 7Kgf/cm³ de gás argônio para evitar contaminação e ou oxidação das mesmas. Foram realizadas três repetições do processo de injeção do gás argônio. A programação do forno e o tempo de permanência do tratamento térmico foram de 12 horas a 1000°C, com a taxa de aquecimento de 10°C/min. O processo foi iniciado na temperatura ambiente de 20°C até atingir 1000°C.

Após 12 horas o forno desligou automaticamente e se iniciou o processo de resfriamento lento dentro do próprio forno até retornar à temperatura ambiente.

Figura 20 - Formo tubular empregado para tratamento térmico dos scaffolds de Ti6Al4V.



3.2 TRATAMENTO DA SUPERFÍCIE DOS SCAFFOLDS

Nesse estudo foram avaliados três tipos de tratamento de superfície: alcalino, biomimético e biomimético associado à imersão a alendronato de sódio.

O tratamento alcalino foi realizado a partir da imersão dos suportes em uma solução aquosa de NaOH a 10 Mol/L em um banho termostatizado a 60°C por 24h. Em seguida foram lavadas com água deionizada e colocadas na estufa a 40°C por 24 horas. Após a secagem foram submetidas ao forno à temperatura de 300°C por 1 hora.

O tratamento de superfície biomimético dos suportes foi realizado de acordo com a metodologia desenvolvida por Escada et al (2009) e Kimaid (2010). Esse tipo de tratamento consiste na associação do tratamento alcalino à imersão das amostras em solução SBF5x para precipitação da apatita. Dessa forma, após serem retiradas do forno, os suportes foram colocadas em um tubo de Falcon contendo 30ml de SBF5x, o qual foi submetido à mesa agitadora programada em 200 rpm, 36,5°C por 24 horas.

A incorporação do alendronato de sódio foi realizada a partir da associação do tratamento biomimético a uma solução formada por 30 ml de alendronato de sódio em SBF5x (4g/litro), agitadas a 40 rpm, 36,5°C por 5 dias. Após esse período os suportes foram novamente secos em estufa a 40°C por 24 horas.

A composição da solução SBF5x (Quadro 07) foi baseada no estudo de Barrere et al (2002). Os sais inorgânicos foram dissolvidos em 1000 mL de água destilada com agitação vigorosa e injeção de CO₂.

Quadro 07 - Composição do SBF5x (SimulatedBody Fluid).

Componentes	Unidades (mM)
NaCl	40
MgCl ₂ . 6H ₂ O	1,52
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,84
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	0,89
NaHCO ₃	1,76

A superfície dos suportes foram avaliadas após cada etapa empregando análise por difração de raios X (Difratômetro Empyrean, Panalytical), microscopia eletrônica de varredura (XL 30 – FEG) e ângulo de contato (Kruss, DSA 100E).

A análise feita por difração de raio-X foi realizada na Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP). As amostras foram presas a um suporte e posicionadas no equipamento de difração de raios x da (PANalytical, modelo Empyrean). Os parâmetros utilizados para análise: potência de 40Kv, corrente de 30mA, comprimento de onda do Cu α , varredura entre os ângulos 30° e 90° e velocidade angular de varredura de 0,2°/segundo.

Para obtenção de detalhes da geometria da superfície dos scaffolds, foi realizada a microscopia eletrônica de varredura utilizando o aparelho (XL30 da FEG/UNESP).

A avaliação do ângulo de contato para determinar o caráter da hidrofilicidade das superfícies analisadas foi efetuado pelo equipamento goniômetro modelo DAS 100, marca Kruss, instalado na FEG/UNESP).

3.3 ESTUDO *IN VIVO*

Os procedimentos experimentais realizados com os animais foram aprovados pelo comitê de ética para o cuidado e uso de animais experimentais de protocolo nº CEUA/08/2014 da Faculdade de Veterinária da Fundação Educacional Dom André Arcoverde da cidade de Valença – RJ.

3.3.1 Seleção dos Animais

A seleção de um modelo para teste *in vivo* de biocompatibilidade de determinado biomaterial deve considerar a similaridade das respostas de cura e remodelação do local de teste com o local previsto para aplicação final no homem. É preciso definir critérios para seleção do modelo animal específico. A seleção das espécies é baseada no tamanho do implante e duração do teste em relação à expectativa de vida do animal (ORÉFICE et al, 2006).

Alguns questionamentos surgem quando os animais são usados como modelos biológicos de doenças humanas. Ratos e todos os outros modelos animais podem ser aplicáveis nas representações humanas, desde que não sejam vistos simplesmente como miniaturas de pessoas. Diferenças anatômicas, fisiológicas e de desenvolvimento biológico devem ser levadas em considerações quando se analisa o resultado de um experimento no qual a idade é um fator crucial. A comparação entre os ciclos de vida, tais como, período de amamentação, puberdade, adolescência, fase adulta e envelhecimento são considerações de acordo com a finalidade de cada experimento (QUINN, 2005).

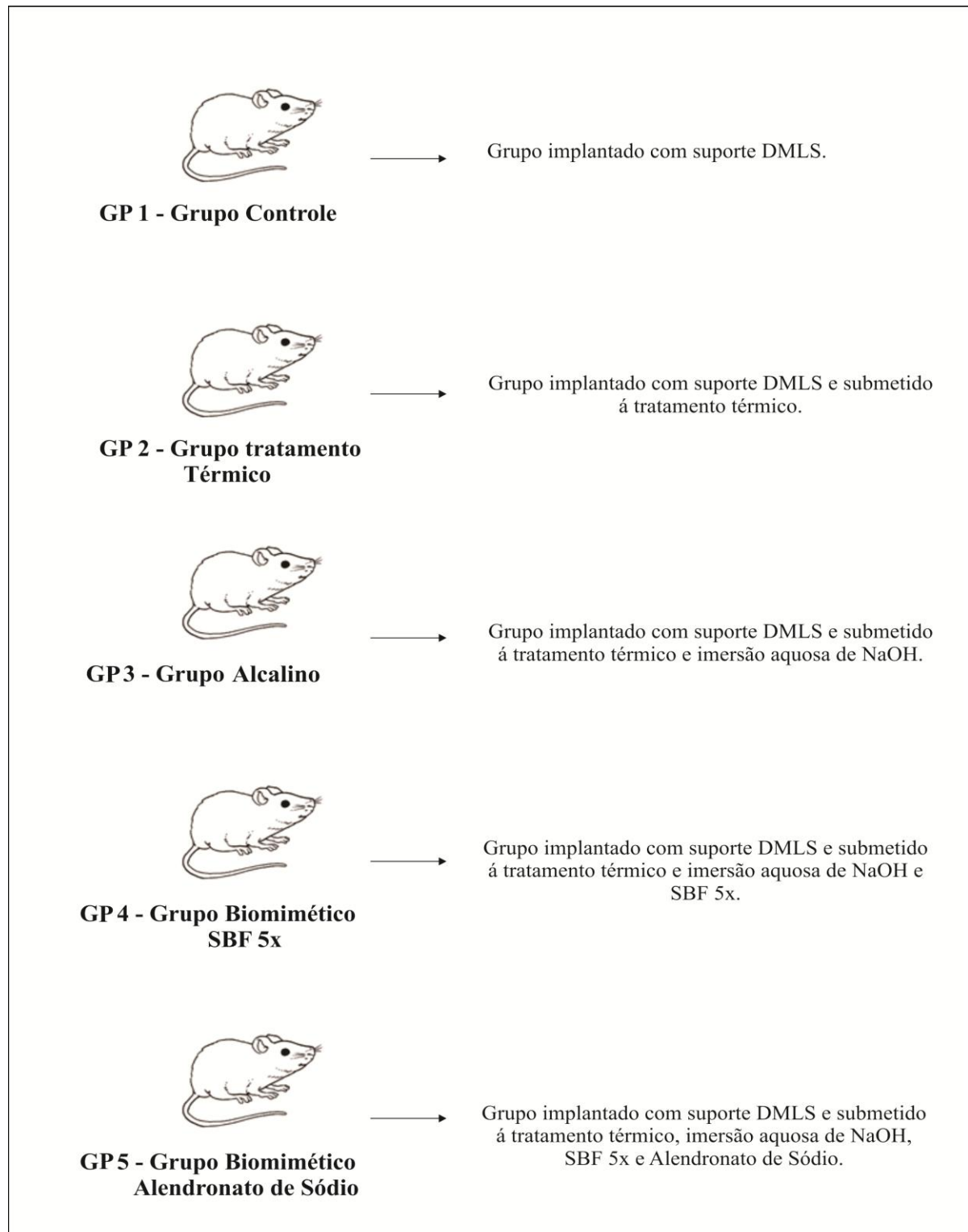
No presente estudo, para selecionar a idade da amostra usada, a referência utilizada foi à fase de maturação sexual, alcançada na puberdade. Os ratos tornam-se sexualmente maduros aproximadamente com 50 dias de idade e no humano a maturidade é aproximadamente aos 11 anos e meio (QUINN, 2005).

Para esse estudo, foram selecionados animais com 12 semanas o que equivale em maturidade sexual a um homem com idade média de 23 anos.

Nos experimentos *in vivo* foram utilizados 85 ratos machos da linhagem Wistar, com peso corporal entre 350 a 400g divididos em dois grupos experimentais com cinco animais em cada subgrupo pertencente a cada grupo em estudo, de acordo com as etapas descritas nas Figuras 16 e 17.

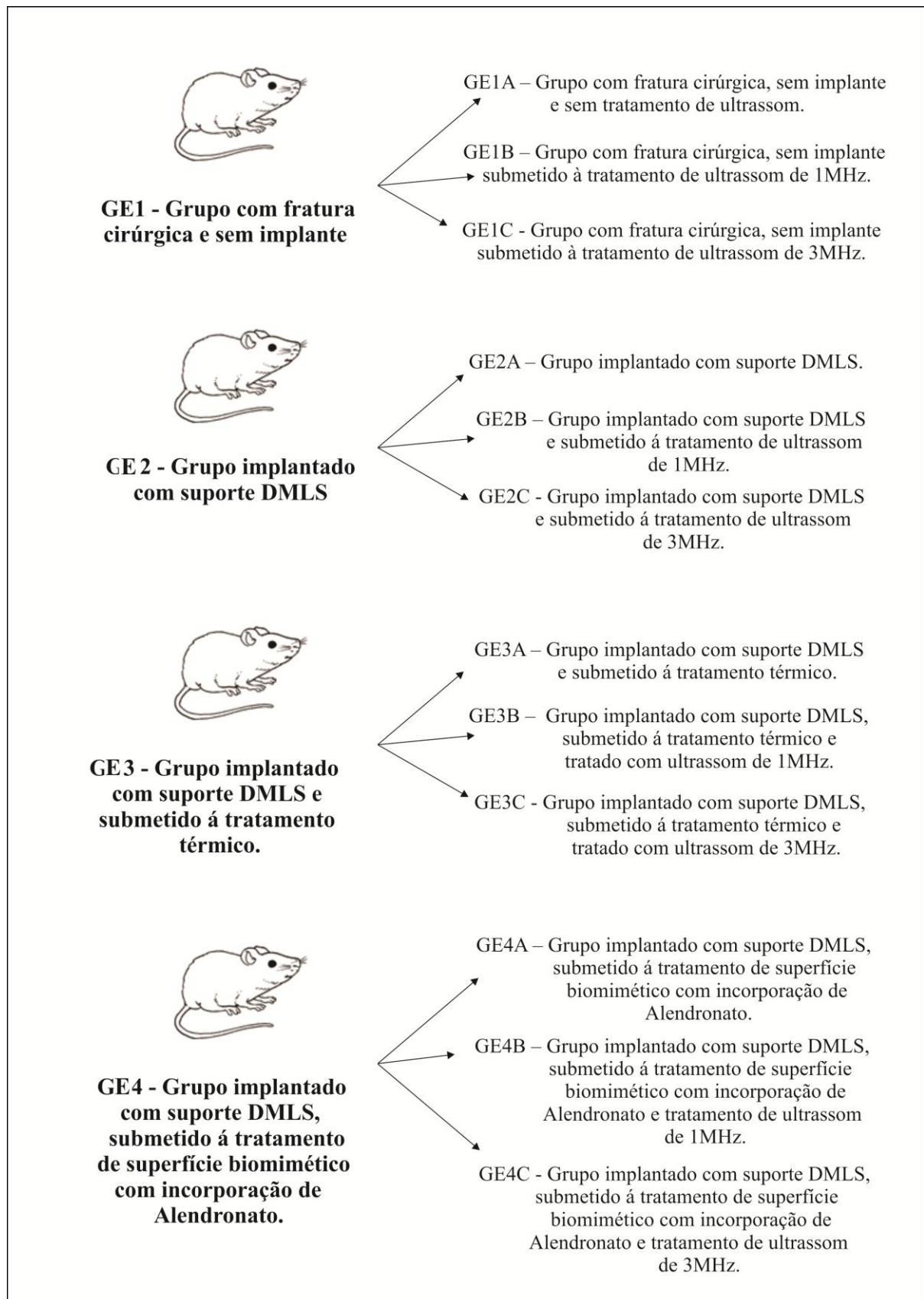
O primeiro grupo denominado Grupo Piloto (GP) foi dividido em 5 subgrupos e nomeados de acordo com as fases do tratamento de superfície, para avaliar o grupo de melhor resposta de reparo ósseo. Grupo 1 (GP1) – Grupo Controle (suportes produzidos DMLS); Grupo 2 (GP2) – suporte DMLS submetida a tratamento térmico; Grupo 3 (GP3) - suporte DMLS e submetida a tratamento alcalino; Grupo 4 (GP4) – suporte DMLS e submetida a tratamento alcalino com posterior imersão em solução SBF 5x; Grupo 5 (GP5) – suporte DMLS e submetida a tratamento alcalino com posterior imersão em solução formada por SBF 5x e alendronato de sódio. O Grupo Piloto é esquematizado na Figura 21.

Figura 21 - Grupo Piloto (GP)



O segundo grupo experimental foi dividido em 4 subgrupos e nomeados de acordo com o tipo de fratura, tipo de implante e tipo de tratamento pós-cirúrgico com aplicações de ultrassom de baixa intensidade de frequência de 1MHz e 3MHz. A Figura 22 descreve a divisão dos grupos e seus respectivos subgrupos: G1E - Grupo com fratura cirúrgica e sem implante; G2E - Grupo com implantado com suporte DMLS; G3E - Grupo Implantado com suporte submetido a tratamento térmico; G4E - Grupo Implantado com suporte submetido ao tratamento biomimético e incorporação de alendronato de sódio.

Figura 22 – Grupo Experimental.



3.4 PROCEDIMENTO CIRURGICO

O procedimento anestésico foi de acordo com o peso corporal de cada animal selecionado, por meio de uma injeção intraperitoneal de um coquetel de Ketamina(0,1ml/100g) e Xylazina (0,1ml/100g) onde cada animal foi devidamente pesado e assim anestesiado. Após anestesia, foi realizada a tricotomia (raspagem do pêlo da superfície anterior da tíbia direita, local da cirurgia) e a assepsia da pele feita com álcool 70% visualizado na Figura 23.

Figura 23 – Tricotomia da tíbia direita do animal.

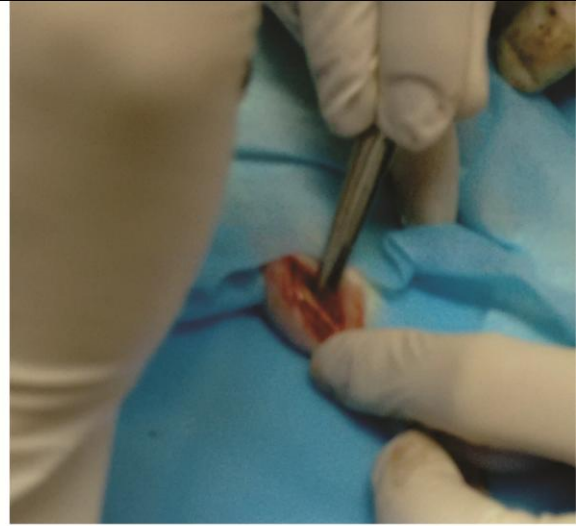


Procedimento cirúrgico (Figura 24): Uma incisão longitudinal de 50 mm de comprimento foi feita ao longo da porção anterior da tíbia (Figura 24a). Os músculos foram afastados (Figura 24b) para que a osteotomia fosse realizada a partir de uma broca de 2mm de baixa rotação (Figura 24c). A área da fratura foi irrigada constantemente por soro fisiológico até a colocação do Scaffold (Figura 24d). No grupo controle foi efetuado apenas o defeito ósseo cirúrgico sem implante (Figura 24e). Após a fratura e colocação do implante (Figura 24f), os músculos foram reaproximados por sutura realizada por fio de Nylon monofilamento preto TECHNOFIO 3-0, não absorvível (Figura 24g). Uma pomada a base de Sulfato de neomicina 5mg/g, bacitracina zíncica 250UI/g foi aplicada em cada amostra até o sétimo dia, respeitando o período da fase inflamatória do reparo tecidual (Figura 24h).

Figura 24 - Sequência do procedimento cirúrgico.



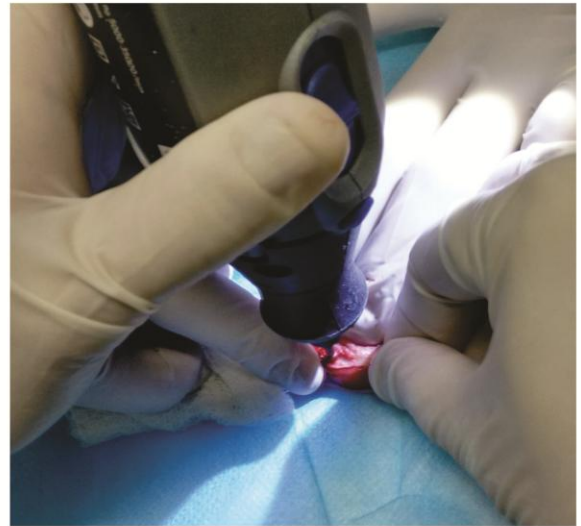
(a)



(b)



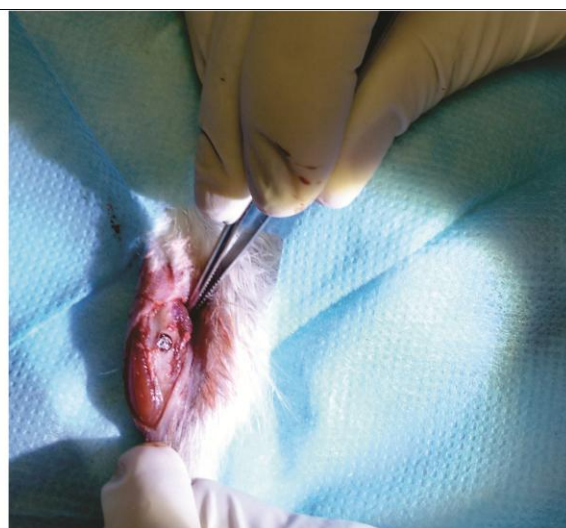
(c)



(d)



(e)



(f)



(g)



(h)

Os animais foram alojados no Biotério CESVA/ Fundação Educacional Dom André Arcoverde na cidade de Valença (RJ) em ambiente controlado (ciclo claro/escuro 12/12 horas), temperatura controlada de 21°C. Os grupos de estudo foram mantidos em gaiolas de polipropileno padrão, devidamente sinalizados por seus respectivos grupos, com ração comercial própria, água à vontade e forragem higienizada (Figura 25).

Figura 25 - Alojamento no Biotério.



3.5 TRATAMENTO DE ULTRASSOM TERAPEUTICO

Após 24 h do ato cirúrgico, os grupos que foram submetidos ao tratamento associado de ultrassom terapêutico (US), iniciaram suas aplicações subsequentes no intervalo de 48h em 48h até completar 15 sessões terapêuticas. Para isso foi utilizado o US de modelo IBRAMED, SONOPULSE DIAMOND LINE com a transmissão no modo pulsado nas frequências de 1Mhz e 3Mhz, ciclo 1:5 e intensidade SATA 30mW/cm² e tempo de aplicação de 10 minutos com gel sobre a pele tricomizada na região fraturada em modo não estacionário.

A calibração do equipamento de ultrassom terapêutico foi realizada em uma balança de radiação acústica Ultrasound Power Meter UPM-DT-1 (Ohmic Instruments, EUA) nos laboratórios do Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia –USP em São Carlos- SP.

Para a imobilização dos animais durante as aplicações de ultrassom, foi empregado um dispositivo de tubo de PVC com tampa perfurada que permitiu a respiração do animal, como observado na Figura 26.

Figura 26 – Método de imobilização do animal: (a, b) Dispositivo de imobilização de tubo de PVC (a, b); Forma de aplicação de ultrassom terapêutico no animal (c, d).



(a)



(b)



(c)

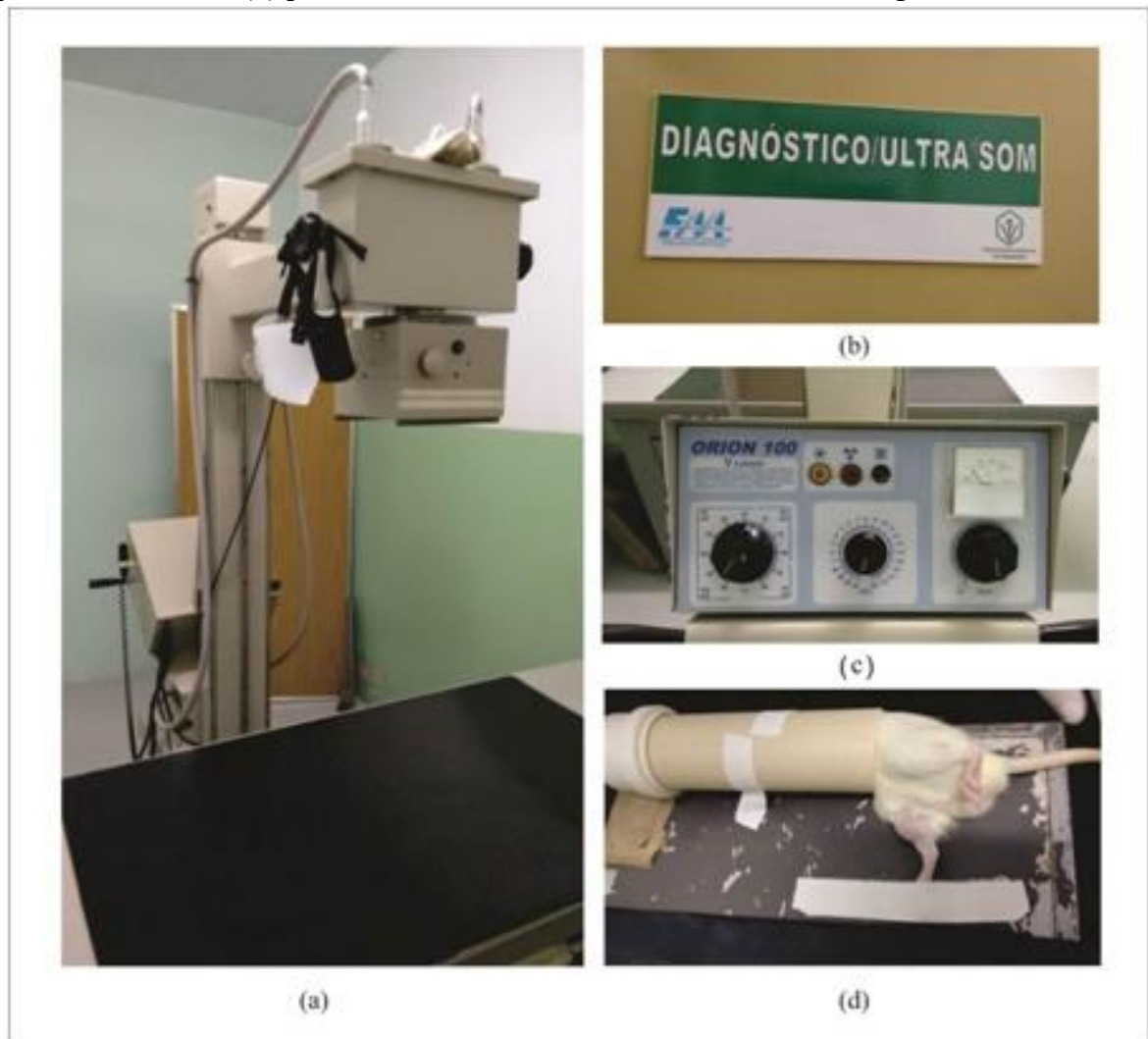


(d)

3.6 ACOMPANHAMENTO RADIOGRÁFICO

As imagens radiográficas foram realizadas com a finalidade de acompanhamento qualitativo do processo de reparo tecidual e ósseo. Executadas no sétimo dia após a fratura (fase inflamatória), décimo quarto dia (fase proliferativa) e vigésimo primeiro dia (fase reparatória) para acompanhamento da formação do calo ósseo. As aquisições radiográficas foram realizadas na policlínica de veterinária da fundação Dom André Arco Verde – Valença RJ, pelo aparelho Modelo ORION 100 (Figura 27).

Figura 27 - Acompanhamento radiográfico do processo de formação do calo ósseo: (a) posicionamento da mesa de registro; (b) identificação do setor de radiologia; (c) modelo do aparelho de Raio X; (d) posicionamento do animal no momento da radiografia.



3.7 EUTANÁSIA E COLETA DAS AMOSTRAS

A eutanásia dos animais ocorreu após 30 dias do ato cirúrgico e foi realizada através de overdose do anestésico tiopental sódico 1,0g pó estéril, diluído em 10 ml de água destilada, formando uma solução 0,1g/ml. Foi ministrado em cada animal, por via intraperitoneal, a dosagem de 1,0 ml. Após a eutanásia foi realizada a retirada da tíbia direita e seu armazenamento em um tubo contendo formalina 10%, esquematizada nas Figuras 28 (a e b).

Figura 28 – Coleta das amostras tratadas.



(a)



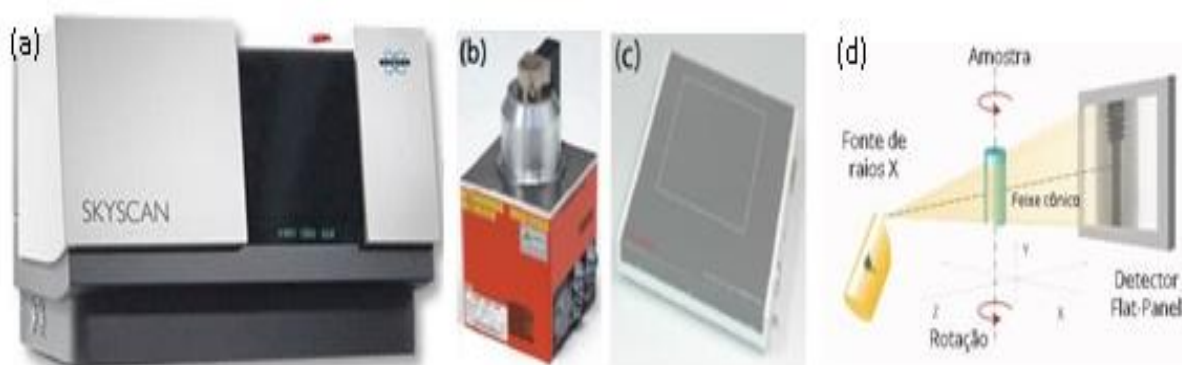
(b)

3.8 MICROTOMOGRAFIA POR RAIOS X (μ CT)

Para análise das amostras, as aquisições foram feitas utilizando um microtomógrafo Skyscan Modelo 1173 do Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN) do Programa de Engenharia Nuclear PEN/COPPE da UFRJ.

A Figura 29 esquematiza o equipamento que possui um tubo de raios X microfocado com anodo de tungstênio, tamanho focal menor que $5\mu\text{m}$ e potência máxima de 8W e trabalha com energias variando entre 40 e 130kV. Utiliza um detector do tipo “flatpanel” de matriz 2240X2240 pixels, com o tamanho de cada pixel de $50\mu\text{m}$ e 12bits de range dinâmico, com a possibilidade de fazer aquisição de objetos com até 140 mm de diâmetro e 200 mm de comprimento.

Figura 29 – (a) Microtomógrafo SKYSCAN 1173; (b) tubo de raios X microfocos; (c) detector flat-Panel; (d) esquema simplificado da geometria de feixe cônico (Kalender, 2011).



Para definir os parâmetros de aquisição do escaneamento microtomográfico foram realizados testes determinando os valores compatíveis com o objetivo da pesquisa.

Na aquisição das imagens as amostras foram colocadas em um suporte de acrílico e fixadas dentro do equipamento para evitar movimentação durante essa etapa.

A relação das condições de aquisição utilizada nesta metodologia está descrita no Quadro 08.

Quadro 08 – Condições de aquisição utilizados no presente estudo.

Parâmetros de Aquisição	
Tensão	60 kV
Corrente	133 μ A
Matriz do Detector (Matriz)	2240 x 2240
Tamanho de pixel	14,96 μ m
Filtro	Al 1,0 mm
Exposição	1000 ms
Passo angular	0,5 grau
Número de Frames	3
Rotação	360°
Tempo de Escaneamento Médio	00:49:47

A energia do sistema (kV) está relacionada com a capacidade da radiação atravessar uma determinada amostra. A escolha adequada da energia da radiação influencia diretamente no contraste e na qualidade da imagem final.

A corrente (μ A) é proporcional ao número de fótons de raios X que saem da fonte em direção a amostra e o detector. Quanto maior a corrente, maior o número de dados estatísticos.

A matriz do detector está relacionada a qualidade da imagem e sua resolução. Permite a obtenção de informações mais detalhadas, ou seja, uma maior resolução da imagem final da amostra. O tamanho da matriz selecionado permite informações mais detalhadas.

O tamanho de pixel está diretamente conectado a resolução espacial do sistema e representa a capacidade de diferenciar todos os objetos, as menores estruturas, ou menor separação entre os objetos. Os filtros metálicos são usados para absorver os fótons de baixa energia, aumentando a energia efetiva do espectro do feixe de raios X, e reduzindo a intensidade de artefatos. O passo angular é o ângulo entre cada projeção adquirida.

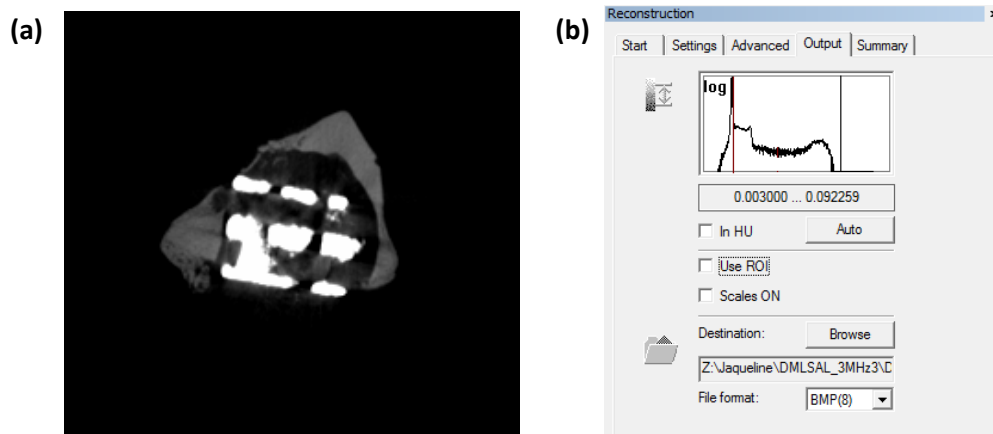
O número de quadros (frames) remete ao número de imagens que compõem cada projeção obtida. Foram realizados três frames, que remetem ao número de imagens que compõe em cada projeção.

3.8.1 Processo de Reconstrução

As reconstruções das projeções foram feitas com o programa NRecon da SkyScan (versão 1.6.4.1) utilizado para reconstruir seções transversais de imagens a partir de imagens de projeções da tomografia. A técnica amplamente utilizada é baseada no algoritmo de Feldkamp (FDK).

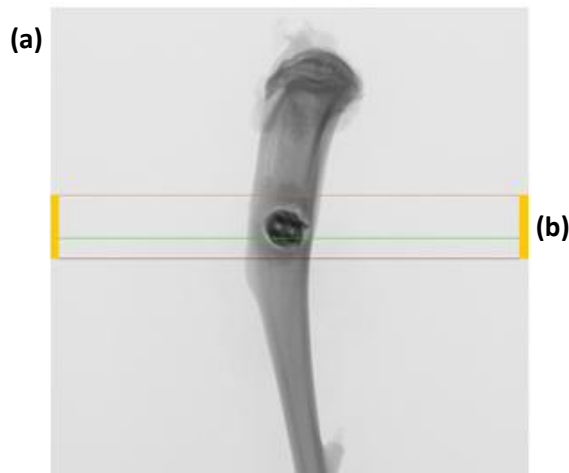
Foram estabelecidos os valores de mínimo e de máximo do histograma de distribuição do coeficiente de atenuação. Ao determinar esses valores, o menor valor foi convertido para tons de cinza com valor igual a 0 (zero) e o valor acima do valor máximo convertido para tons de cinza com valor igual a 255, que é o valor máximo de tons. Esse processo pode ser visto na Figura 30.

Figura 30 – Reconstrução das projeções e histograma das imagens da microtomografia: (a) Pré-visualização de uma fatia transversal da amostra; (b) histograma para coeficiente de atenuação.



O software permite fazer algumas correções em relação a possíveis artefatos antes da reconstrução das projeções com a função “Fine-Tuning” na Figura 31 onde é possível ajustar um parâmetro de cada vez.

Figura 31 – (a) Projeção; (b) Parâmetros de Correções “Fine-Tuning”.



Os principais parâmetros de correções no processo de reconstrução:

Desalinhamento (Misalignment Compensation), compensar possíveis desalinhamentos durante a aquisição de imagens, entre uma projeção e sua correspondente a 180° de deslocamento angular, evitando sombras.

A correção de endurecimento de Feixe (Beam Hardening Correction), corrige a variação da atenuação das bordas da imagem em relação ao centro devido a absorção diferenciada da radiação de baixa energia. A utilização de filtros físicos na saída do feixe de raios X também auxiliam na correção desse parâmetro de endurecimento de feixe. Nesse estudo o filtro usado foi de Al.

Correção de Artefatos de Anel (Ring Artifacts Correction) diminui ou elimina a intensidade dos artefatos em forma de anéis concêntricos que surgem devido as diferenças de sensibilidade dos pixels do detector flat-panel.

A imagem tomográfica representa indiretamente o coeficiente de atenuação do material que compõe o objeto avaliado. Uma questão central que gira em torno da qualidade da imagem, o quão fiel é a imagem ao reproduzir o objeto tomografado. As projeções reconstruídas foram salvas como arquivos 8 bits em formato *.BMP.

No Quadro 09 os parâmetros utilizados na reconstrução bem como as correções em artefatos de imagem.

Quadro 09 - Parâmetros de correção utilizados no processo de reconstrução de imagens microtomográficas.

Parâmetros de Reconstrução	
Reconstrução por Fatia	0,32s
Tempo Total de Reconstrução	98s
Tipo de Arquivo	BMP
Suavização (Smoothing)	1
Desalinhamento (MisalignmentCompensation)	0
Correção de Artefatos de Anel (RingArtifactsCorrection)	4
Correção de endurecimento de Feixe (BeamHardeningCorrection)	35%

3.8.2 Parâmetros Analisados na Microtomografia

Após as reconstruções foram realizadas as análises quantitativas. Nesse sentido foi empregado o software CTAn®1.13.5.1, desenvolvido e comercializado pelo próprio fabricante do equipamento de microCT que permite quantificar os parâmetros referentes às imagens.

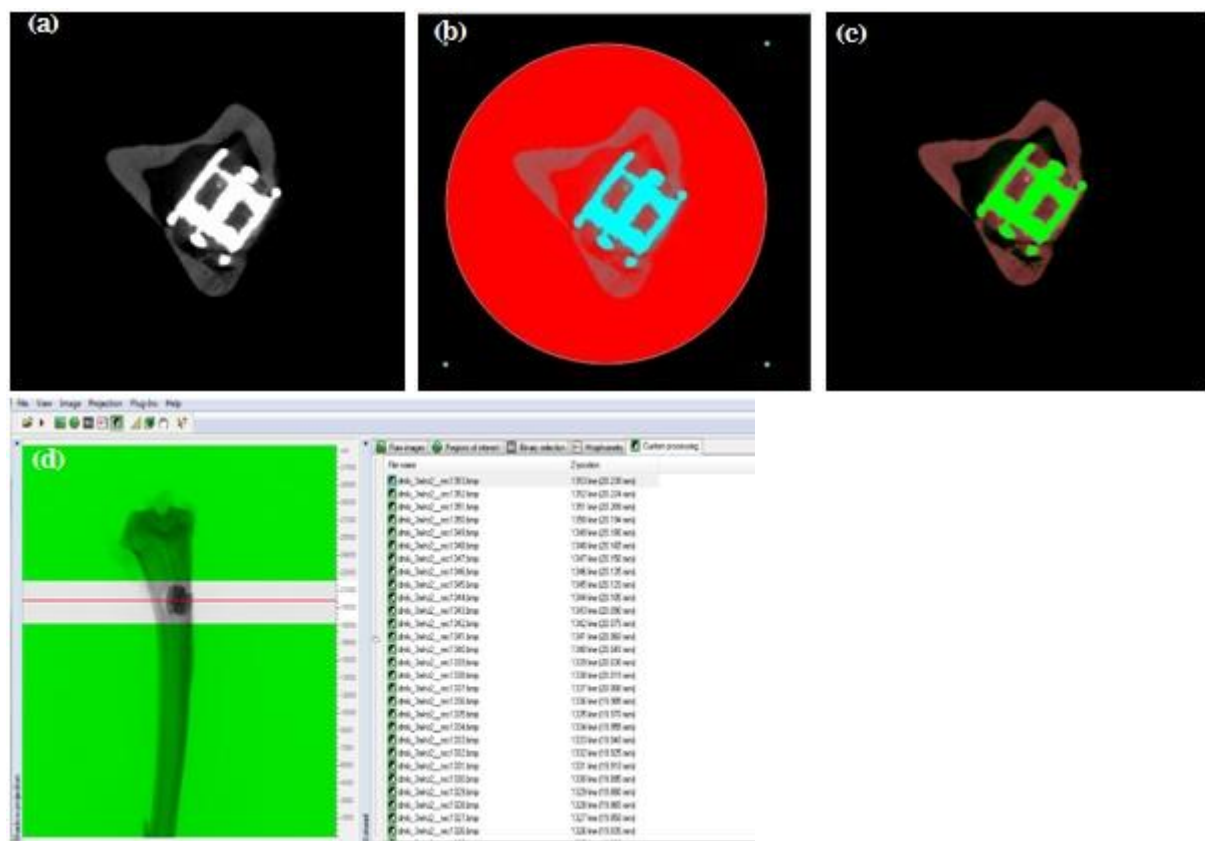
Para quantificação das imagens de microCT é primordial determinar um Região de Interesse (ROI) que neste estudo se refere a uma fatia transversal enquanto que o volume de interesse (VOI) se refere à soma de todas as fatias transversais representando um volume, sendo a partir desse determinado volume que as avaliações foram feitas (Manual SKYSCAN 1173b, 2013).

O uso do software costuma seguir uma ordem de procedimentos, o primeiro passo é definir a região de interesse que será analisada e processada pelo software. Após definidas a área e o volume para quantificação é realizada uma binarização ou segmentação das estruturas de interesse, sejam elas os poros, matriz da amostra ou estruturas de diferentes densidades.

Em seguida é realizada a quantificação dos parâmetros segmentados, obtendo-se, por exemplo, a porosidade da amostra e a distribuição de tamanho de poros.

O CTAn foi utilizado neste trabalho para viabilizar as avaliações quantitativas microestruturais do processo de reparo da fratura entre os scaffolds porosos de Ti6Al4V e a estrutura óssea. O processo de segmentação pode ser visto na Figura 32.

Figura 32 - Esquema para análise quantitativa microestrutural do reparo da fratura: (a) projeção 1353; (b) Em vermelho a ROI determinada; (c) segmentação da amostra para quantificação; (d) Seleção de 250 fatias de projeção para compor o VOI.



Para realizar a quantificação morfológica das amostras, foi determinada a região de interesse (ROI) da diáfise da tíbia dos ratos, com esse propósito foram selecionados 250 fatias dessa região. A microarquitetura trabecular foram adquiridas a partir dos parâmetros microtomográficos determinados para análise da regeneração óssea. No Quadro 10 são apresentados os parâmetros que foram considerados neste estudo, seu significado em análises ósseas, siglas e unidades:

Quadro 10 - Parâmetros microtomográficos determinados para análise da regeneração óssea.

Parâmetros	Notação	Unidade
Volume da amostra	TV	mm ³
Volume Ósseo da amostra	BV	mm ³
Razão entre o volume ósseo e o volume da amostra	BV/TV	%
Fator Padrão Trabecular	Tb.Pf	1/mm
Conectividade	Conn	
Porosidade		%
Espaçamento entre as trabéculas	Tb.Th	Mm
Número Trabecular	Tb.N	1/mm
Separação Trabecular	Tb.Sp	Mm

3.9 ANÁLISE HISTOLÓGICA

As lâminas para a análise histomorfológicas foram realizadas em laboratório terceirizado e executadas nas seguintes etapas:

GE1. Grupo experimental sem implante - O processamento de descalcificação óssea iniciou-se em solução de ácido nítrico 5%, com observações periódicas de 4h em 4h até que a descalcificação final da amostra. Após a descalcificação foi efetuada a desidratação por imersão em álcool com concentrações gradativas de 70%, 80%, 90%, 100% e 100% no tempo de imersão de 1h para cada concentração para que não ocorra lesão tecidual. Em seguida, a diafanização (clareificação) da amostra em imersão em xilol, em três repetições por 40 minutos completando todo processo de desidratação e o favorecimento da infiltração da parafina. O processo de impregnação com parafina foi realizado à temperatura de 60°C em estufa, em três banhos no tempo de 30 minutos. O calor causa a evaporação do solvente

orgânico e os espaços existentes dentro dos tecidos ficam preenchidos com parafina. A inclusão é processada utilizando o dispensador de parafina e formando os blocos. A microtomia promoveu a confecção de lâminas histológica de 10µm, coradas em hematoxilina e eosina (HE).

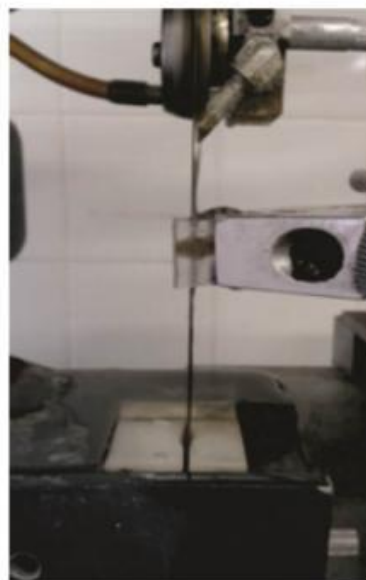
GE2, GE3 e GE4 - Para os fragmentos de osso contendo os implantes são fixados, desidratados e incluídos em resina metilmetacrilato para serem cortados. As peças ósseas foram fixadas em formol 10% por 3 dias. Para a desidratação as amostras foram mergulhadas gradativamente em álcool 70% por 24hs; em álcool 95 % por 24hs; álcool 100 % (I) por 24hs; 100 % (II) por 48hs; 100 % (III) por 56hs. As amostras foram bem desidratadas para melhor penetração da resina. A diafanização se processou através da imersão em Xilol (I) por 24hs e em xilol (II) por 48hs. A inclusão em resina foi realizada mergulhando as amostras ósseas num frasco de vidro com tampa de aproximadamente 20 ml. O frasco serviu somente como molde para a resina. Portanto, depois de polimerizada, o vidro foi quebrado para obtenção do bloco endurecido.

A microtomia produziu cortes de 10µm nos blocos de resina no equipamento com fita de tungstênio que foram colados com éster de cianoacrilato (SuperBonder) em lâminas de acrílico incolor e transparente. A Figura 33 ilustra os blocos de resina, o equipamento de microtomia e as laminas adquiridas.

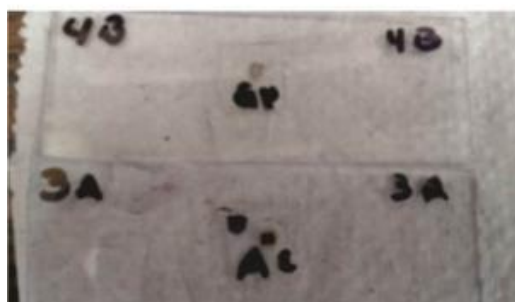
Figura 33 – Produção das lâminas histológicas: (a) Bloco de resina; (b) Equipamento de microtomia; (c) lâminas adquiridas.



(a)



(b)



(c)

A coloração utilizada foi Azul de Stevenels e Alizarina Red S31. Essa técnica promove excelentes detalhes celulares para se estudar a interface do osso com o implante metálico. A Alizarina red S cora especificamente o cálcio nos tecidos mineralizados, entretanto, os demais tecidos permanecem corados pelo azul de Stevenels que evidenciam células e estruturas extracelulares.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O programa estatístico utilizado foi Graph Prisma 6. Considerou-se em todas as análises um nível de 5% (valor $\alpha = 0,05$) de significância estatística. Para comparação entre as médias dos grupos, foi utilizado teste não paramétrico, análise de variância (One-way – ANOVA) e o pós teste Holm-Sidak's.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

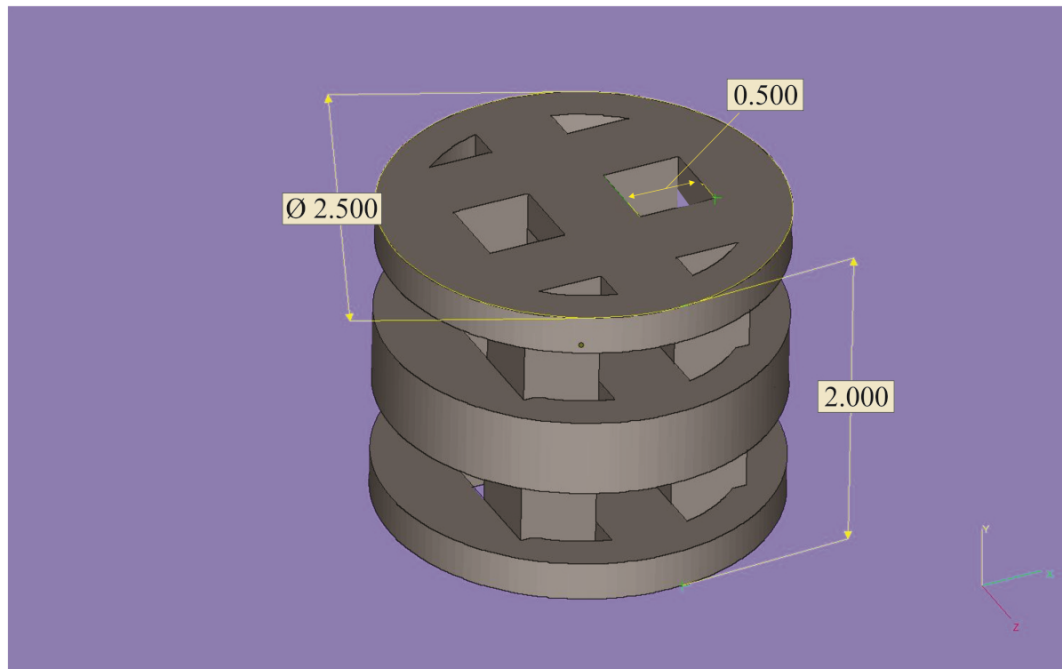
4.1. CARACTERIZAÇÃO DOS SCAFFOLDS APÓS PROCESSAMENTO

Nesse estudo scaffolds foram feitos sob medida empregando a técnica de sinterização a laser (DMLS) a partir do modelo CAD 3D (Fig.34a). Na figura 34b é possível observar as imagens dos scaffolds obtidas por microtomografia. O tamanho médio dos poros dos poros foi de 500 μ m sendo observada de Ti6Al4V feitos sob medida empregando a técnica de sinterização a laser (DMLS). Os poros apresentaram o diâmetro médio de 500 μ m (Fig 34c) sendo observada uma interconectividade 3D na estrutura porosa.

Na Figura 35 é possível observar as imagens obtidas em microscópio eletrônico para as amostras processadas por sinterização a laser (DMLS). A análise da superfície por EDS dos scaffolds após a sinterização mostrou picos de Ti, Al e V , característicos da liga Ti6Al4V empregada no processamento. No entanto, picos dos elementos Fe, Na, Cl, Si, Ca também foram observados (Figura 35 c).

O tratamento térmico a 1000 °C realizado após a obtenção dos scaffolds promoveu uma fusão parcial das partículas processadas (Fig 36 a e b) além de um refinamento na composição química sendo verificado na análise EDS apenas os picos característicos da liga, ou seja, Ti, Al e V. Uma mudança no aspecto e tamanho das partículas, além da colascência entre elas também pode ser verificado.

Figura 34 – Imagem do modelo CAD 3D e microCT do scaffold.



(a)



(b)

Figura 35 – (a) (b) Aspecto da superfície dos scaffolds após processamento, superfície sem tratamento (menor e maior aumento); (c) mapa EDS

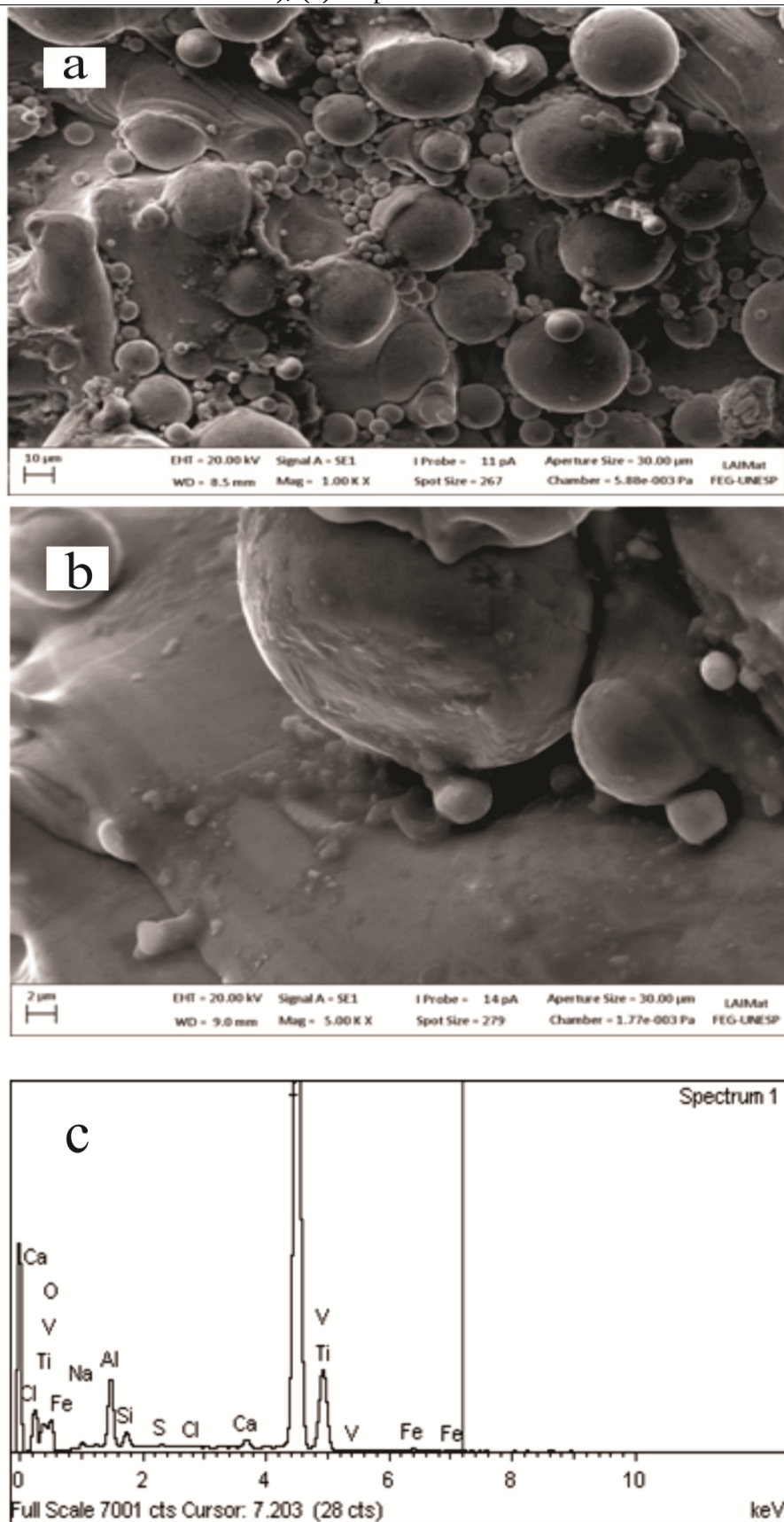
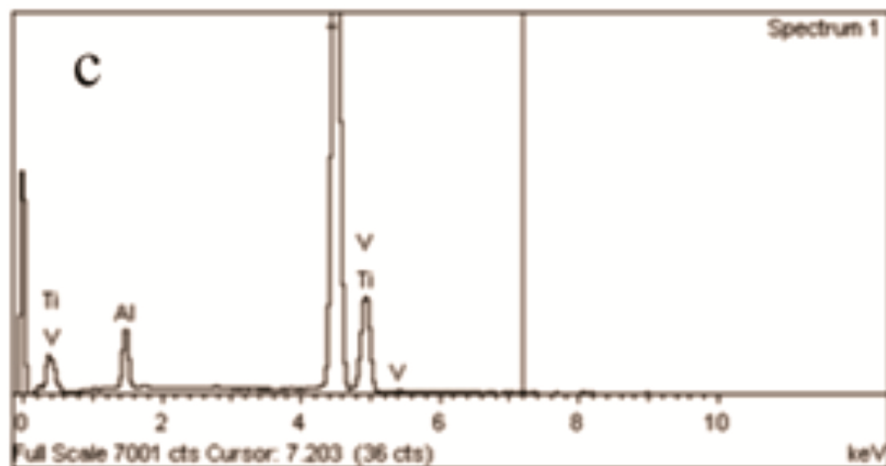
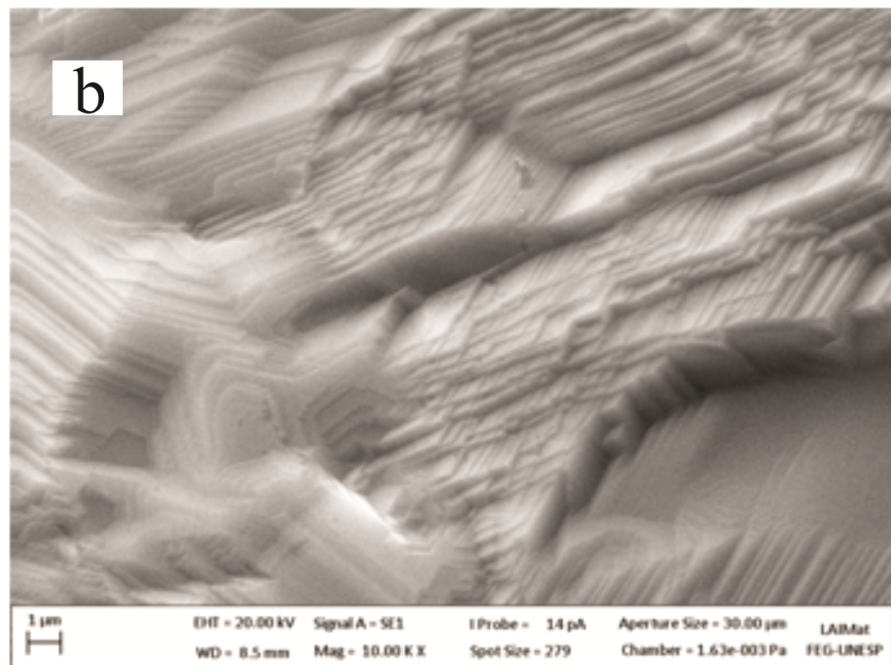
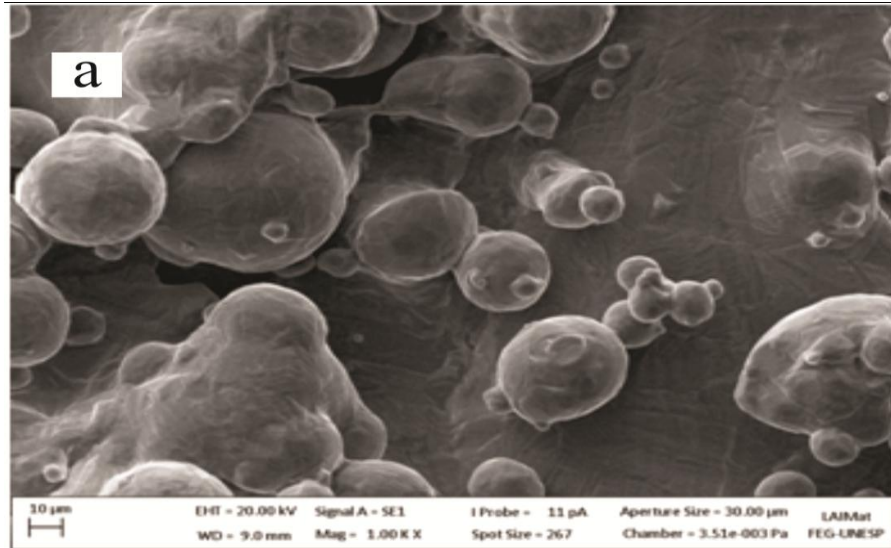


Figura 36– (a) (b) Aspecto da superfície dos scaffolds após processamento e tratamento térmico (menor e maior aumento); (c) mapa EDS



4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS SCAFFOLDS APÓS TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE

Para promover uma interação química do scaffold com o osso após implantação foram testados três tipos de tratamento de superfície: alcalino, biomimético e imobilização de alendronato de sódio após imersão em SBF5x. Esses tratamentos foram estudados anteriormente pelo nosso grupo e também por outros pesquisadores. O tratamento alcalino foi preconizado por Kokubo et al. (1996) e permite a obtenção de uma superfície porosa e bioativa a partir da imersão do titânio e suas ligas em solução NaOH. O aspecto da superfície dos scaffolds após o tratamento alcalino pode ser observado na Figura 37, aonde é possível observar sua homogeneidade. As imagens em maior aumento permitem verificar a obtenção de uma superfície porosa conforme verificada em estudos anteriores do grupo para as ligas Ti-7,5Mo (ESCADA et al.2010) e Ti30Ta (CAPELLATO et al. 2014). A análise por EDS revelou picos de Na, além de Ti, Al, V e O (Fig 37c) o que já era esperado após a realização desse tratamento.

A imersão dos scaffolds em solução SBF levou a formação de apatita na superfície conforme na Figura 38. A análise em EDS confirmou a presença dos elementos fósforo e cálcio evidenciando a formação da apatita (Figura 38 c)

A solução SBF preconizada por Kokubo et al. (1996) foi desenvolvida para avaliar a bioatividade de ligas de titânio após tratamento alcalino. No entanto, estudos anteriores desenvolvidos pelo nosso grupo mostraram que a inserção de implantes em animais após tratamento biomimético resulta em um aumento da osseointegração (ALVES CLARO et al. 2012), além de permitir a incorporação de medicamentos por solução química.

Nesse trabalho a imobilização de alendronato, no entanto, levou a uma dissolução da camada formada conforme observado na Figura 39. A análise do EDS (Tabela 1) evidenciou o efeito deletério do alendronato com um aumento de teor de fósforo e diminuição do teor de cálcio. Resultado similar foi verificado por KIM et al. (2010) após a imersão de amostras contendo apatita.

Figura 37 – (a) (b) Aspecto da superfície dos scaffolds após tratamento alcalino (menor e maior aumento); (c) mapa EDS

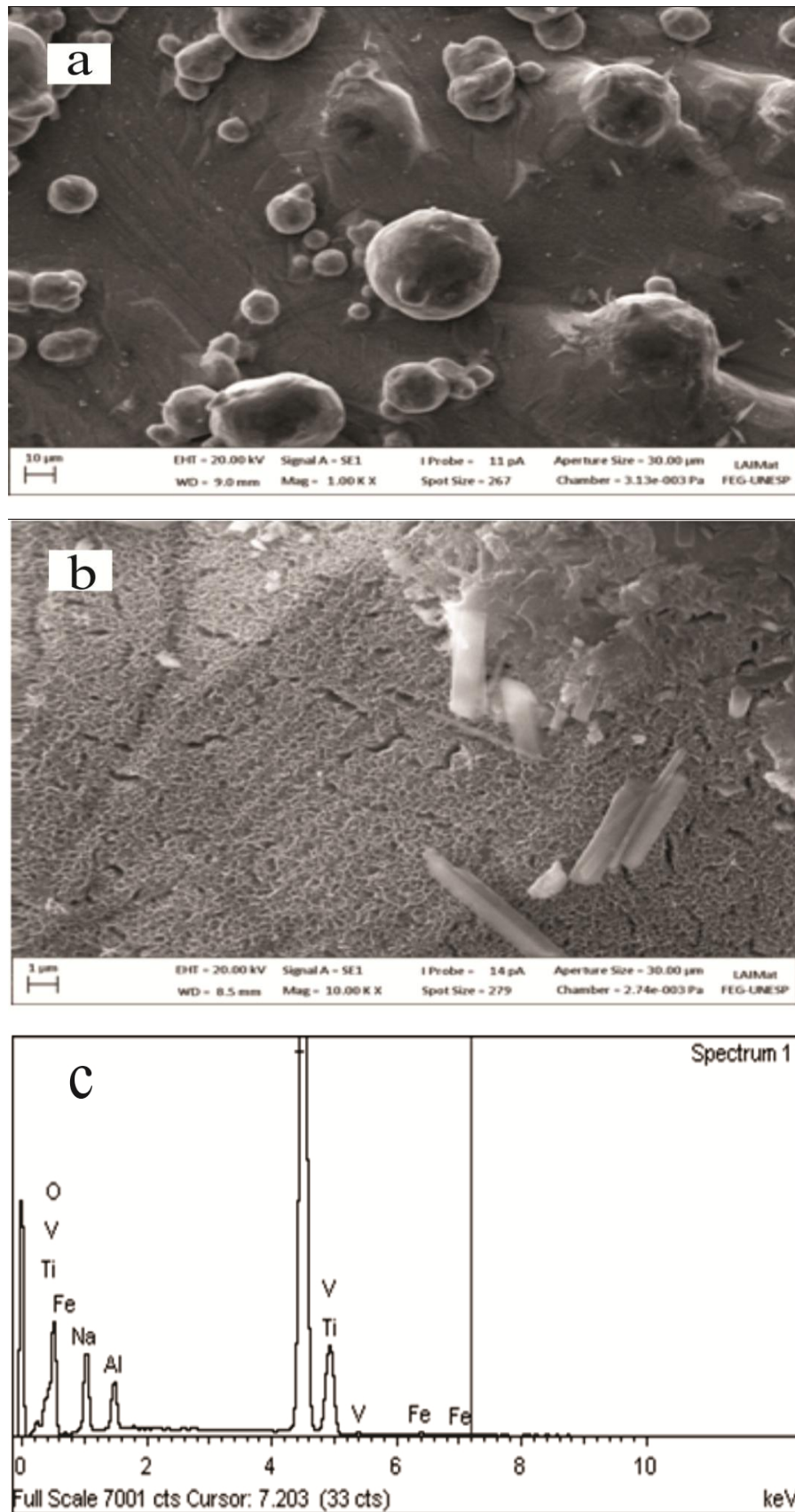


Figura 38– (a) (b) Aspecto da superfície dos scaffolds após tratamento biomimético (menor e maior aumento); (c) mapa EDS

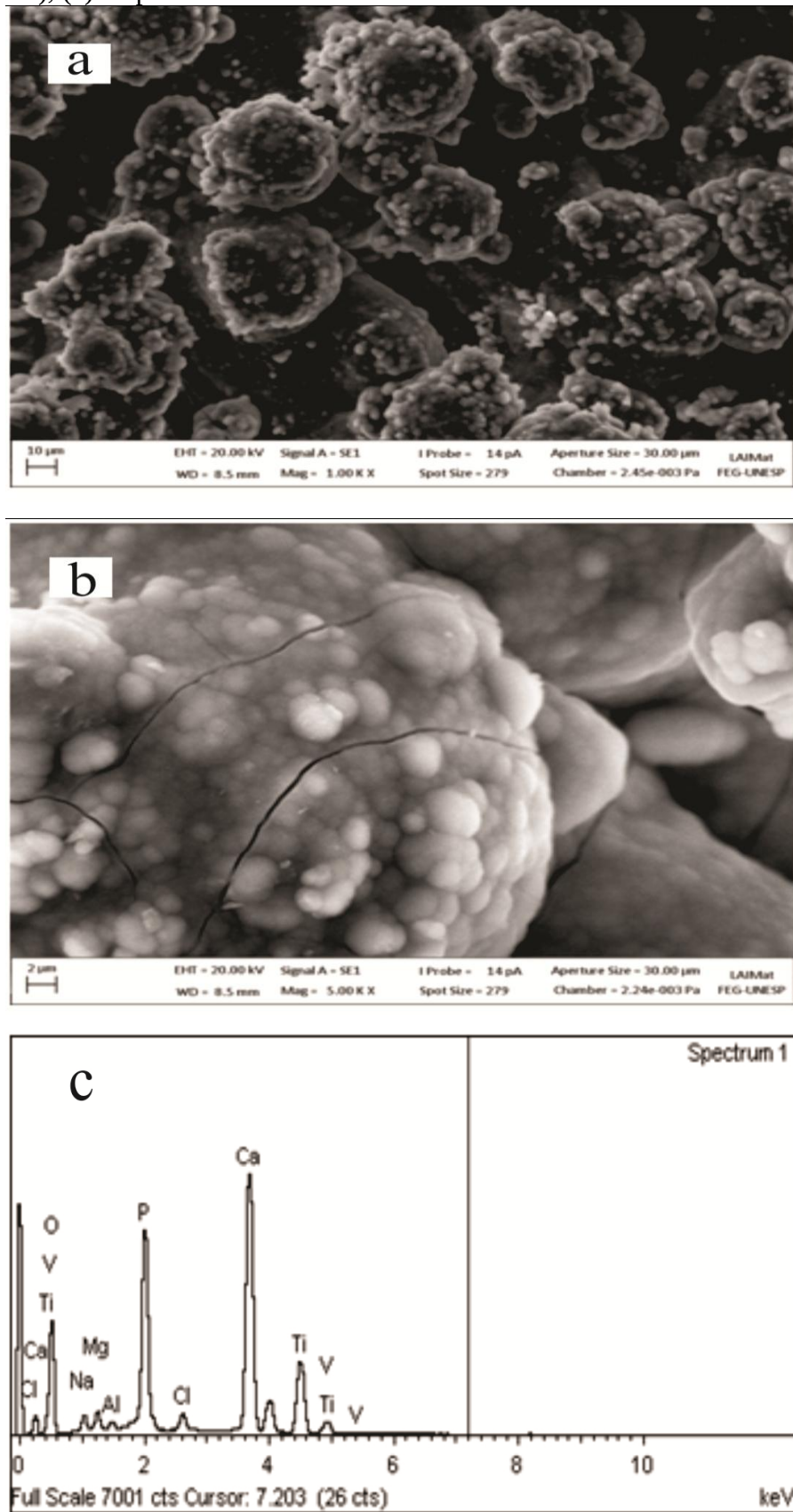


Figura 39– (a) (b) Aspecto da superfície dos scaffolds após incorporação de alendronato (menor e maior aumento); (c) mapa EDS

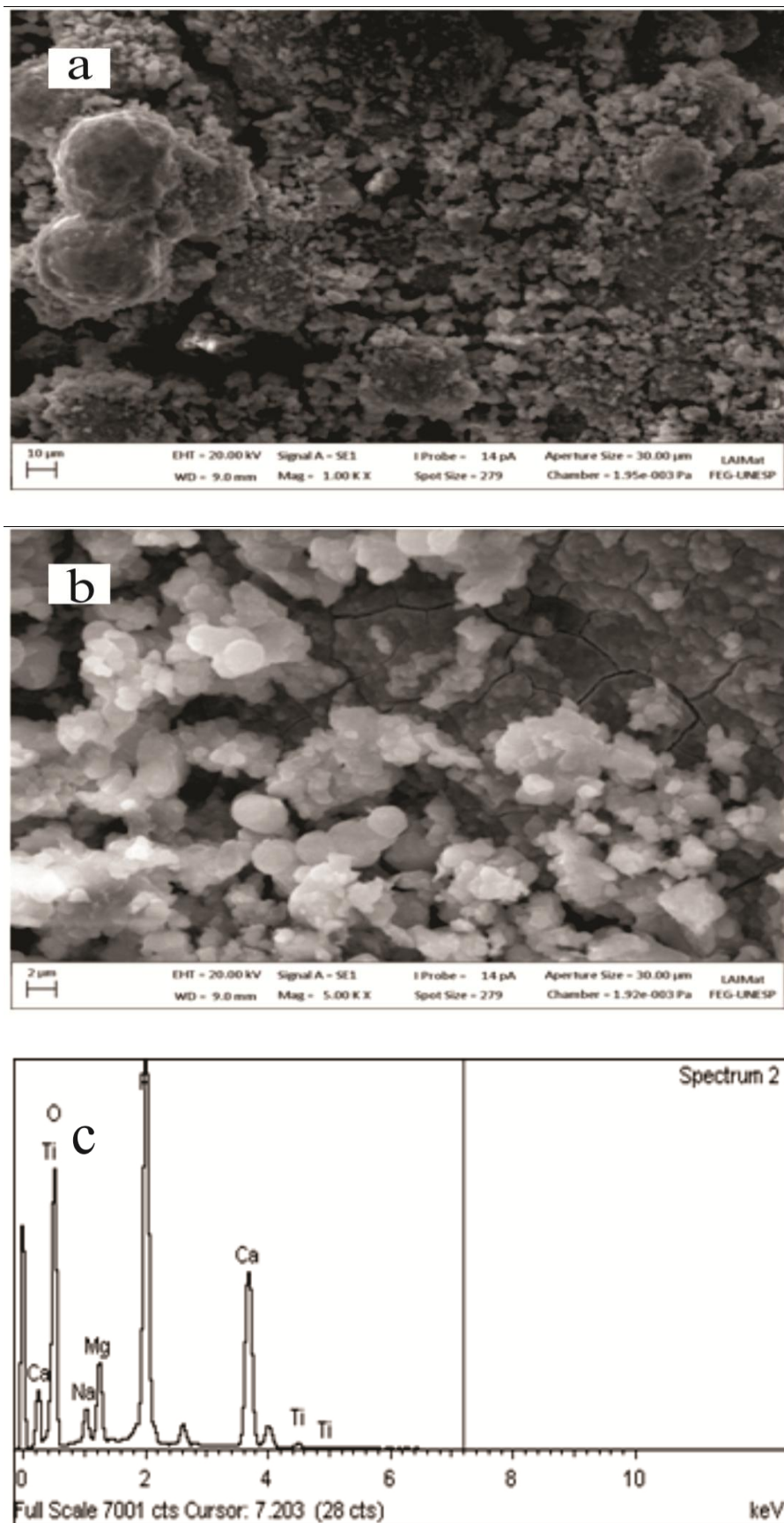
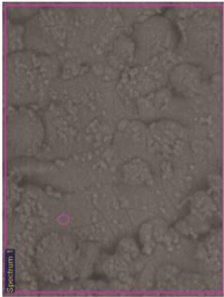
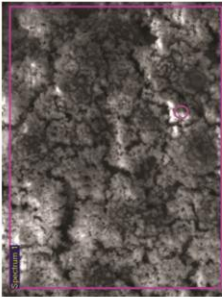
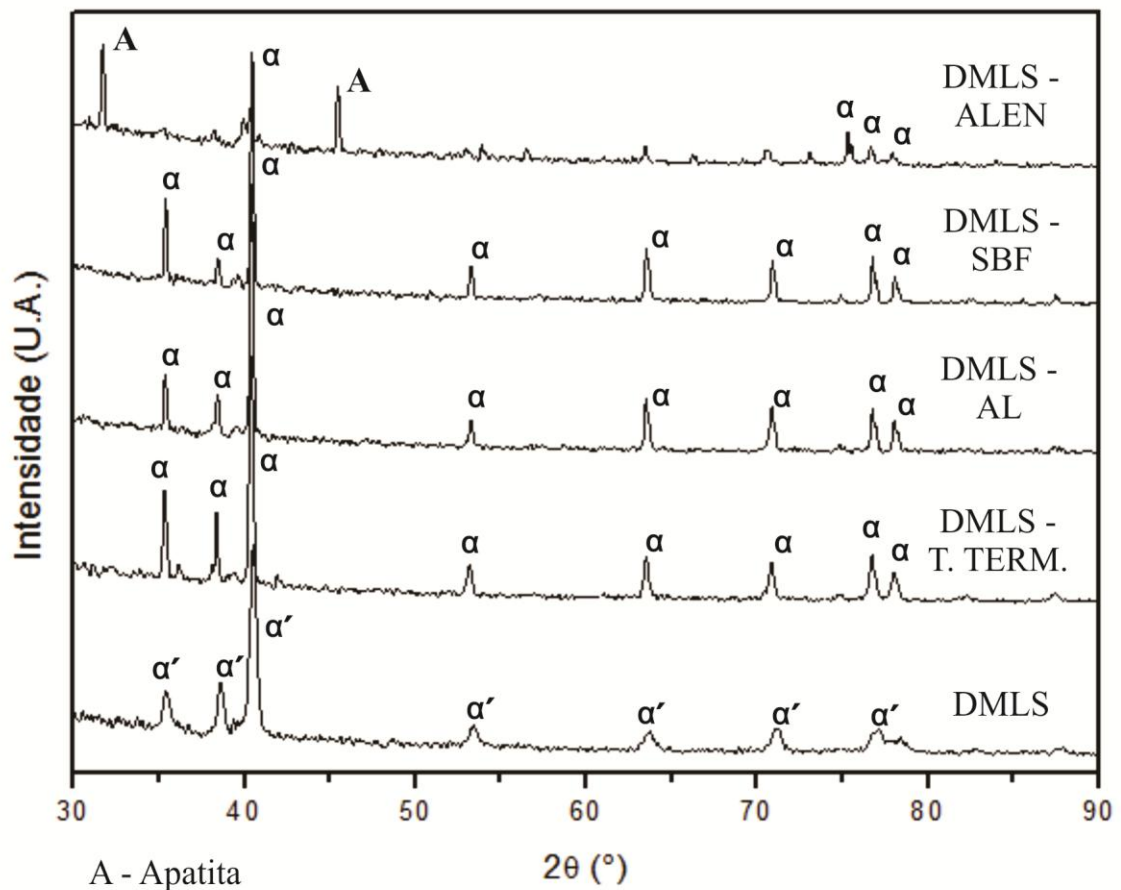


Tabela 01 – Análise EDS dos elementos encontrados na superfície dos scaffolds após imersão em SBF 5x e imobilização com bisfosfanato.

Amostra	Ti	Al	V	O	Na	Mg	P	Ca	Cl
 SBF	Valores Médios	10.44	0.36	0.45	48.20	1.50	1.22	23.83	1.18
	Medida Pontual	16.36	—	1.80	45.66	0.84	0.76	28.98	0.43
 ALEN	Valores Médios	10.55	0.68	0.49	48.70	2.27	3.97	10.96	1.56
	Medida Pontual	0.39	—	—	48.71	2.40	4.21	13.28	1.27

Na Figura 40 é possível observar os resultados da análise por difração de raios-X para as condições avaliadas. Para as amostras processadas por DMLS se observa a formação da fase α' . Após o tratamento térmico se verificou a formação da fase α , característica do resfriamento controlado. Esses resultados foram também encontrados por (SU, 2013).

Para as amostras submetidas ao tratamento de superfície, houve a manutenção da fase α , uma vez que o substrato foi o mesmo. No entanto, foi possível detectar a formação da apatita devido a espessura da camada.



4.3 ESTUDO *IN VIVO* - AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA PÓS-CIRÚRGICO

O acompanhamento radiográfico do processo de consolidação da fratura no pós-cirúrgico seguiu as fases de reparo de fratura, fase inflamatória (7º dia), fase proliferativa (14º dia) e fase remodeladora (21º dia) não houve sinais de processo inflamatório durante as fases de cicatrização, o que não excluiu nenhum animal dos grupos.

A radiografia simples fornece informações essenciais das estruturas ósseas. A evidência da consolidação constitui em uma ponte óssea externa que uni os fragmentos ósseos (RODRIGUES, 2011). Na pesquisa realizada por PILLAR, 1990 o acompanhamento radiográfico dos calos ósseos do reparo mostrou serem mais largos nos grupos ultrassonados. As imagens do controle radiográfico durante o processo de reparo ósseo estão em anexo.

4.3.1 AVALIAÇÃO MICROTOMOGRÁFICA POR RAIO – X (μ CT)

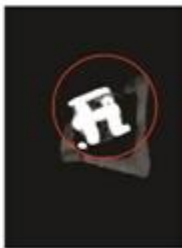
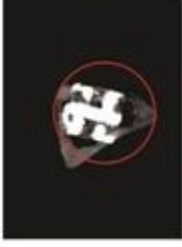
Para o entendimento da integridade óssea, o comportamento mecânico e resistência à fratura foram correlacionados através de variáveis morfológicas da microarquitetura do osso trabecular. E para tal, foram avaliados os parâmetros: Volume das amostras (TV), Volume ósseo da amostra (BV), Razão entre o volume ósseo e o volume da amostra (BV/TV), Fator Padrão Trabecular (Tb.PF), Conectividade (Conn), Porosidade, Espessura trabecular (Tb.Th), Número trabecular (Tb.N) e Separação trabecular (Tb.Sp)

Os resultados das médias e desvio padrão das aquisições dos parâmetros da microtomografia dos grupos piloto podem ser observados na Tabela 02. A visualização microtomográfica 2D e 3D da reconstrução da região do reparo ósseo dos grupos piloto estão demonstradas na Tabela 03.

Tabela 02 – Projeto Piloto - Grupo Submetido à Modificação de Superfície (Médias e Desvio Padrão dos parâmetros ósseos obtidos por Microtomografia por Raio-x): Grupo 1 (Gp1) – grupo controle (amostras produzidas DMLS); Grupo 2 (Gp2) – amostras DMLS submetida a tratamento térmico; Grupo 3 (Gp3) - amostras DMLS e submetidas a tratamento alcalino; Grupo 4 (Gp4) – amostras DMLS e submetidas a tratamento alcalino com posterior imersão em solução SBF 5x; Grupo 5 (Gp5) – amostras DMLS e submetidas a tratamento alcalino com posterior imersão em solução formada por SBF 5x e alendronato de Sódio.

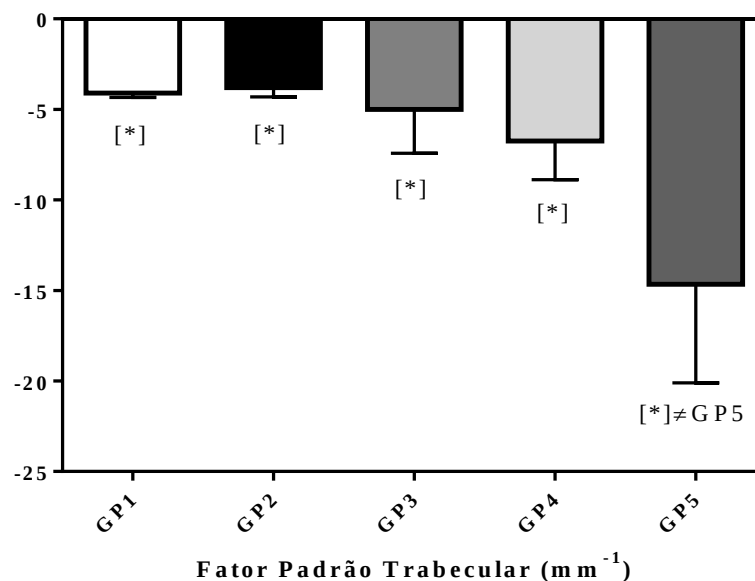
	GP1	GP2	GP3	GP4	GP5
Volume TV (mm ³)	41,57 0,47±	46,33 2,153±	55,78 31,77±	56,33 18,27±	79,014 39,68±
Volume ósseo BV (mm ³)	20,98 0,65±	26,28 4,26±	31,87 17,31±	34,78 9,31±	49,98 29,60232±
BV/TV (%)	50,46 1,06±	56,56 7,016±	57,65 3,77±	62,62 6,90±	61,35 5,93±
Tb.Pf (mm ⁻¹)	-4,10 0,28±	-3,80 0,62±	-5,00 2,96±	-6,74 2,60±	-14,65 6,67±
Conectividade – Conn	820,66 39,80±	560 97,59±	1025,33 1486,72±	946,33 495,77±	4970,66 2608,69±
Porosidade (%)	49,53 1,06±	43,43 7,01±	42,34 3,77±	37,37 6,90±	38,64 5,93±
Espaçamento entre as Trabéculas -Tb.Th (mm)	0,44 0,04±	0,47 0,04±	0,43 0,11±	0,40 0,05±	0,37 0,10±
Número de Trabéculas - Tb.N (1/mm)	1,13 0,09±	1,19 0,03±	1,37 0,32±	1,545 0,17±	1,74 0,68±
Separação Trabecular – Tb.Sp (mm)	0,58 0,04±	0,58 0,09±	0,57 0,02±	0,43 0,12±	0,33 0,06±

Tabela 03 – Reconstrução Microtomográfica 2D e 3D da Região do Reparo Ósseo em uma Amostra Representativa do Projeto Piloto – Grupo Submetido à Modificação da Superfície.

GRUPOS	PLANO			3D
	CORONAL	TRANSVERSAL	SAGITAL	
GP1 DMLS				
GP2 DMLS + Trat. Térmico				
GP3 DMLS + Trat. Térmico + Alcalino				
GP4 DMLS + Trat. Térmico + Alcalino + SBF				
GP4 DMLS + Trat. Térmico + Alcalino + SBF + Alendronato				

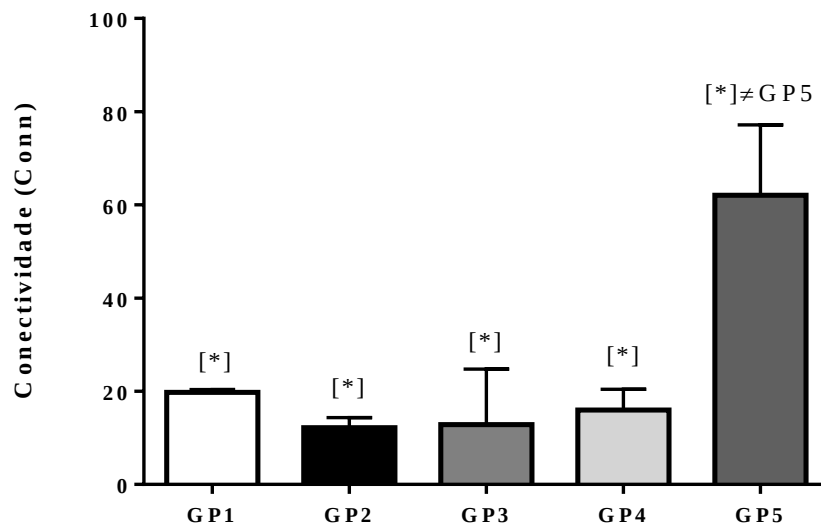
O estudo deste grupo buscou investigar a influência do tratamento de superfície nos scaffolds porosos e a sua resposta no reparo ósseo, para selecionar o grupo de melhor resposta para compor o grupo experimental que foi associado à terapia de ultrassom terapêutico e avaliar a resposta osteogênica desta terapia. Foram constatadas diferenças significativas avaliadas por μ CT nos parâmetros: Fator Padrão Trabecular, Conectividade, Porosidade e Separação Trabecular. Os outros parâmetros microtomográficos avaliados não apresentaram correlação estatística significativa.

Figura 41- Fator Padrão Trabecular do Reparo Ósseo do Grupo Piloto Obtido Pela Microtomografia por raio-X.



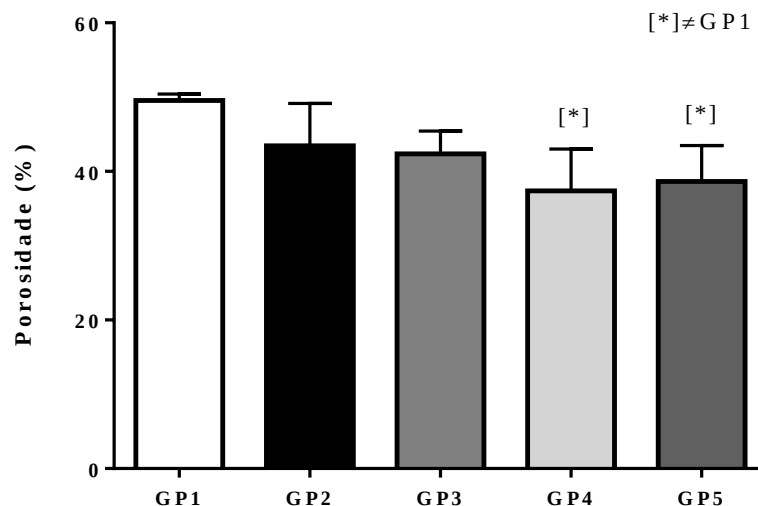
Na correlação estatística analisadas pelo teste não paramétrico ANOVA one-way com pos-hoc Holm-Sidak para $p < 0.05$ utilizando a comparação entre as médias. O Grupo GP5 (Alendronato de Sódio) apresentou menor Fator Padrão Trabecular com significante diferença entre os grupos apresentando ($p < 0,009$ quando comparado ao grupo GP1), ($p < 0,007$ quando comparado ao grupo GP2), ($p < 0,0019$ quando comparado ao grupo GP3) e ($p < 0,0093$ quando comparado ao grupo GP4). O que demonstra melhor resposta do grupo GP5 quando comparado ao outros grupos. Esse índice contrário á conectividade, portanto quanto menor seu valor, melhor a resposta conectiva da microarquitetura trabecular.

Figura 42 - Conectividade do Reparo Ósseo do Grupo Piloto Obtido Pela Microtomografia por raio-X



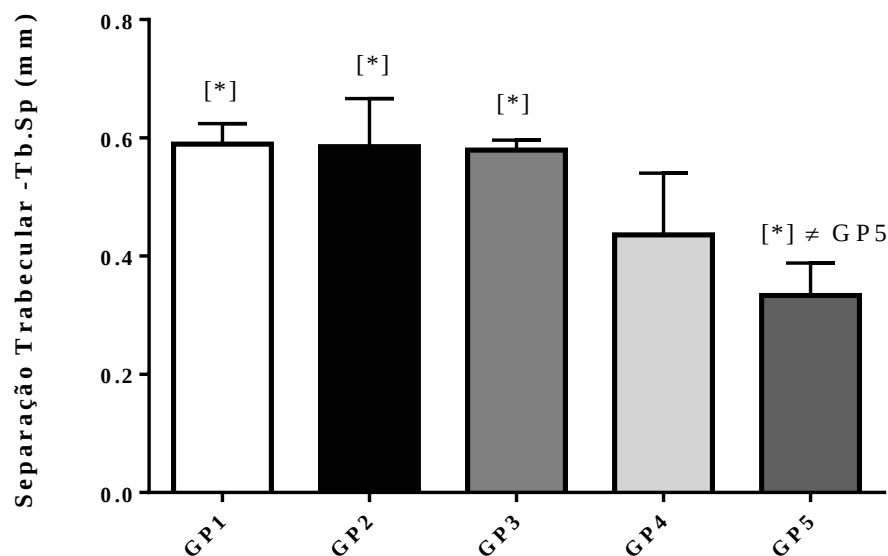
De forma a confirmar os resultados apresentados pelos valores do fator padrão trabecular, a análise estatística do grupo piloto GP5 quanto à resposta de conectividade, apresentou significativa diferença entre os grupos, onde ($p < 0,0001$ quando comparado ao grupo GP1), ($p < 0,0001$ quando comparado ao grupo GP2), ($p < 0,0001$ quando comparado ao grupo GP3) e ($p < 0,0001$ quando comparado ao grupo GP4). O que demonstra melhor resposta do grupo GP5 (Alendronato) na conectividade trabecular do osso neoformado.

Figura 43 – Porosidade do Reparo Ósseo do Grupo Piloto Obtido Pela Microtomografia por raio-X.



A microarquitetura óssea do grupo GP1 (DMLS) apresentou maior porosidade em relação ao grupo GP4 (SBF) para $p < 0,0148$ e quando comparado ao grupo GP5 (Alendronato) $p < 0,0302$. Os grupos submetidos ao tratamento biomimético (GP4) e incorporados com alendronato de sódio (GP5) também apresentaram menor separação trabecular.

Figura 44 - Separação Trabecular do Reparo Ósseo do Grupo Piloto Obtido Pela Microtomografia por raio-X.



Na investigação dos parâmetros da microarquitetura do osso trabecular analisado no processo de reparo ósseo adquiridos pela microtomografia por raio-x, demonstra que o grupo GP5 (Alendronato) apresentou melhor resposta no reparo ósseo.

Para Cesar et al (2013) o comportamento mecânico e ou previsão do risco de fraturas podem ser parcialmente explicados pela fração do volume ósseo, orientação trabecular e conectividade.

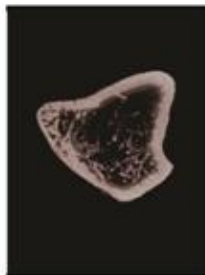
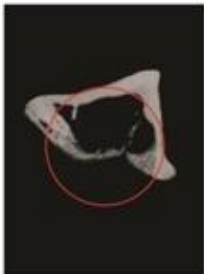
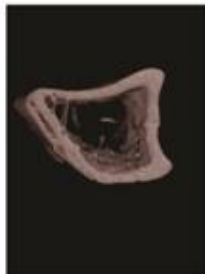
O Grupo GE1 denominado grupo experimental não foi submetido ao implante do scaffold metálico. No qual foi observada a resposta do tratamento de ultrassom terapêutico de baixa intensidade como método de indução osteogênica no processo de reparo ósseo. A Tabela 03 demonstra as médias e desvio padrão dos valores aquisitados pela microtomografia do Grupo GE1 e seus valores após aplicação de ultrassom.

Tabela 04 – Grupo Experimental (GE1) Sem Implante (Médias e Desvio Padrão dos Parâmetros Ósseos Obtidos por Microtomografia por Raio X): GE1A – Grupo Não Ultrassonado; GE1B – Grupo Ultrassonado 1MHz; GE1C – Grupo Ultrassonado 3MHz.

	GE S/U	GE 1MHz	GE3MHz
Volume TV (mm ³)	41,13 8,36±	54,53 36,12±	60,31 35,14±
Volume ósseo BV (mm ³)	21,52 2,04±	34,56 25,36±	31,33 16,74±
BV/TV (%)	53,10 5,95±	61,75 5,35±	52,74 4,44±
Fator Padrão Trabecular Tb.Pf (mm ⁻¹)	0,69 0,54±	-4,09 7,399±	-1,71 3,50±
Conectividade - Conn	244,33 207,88±	1592 2653,50±	2006,33 3294,99±
Porosidade (%)	46,89 5,95±	38,24 5,35±	47,25 4,44±
Espaçamento entre as Trabéculas -Tb.Th (mm)	0,51 0,02±	0,50 0,14±	0,47 0,17±
Número de Trabéculas – Tb.N (1/mm)	1,03 0,05±	1,32 0,56±	1,22 0,49±
Separação Trabecular – Tb.Sp (mm)	1,00 0,48±	0,80 0,49±	0,86 0,46±

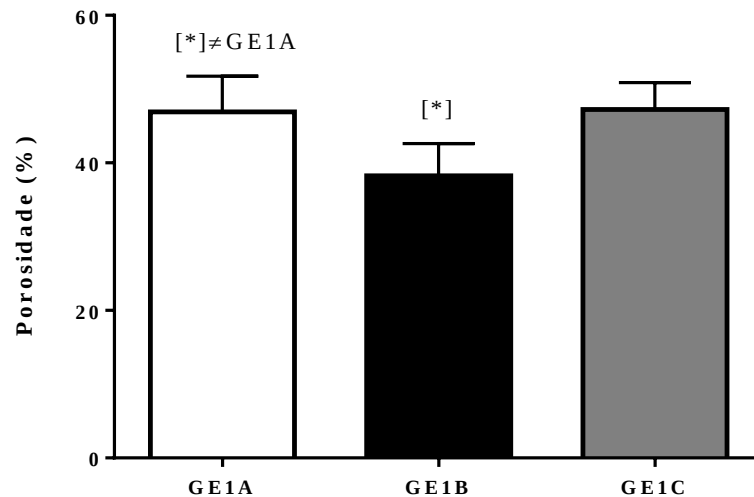
A visualização microtomográfica 2D e 3D da reconstrução da região do reparo ósseo dos grupos GE1 estão demonstradas na Tabela 04.

Tabela 05 – Reconstrução Microtomográfica 2D e 3D da Região do Reparo Ósseo em uma Amostra Representativa do Grupo Experimental Sem Implante (GE1)

RECONSTRUÇÃO MICROTOMOGRÁFICA 2D E 3D DA REGIÃO DO REPARO ÓSSEO EM UMA AMOSTRA REPRESENTATIVA DO GRUPO EXPERIMENTAL SEM IMPLANTE (GE1)				
GRUPOS	PLANO			3D
	CORONAL	TRANSVERSAL	SAGITAL	
GE1 S/ US				
GE1 C/ US 1Mhz				
GE1 C/ US 3 Mhz				

O parâmetro que apresentou significância estatística entre os grupos experimentais sem implante e submetidos ou não à terapia de ultrassom terapêutico foi a porosidade, onde o grupo submetido ao tratamento de ultrassom na frequência de 1MHz apresentou melhor resposta quando comparado ao grupo não ultrassonado (GE1A) $p < 0,0480$ e ao grupo (GE1C) ultrassonado com a frequência de 3MHz também $p < 0,0480$.

Figura 45 – Porosidade do Grupo Experimental sem scaffold (GE1)



As amostras avaliadas foram após quatro semanas da fratura o que pode ter sido um fator para que os outros parâmetros da microarquitetura óssea não tenham sido significativamente quantitativos.

Lu (2015) avaliou os efeitos do ultrassom terapêutico de baixa intensidade na regeneração óssea durante o processo de cicatrização osso/tendão em coelhos e o tempo de regeneração de melhor resposta ao estímulo entre 8 e 16 semanas. Seu estudo confirmou a ação ultrassônica no processo de cicatrização avaliado quantitativamente por Microtomografia por raio-X, enquanto o período de cicatrização aumentava o novo osso gradualmente se formava.

Segundo Duarte (1983), o ultrassom pulsado atinge o tecido por sucessão de impulsos, cada um deles resultando em um sinal elétrico como resposta do osso. Daí por diante o processo de formação é regulado pelo campo elétrico assim formado e o metabolismo ósseo é estimulado eletricamente.

No estudo comparativo sobre os efeitos osteogênicos das frequências de 1MHz e de 3MHz e o tempo de regeneração realizados em coelhos machos foi constatado que o ultrassom terapêutico de 1MHz em 8 semanas apresentou maior crescimento de osso novo quando comparado a grupos não ultrassonados e ultrassonados na frequência de 3MHz entre 2 a 4 semanas (TAKEBE et al, 2014).

As Tabelas 6, 7 e 8 representam as médias e desvio padrão dos valores adquiridos na microtomografia dos grupos experimentais implantados com scaffolds porosos de T16Al4V sem ultrassom e os associados ao tratamento de ultrassom terapêutico de baixa intensidade.

Tabela 06 - Grupo Experimental Implantado Não Submetido ao Tratamento de Ultrassom (Médias e Desvio Padrão dos Parâmetros Ósseos Obtidos por Microtomografia por Raio X).

	GE2A	GE3A	GE4A
Volume TV (mm ³)	41,57 0,39±	46,33 1,75±	79,01 32,40±
Volume ósseo BV (mm ³)	20,98 0,53±	26,28 3,48±	49,98 24,17±
BV/TV (%)	50,46 0,87±	56,56 5,72±	61,35 4,84±
Fator Padrão Trabecular Tb.Pf (mm ⁻¹)	-4,10 0,23±	-3,80 0,51±	-14,65 5,44±
Conectividade - Conn	820,66 32,49±	560 79,68±	4970,66 2129,98±
Porosidade (%)	49,53 0,87±	43,43 5,72±	38,64 4,84±
Espaçamento entre as Trabécula -Tb.Th (mm)	0,44 0,03±	0,47 0,03±	0,37 0,08±
Número de Trabéculas – Tb.N (1/mm)	1,13 0,07±	1,19 0,02±	1,74 0,56±
Separação Trabecular –Tb.Sp (mm)	0,58 0,03±	0,58 0,08±	0,33 0,05±

Tabela 07 – Grupo Experimental Implantado Submetido ao Tratamento de Ultrassom de 1MHz (Médias e Desvio Padrão dos Parâmetros Ósseos Obtidos por Microtomografia por Raio-X)

	GE2	GE3	GE4
Volume TV (mm ³)	57,56 15,06±	70,54 46,93±	44,97 5,16±
Volume ósseo BV (mm ³)	26,52 4,87±	44,29 29,90±	25,30 6,95±
BV/TV (%)	46,85 7,08±	62,56 0,88±	55,65 9,20±
Fator Padrão Trabecular Tb.Pf (mm ⁻¹)	-1,92 2,50±	-6,51 5,05±	-3,10 3,98±
Conectividade - Conn	931 638,77±	2143 2824,55±	851,66 491,66±
Porosidade (%)	53,14 7,08±	37,43 0,88±	44,34 9,20±
Espessura da Trabécula -Tb.Th (mm)	0,40 0,06±	0,45 0,10±	0,50 0,02±
Número de Trabéculas – Tb.N (1/mm)	1,17 0,08±	1,42 0,40±	1,09 0,15±
Separação Trabecular –Tb.Sp (mm)	0,62 0,03±	0,40 0,11±	0,40 0,03±

Tabela 08 – Grupo Experimental Implantado (GE) Submetido ao Tratamento de Ultrassom de 3MHz (Médias e Desvio Padrão dos Parâmetros Ósseos Obtidos por Microtomografia por Raio X).

	GE2	GE3	GE4
Volume TV (mm ³)	53,52 9,79±	43,57 4,54±	74,65 28,33±
Volume ósseo BV (mm ³)	27,15 6,89±	25,99 2,87±	49,40 24,09±
BV/TV (%)	50,69 9,59±	59,71 4,19±	65,33 10,85±
Fator Padrão Trabecular Tb.Pf (mm ⁻¹)	-1,39 1,27±	-3,18 0,33±	-10,54 5,01±
Conectividade - Conn	551,33 199,67±	316 100,63±	3521,33 3729,7±
Porosidade (%)	49,30 9,59±	40,28 4,19±	34,66 10,85±
Espaçamento entre as Trabéculas -Tb.Th (mm)	0,41 0,08±	0,52 0,02±	0,42 0,13±
Número de Trabéculas Tb.N (1/mm)	1,23 0,11±	1,13 0,02±	1,59 0,34±
Separação Trabecular Tb.Sp (mm)	0,48 0,08±	0,53 0,03±	0,29 0,03±

As Tabelas 9, 10 e 11 representam a reconstrução microtomográfica dos grupos experimentais implantados com os scaffolds porosos e submetidos ao tratamento de ultrassom terapêutico de baixa intensidade.

Tabela 09 – Grupo GE2 – Reconstrução Microtomográfica 2D e 3D da Região do Preparo Ósseo em uma amostra representativa do Grupo Experimental com Implante DMLS (GE2)

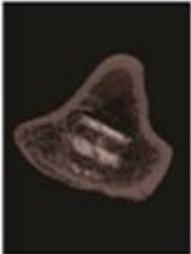
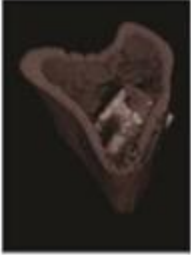
GRUPOS	PLANO			3D
	CORONAL	TRANSVERSAL	SAGITAL	
GE2 S/ US				
GE2 C/ US 1Mhz				
GE2 C/ US 3 Mhz				

Tabela 10 – Grupo GE3 – Reconstrução Microtomográfica 2D e 3D da Região do Preparo Ósseo em uma amostra representativa do Grupo Experimental com Implante DMLS + Tratamento Térmico (GE3)

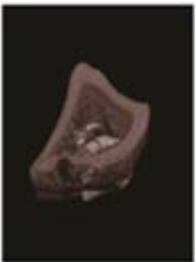
GRUPOS	PLANO			3D
	CORONAL	TRANSVERSAL	SAGITAL	
GE 3 S/ US				
GE 3 C/ US 1Mhz				
GE 3 C/ US 3 Mhz				

Tabela 11 – Grupo GE4 – Reconstrução Microtomográfica 2D e 3D da Região do Preparo Ósseo em uma amostra representativa do Grupo Experimental com Implante DMLS + Tratamento Biomomético + Alendronato de Sódio (GE4)

GRUPOS	PLANO			3D
	CORONAL	TRANSVERSAL	SAGITAL	
GE4 S/ US				
GE4 C/ US 1Mhz				
GE4 C/ US 3 Mhz				

Nas análises estatísticas entre os grupos experimentais implantados não submetidos ao tratamento de ultrassom terapêutico revelam diferença significativa entre os parâmetros Fator Padrão Trabecular, Conectividade, Porosidade e Separação trabecular. Indicando que o grupo de melhor resposta entre estes grupos foi o grupo GE4(Alendronato de Sódio) de acordo com o resultado do grupo apresentado pela resposta do Grupo Piloto.

Figura 46 - Fator Padrão Trabecular do grupo experimental com scaffold e sem tratamento de ultrassom (GE2, GE3 e GE4)

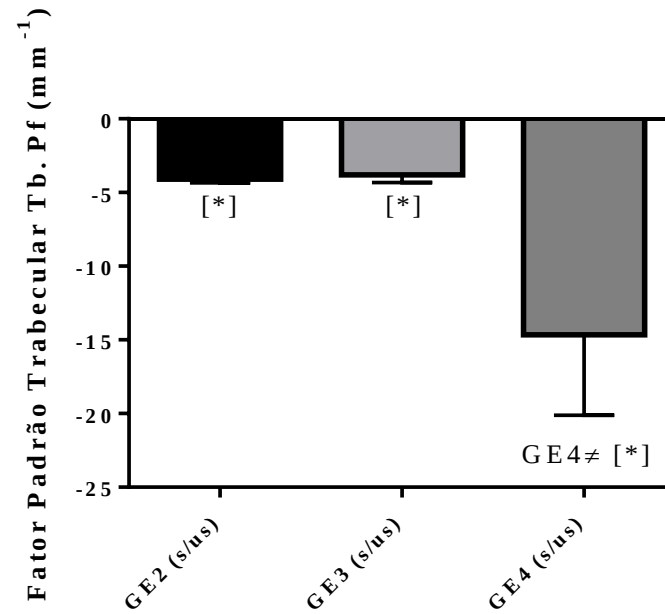


Figura 47 – Conectividade do reparo ósseo do Grupo Experimental Implantados não submetidos ao tratamento de ultrassom terapêutico obtida pela microtomografia por raio- X.

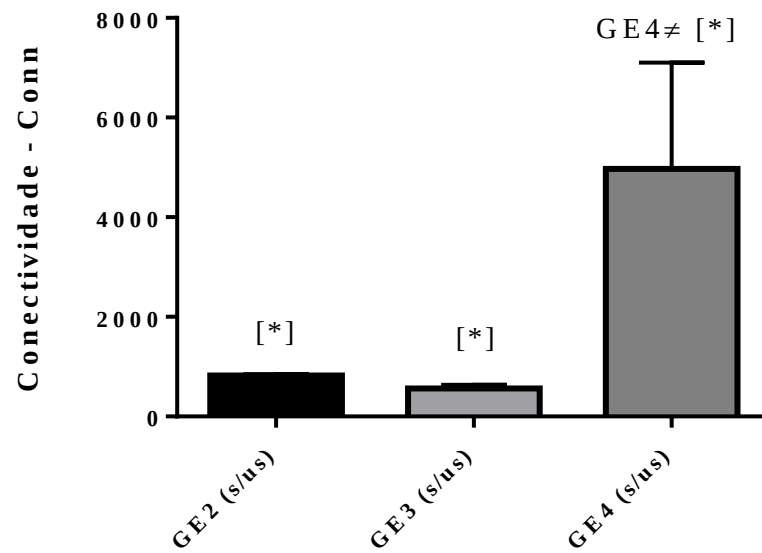


Figura 48 - Porosidade do grupo experimental com scaffold e sem tratamento de ultrassom (GE2, GE3 e GE4)

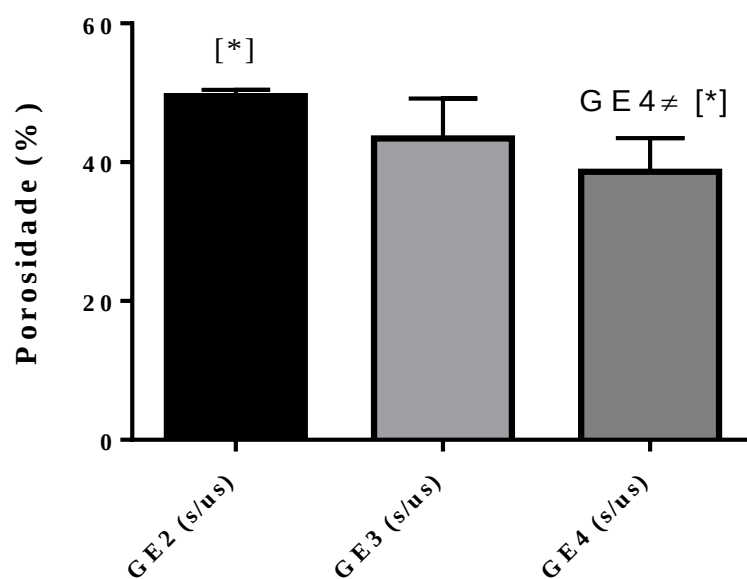
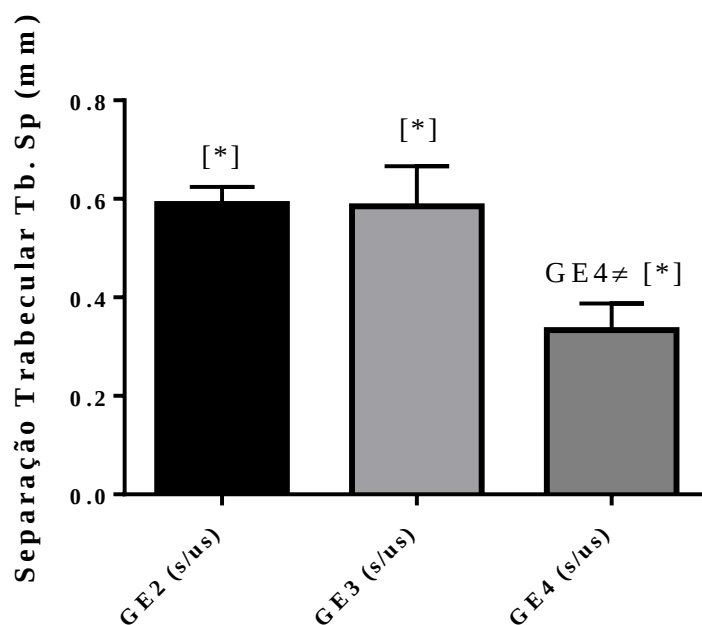


Figura 49 - Separação Trabecular do grupo experimental com scaffold e sem tratamento de ultrassom (GE2, GE3 e GE4)



Nas análises estatísticas entre os grupos experimentais implantados submetidos ao tratamento de ultrassom terapêutico de baixa intensidade na frequência de 1MHz revelam diferença significativa entre os parâmetros; Porosidade e Separação trabecular.

Figura 50 - Porosidade do grupo experimental com scaffold e submetido ao tratamento de ultrassom de 1MHz (GE2, GE3 e GE4)

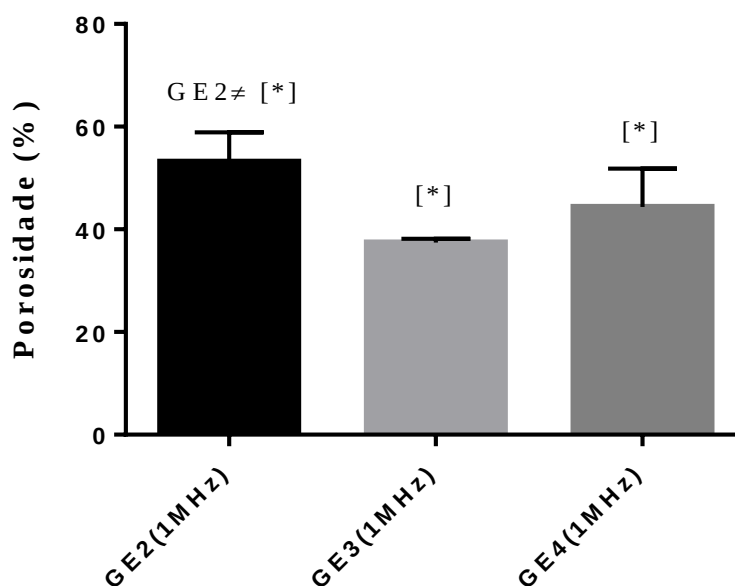
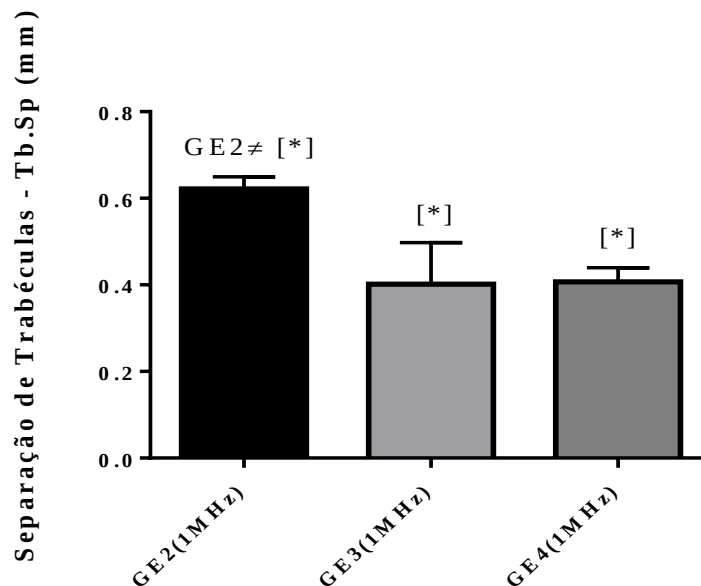


Figura 51 - Separação Trabecular do Grupo Experimental com scaffold e submetido ao tratamento de ultrassom de 1MHz (GE2, GE3 e GE4)



Nas análises estatísticas entre os grupos experimentais implantados submetidos ao tratamento de ultrassom terapêutico de baixa intensidade na frequência de 3MHz revelam diferença significativa entre os parâmetros: Fator Padrão Trabecular, Número Trabecular e Separação Trabecular. O que indica que os resultados obtidos entre os grupos ultrassonados de frequência de 1MHz e 3MHz apresentam respostas sobre a microarquitetura do reparo ósseo diferentes.

Figura 52 - Fator Padrão Trabecular do Grupo Experimental com scaffold e submetido ao tratamento de ultrassom de 3MHz (GE2, GE3 e GE4)

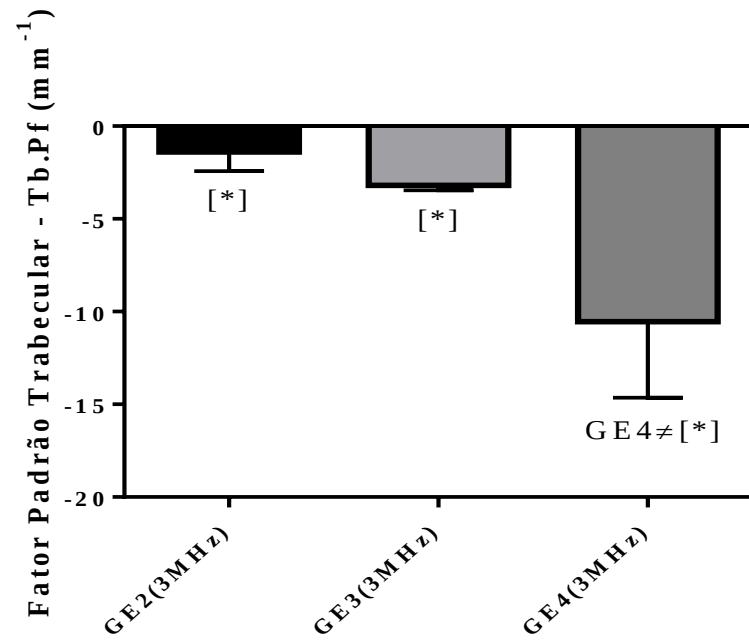


Figura 53 - Número de Trabéculas do Grupo Experimental com scaffold e submetido ao tratamento de ultrassom de 3MHz (GE2, GE3 e GE4)

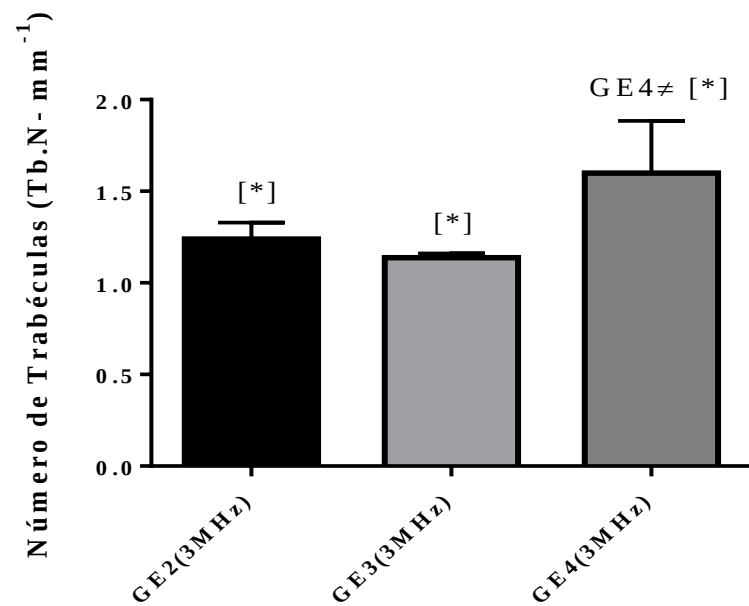
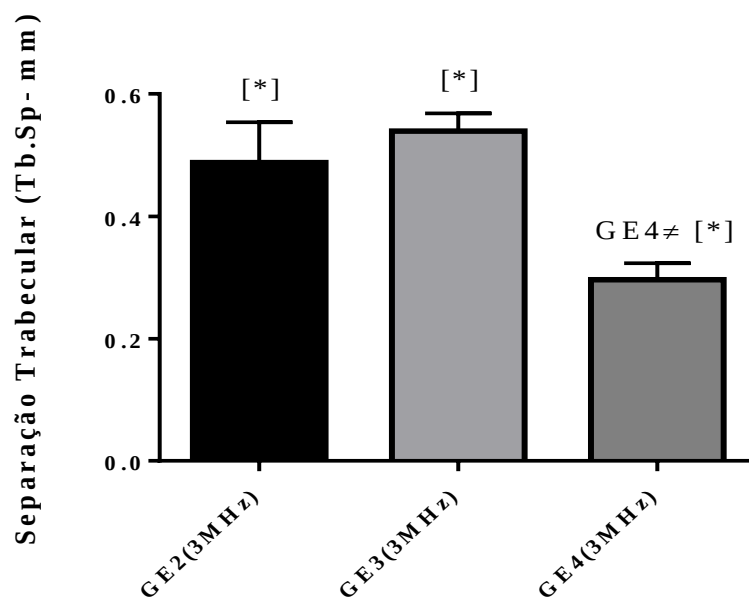
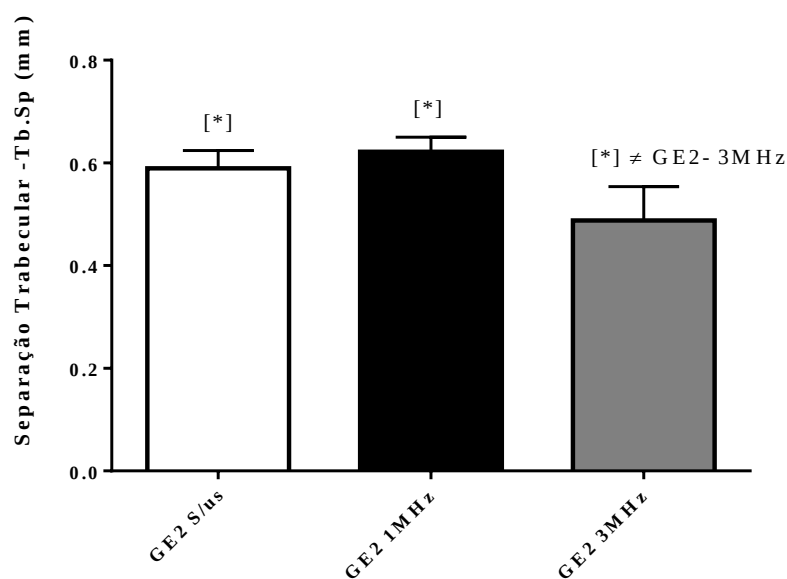


Figura 54 - Separação Trabecular do Grupo Experimental com scaffold e submetido ao tratamento de ultrassom de 3MHz (GE2, GE3 e GE4)



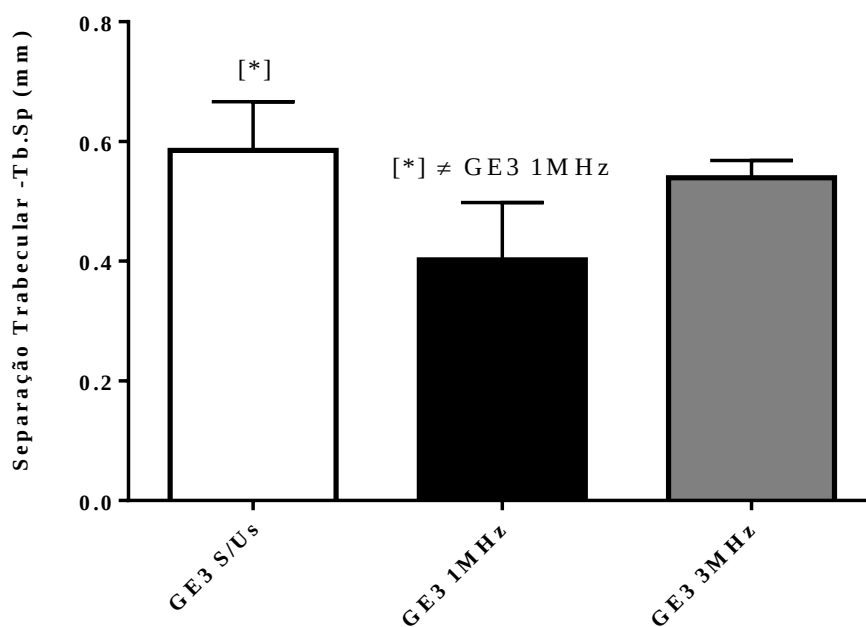
Na avaliação micromográfica do grupo experimental DMLS (GE2) o parâmetro separação trabecular submetido ao ultrassom na frequência de 3MHz apresentou melhor resposta quando comparado ao grupo GE2 sem ultrassom com significância estatística com $p < 0,0247$. O grupo GE2 3MHz também apresentou melhor resposta no parâmetro Separação Trabecular quando comparado ao grupo submetido ao ultrassom na frequência de 1MHz com significância estatística com $p < 0,0080$.

Figura 55 - Separação Trabecular do Grupo Experimental com scaffold e submetido ao tratamento de ultrassom (GE2)



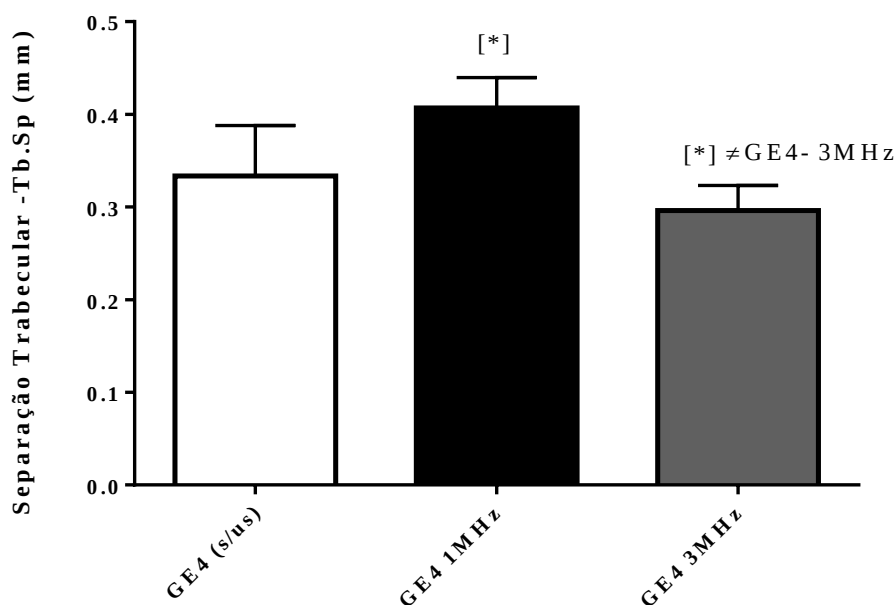
O grupo GE3 1MHz apresentou melhor resposta no parâmetro separação trabecular quando comparado ao grupo GE3 não submetido ao tratamento de ultrassom com significancia estatística com $p < 0,0206$.

Figura 56 - Separação Trabecular do Grupo Experimental com scaffold e submetido ao tratamento de ultrassom (GE3)



O grupo GE4-3MHz apresentou melhor resposta no parâmetro separação trabecular quando comparado ao grupo submetido ao ultrassom na frequência de 1MHz com significância estatística com $p < 0,0102$.

Figura 57 - Separação Trabecular do Grupo Experimental com scaffold e submetido ao tratamento de ultrassom (GE4)



As frequências de 1 e 3MHz se diferenciam principalmente pelo seu grau de absorção. O ultrassom na frequência de 1MHz é absorvido pelos tecidos numa camada de profundidade entre 3 a 5cm, portanto é mais recomendado para lesões mais profundas. Enquanto a frequência de 3MHz é usada em lesões mais superficiais entre 1 a 2 cm (TAKEBE et al, 2014).

Em um estudo *in vivo* realizado para avaliar aumento de temperatura tecidual influenciado pela aplicação de ultrassom de baixa intensidade em implantes metálicos, constatou que não houve efeito dano na fixação do implante e na cicatrização. Não produziu efeito negativo na formação do calo e não gerou afrouxamento do implante metálico. Na avaliação histopatológica não se observou necrose em nenhuma secção histológica. De acordo com autor a fixação de implantes metálicos pode não ser uma contraindicação ao tratamento de ultrassom terapêutico de baixa intensidade (KOCAOGLU et al, 2011)

A área implantada recebeu um implante de 2mm de diâmetro por 2,5mm de profundidade o que pode ter sido o fator responsável pela melhor resposta no arranjo da interface osso/scaffold entre os grupos submetidos ao ultrassom de 3MHz.

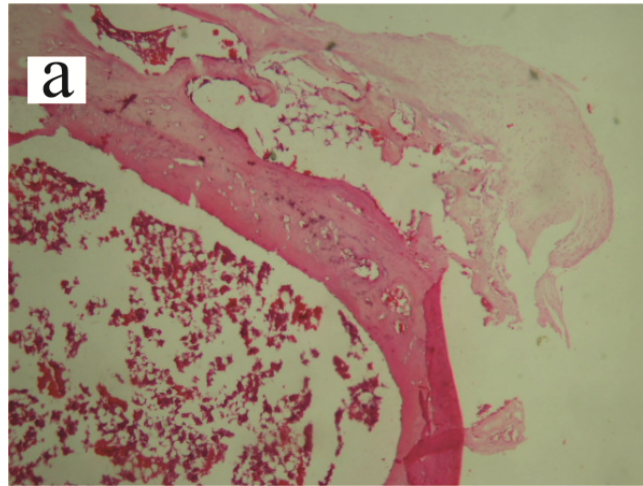
4.3.2 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

A Figura 58 mostra o processo de reparo ósseo no grupo submetido a fratura cirúrgica sem implante(GE1) , antes e após o emprego do ultrassom. A ausência de formação de calo ósseo foi verificada nos animais (Figura 58 a). O emprego do ultrassom promoveu o reparo ósseo (Figura 58b e Figura 58c), sendo efeito mais acentuado para a frequência de 1MHz (Figura 58b).

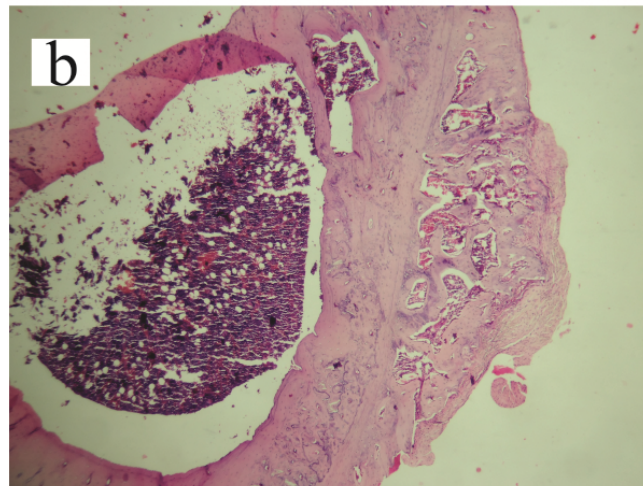
Os recursos eletrofísicos têm demonstrado efeitos positivos na proliferação de células ósseas e na aceleração do processo de consolidação de fraturas (SENA et al, 2005). Os resultados apresentados na análise histológica realizada concordam com os estudos de Azuma et al (2001) aonde a remodelação óssea pode ser acelerada quando exposta ao tratamento de LIPUS, 25 dias após a fratura, relacionando o efeito do ultrassom com o período da fase de reparo. Em outro estudo, Leite (2005) verificou que fraturas tratadas com US1MHz de frequência de repetição 100Hz apresentam aceleração de deposição de matriz óssea em áreas fraturadas.

Figura 58 – Reparo do defeito ósseo grupo GE1 aos 30dias após ato cirúrgico. Aumento original 2,5X. Coloração HE.

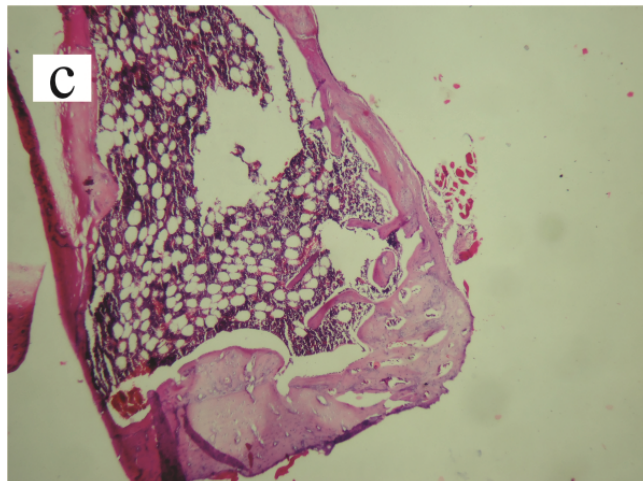
Sem Ultrassom



1MHz



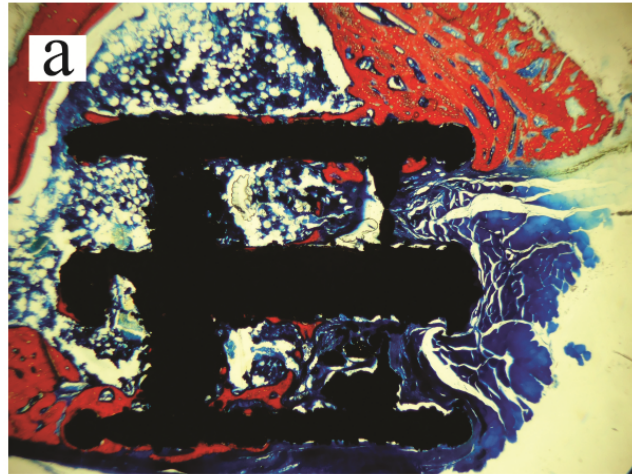
3MHz



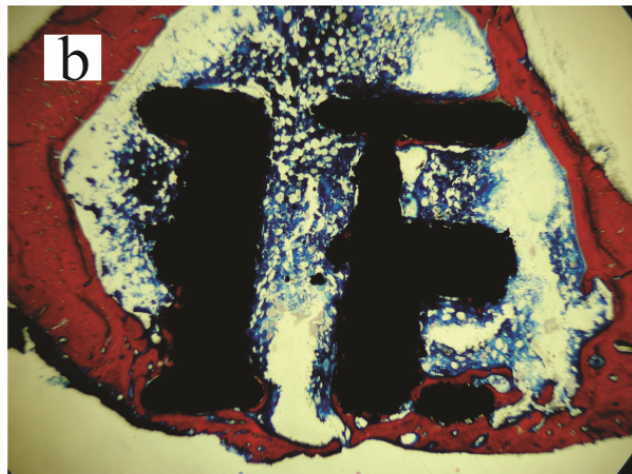
A inserção do scaffolds processados por DMLS na região do defeito ósseo não promoveu a formação do reparo ósseo, com a presença de tecido conjuntivo (Figura 59 a). A associação de ultrassom levou ao fechamento da fratura. Novamente, sua ação foi mais eficiente para frequência de 1MHz (Figura 59 b) com intensa formação de tecido ósseo. No entanto, o emprego da frequência 3MHz promoveu melhor interconectividade entre os poros (Figura 59 c) provavelmente pelo seu efeito de maior absorção.

Figura 59 – Reparo do defeito ósseo implantado com scaffold poroso grupo GE2 aos 30 dias após ato cirurgico aumento original 2,5x coloração Azul de Stevenels e Alizarina Red S31

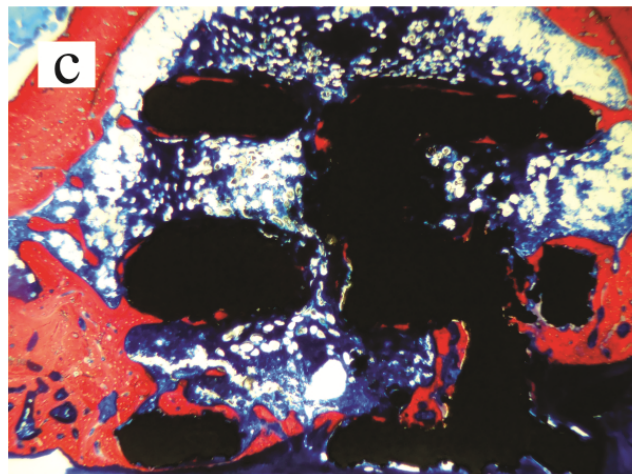
Sem Ultrassom



1MHz



3MHz



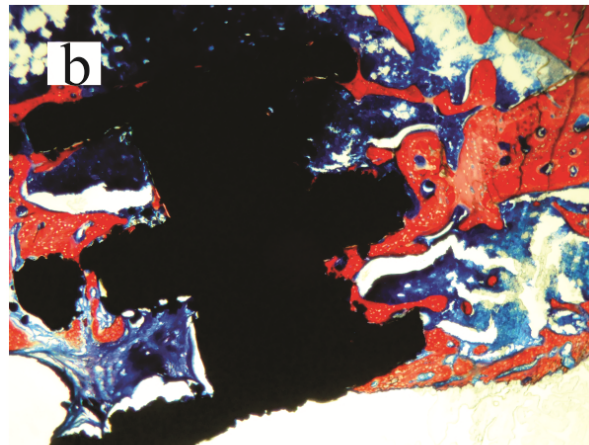
O emprego do tratamento térmico nas amostras processadas por DMLS proporcionou o fechamento do defeito com uma discreta integração do tecido ósseo/scaffold na área fraturada (Figura 60 a). Conforme verificada na análise por EDS após o tratamento térmico as amostras apresentaram menor grau de impureza o que pode ter contribuído para esse comportamento. Da mesma forma que constatado para os demais grupos a terapia de ultrassom influi diretamente na osteogênese para a frequência de 1MHz (Figura 60 b) houve a intensa formação de tecido ósseo distribuído entre os poros com fechamento da fratura. Por outro lado, apesar da frequência de 3MHz (GE3c) promover a formação de tecido fibroso, se verifica a maior formação de tecido conjuntivo no interior do scaffold (Figura 60 c).

Figura 60– Reparo do defeito ósseo implantado com scaffold poroso grupo GE3 aos 30 dias após ato cirurgico aumento original 2,5x coloração Azul de Stevenels e Alizarina Red S31.

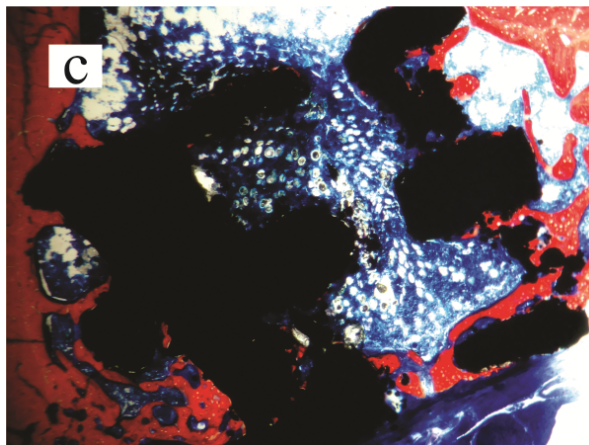
Sem Ultrassom



1MHz



3MHz

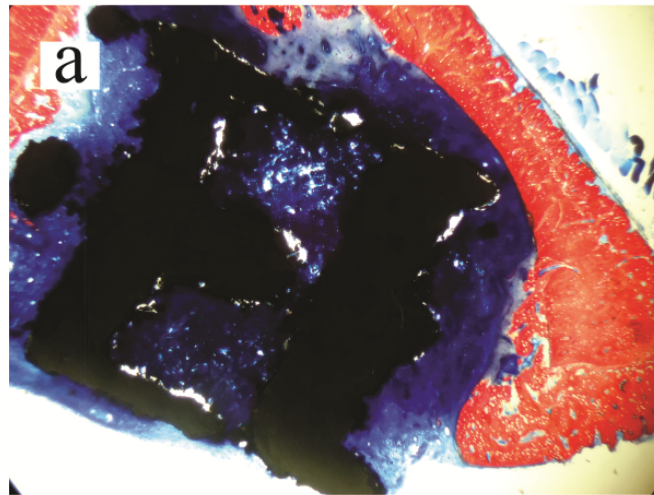


A Figura 61 mostra a reparo da fratura na interface osso/scaffold no grupo implantado alendronato antes e após o emprego do ultrassom.

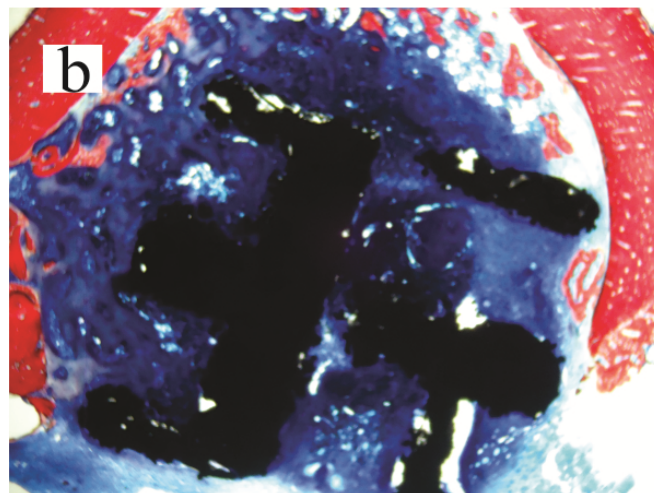
Em GE4a (Figura 61 a) se verifica que não houve a formação do tecido ósseo na área fraturada, com encapsulamento do scaffold, o que implica na ausência de interação entre o scaffold/tecido ósseo no reparo da fratura (em azul). O tratamento de ultrassom na frequência de 1MHz empregado nas amostras do grupo GE4b (Figura 61 b) levou a uma discreta proliferação de tecido ósseo em direção ao scaffold (ramificação em vermelho). Por outro lado, com o aumento da frequência para 3 MHz (GE4c) se observou uma ramificação tecidual mais intensa (Figura 61 c)

Figura 61 – Reparo do defeito ósseo implantado com scaffold poroso grupo GE4 aos 30 dias após ato cirurgico aumento original 2,5x coloração Azul de Stevenels e Alizarina Red S31

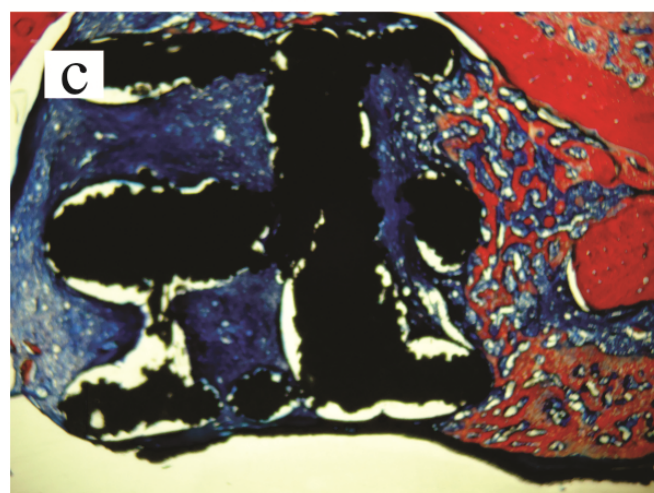
Sem Ultrassom



1MHz



3MHz



Estudos avaliando a incorporação de alendronato de sódio a implantes metálicos apresentaram efeitos positivos no que diz respeito a osseointegração (CARVALHO, 2013). No entanto, os resultados obtidos no presente estudo para os scaffolds submetidos a imobilização com alendornato de sódio mostram um comportamento distinto caracterizado pela formação de tecido fibroso a qual foi atenuada com o emprego de ultrassom, porém ainda contra-indicada nesse tipo de reparo ósseo. Tal formação, provavelmente, ocorreu devido ao acúmulo de medicamento proporcionado pela geometria porosa, evidenciado também pelas análises de microscopia eletrônica.

5 CONCLUSÕES

A partir da realização dessa pesquisa foi possível concluir que:

- A ação dos scaffolds processados via DMLS na remodelação óssea não foi efetiva, sendo que nesse caso a geometria dos poros não induziu o crescimento. Um elevado grau de impurezas foi constatado nesse caso após a análise por EDS;
- Após o tratamento térmico dos scaffolds se observou maior interação tecidual ocorrendo a influência da porosidade no crescimento ósseo. Nessa caso, houve uma diminuição significativa no teor das impurezas na superfície o que pode ter contribuído para esse resultado.
- A imersão em solução SBF após tratamento alcalino levou a formação de apatita sobre a superfície de forma homogênea. No entanto, para imobilização do alendronato uma nova imersão em uma solução formado por SBF e o medicamento por 5 dias foi necessária. A partir da microscopia eletrônica foi constatado que devido a alta afinidade desse medicamento com o cálcio ocorreu uma dissociação da apatita formada e agregação do material na superfície. Esse resultado influi diretamente nos estudos in vivo. Os dados microtomográficos quantitativos apresentaram melhor resposta na formação de tecido ósseo novo, porém as análises histológicas demonstraram que esse tecido cresceu na direção externa ao implante, indicando que as concentrações dos medicamentos dentro dos poros dos scaffolds serviram como uma barreira para o crescimento interno do novo tecido osso.
- Os resultados apontam para a eficiência do uso do ultrassom terapêutico de baixa intensidade como um método adjuvante para acelerar o processo de reparo ósseo através da ativação da proliferação do tecido ósseo para todos os grupos avaliados. A associação do uso ultrassom terapêutico com a transmissão no modo pulsado nas frequências de 1MHz e 3MHz, ciclo 1:5 e intensidade SATA 30mW/cm² no tempo de aplicação de 10 minutos não produziram nessa pesquisa nenhum sinal deletério de morte celular. Corroborando outras pesquisas que não apontam como contra indicação o uso dessa terapêutica a portadores de próteses metálicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU e LIMA, C. E. et al. **Revisão da metodologia para desenvolvimento de matéria prima para impressão tridimensional**. Revista CIATEC – UPF, Passo Fundo, vol.4 (1): 33-47, 2012.
- ALBREKTSSON, T., et al. **Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man**. Stockholm 1981. Acta Orthop Scand. 52(2):155-70.
- ALVES-CLARO, A.P. et al. **Histological Analysis of the Osseointegration of Ti-30Ta Dental Implants After Surface Treatment**. Chapter Characterization and Development of Biosystems and Biomaterials. Volume 29 of the series Advanced Structured Materials pp175-181, 2012.
- ALVES-REZENDE, M. Cristina Rosifini. **Tratamento de Superfície de Implantes Dentários: SBF**. Revista Odontológica de Araçatuba, v.32, n.2, p. 38-43, Julho/Dezembro, 2011.
- ANDRADE, M. C. et al. **Microstructure of ceramic coating on titanium surface as a result hydrothermal treatment**. J MaterSciMater Med. 2000;11: 751-5. 4.
- ANDREUCCI, R. **Ensaio por Ultra-Som**.
<http://www.iem.unifei.edu.br/professores/edmilson/US.pdf>
- ANTAS, A. F. F. **Utilização das Tecnologias de Prototipagem Rápida na área médica**. 2007. Dissertação de Mestrado. Departamento de Engenharia Mecânica e Gestão Industrial da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.
- APARECIDA, A. H. **Recobrimento de apatitas empregando-se o método biomimético: estudo da influência dos íons K⁺, Mg²⁺, SO₄²⁻ e HCO₃⁻ na formação de hidroxiapatita**. 2006. 116 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, 2006.
- APOLINÁRIO, J. de C., COELHO, W. M. D., LOUZADA, M. J. Q. **Análise da influência do ultrassom de baixa intensidade na região de reparo ósseo em ratos sob ausência de carga**. Fisioterapia e Pesquisa, São Paulo, v.18, n.3, p. 275-9, jul/set. 2011 ISSN 1809-2950.
- AZUMA, Y. et al. **Low-intensity pulsed ultrasound accelerates rat femoral fracture healing by acting on the various cellular reactions in the fracture callus**. J Bone Miner Res. 2001 Apr; 16(4):671-80.
- BARROCA, N. B. **Scaffolds à base de polímeros piezoelétricos para regeneração óssea**. Dissertação (Mestrado). Universidade de Aveiro - Departamento de Engenharia Cerâmica e Do vidro. 2008.
- BARRERE, F. et al. **Influence of ionic strength and carbonate on the Ca-P coating formation from SBFx5 solution**. Biomaterials, Bruxelas, v. 23, n. 9, p. 1921-1930, maio. 2002.

BERTOL, L. S. et al. **Projeto, fabricação e avaliação de implantes craniofaciais personalizados: proposta de utilização de materiais combinados.** Revista Brasileira de Engenharia Biomédica, Rio de Janeiro, v. 26, n. 2, p. 79-89, agosto 2010.

BORGES, F. dos S. Modalidades Terapêuticas nas disfunções estéticas. São Paulo: Phorte, 2006.

Boyan, B. D. et al. **Osteoblasts generate an osteogenic microenvironment when grown on surfaces with rough micro-topographies.** Eur Cell Mater.2003; 6: 22-7.

BRANDÃO, M. L. de. et al. **Superfície dos implantes osseointegrados x resposta biológica.** Revista Implant news, 7(1):95-101, 2010.

BRITTO, C. E. S. et al. **Influência da orientação de prototipagem no comportamento mecânico de componetes produzidos por sinterização direta a laser de metais (DMLS).** 21º CBECIMAT - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2014, Cuiabá, MT, Brasil.

BUSQUIM, T. de P. **Estudo in vitro e in vivo da osseointegração de implantes de titânio com superfície biomimetizadas.** São Carlos: UFScar, 2012. 125f.

CARVALHO, L. M. F. **Avaliação de implantes dentários da liga experimental Ti-30Ta após tratamento de superfície biomimético e imobilização com bisfosfonato.** 2013. 69 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, 2013. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/90784>>.

CASTRO, L. F. **Bifosfonatos (Bfs) como transportadores osteotrópicos no planejamento de fármacos dirigidos.** Quim. Nova, Vol. 27, No. 3, 456-460, 2004

CAPELLATO, P. et al. **Interaction between mesenchymal stem cells and Ti-30Ta alloy after surface treatment.** J Biomed Mater Res Part A 2014;102A:2147-2156.

CESAR, R., et al. **Sciverse Science Direct.**Procedia Engineering 59 (6-15), 2013.

CLAES, L. e WILLIE B. **The enhancement of bone regeneration by ultrasound.**ProgBiophys Mol Biol, Jan-Apr; 93(1-3): 384-98, 2007.

COSTA, T. C. da. **Avaliação da interface osso- implante em superfície de Ti6Al4V e do Aço ISO5832-9 tratadas eletroquimicamente.** Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Paraná - Curitiba, 2012.

CUNHA, P. T. S. da. et al.**Fratura de quadril em idosos: tempo de abordagem cirúrgica e sua associação quanto a delirium e infecção.** Acta Ortop. Bras. vol.16 (3): 173-176, 2008.

DAMY, S. B. et al. **Aspectos fundamentais da experimentação animal - aplicações em cirurgia experimental.** Rev. Assoc. Med. Bras. 56(1); 103-11. São Paulo, 2010.

DIAS, R. C. M. **Síntese, caracterização e avaliação preliminar de citotoxicidade da matriz porosa de nanocompósito biodegradável.** 2006. 108 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas, 2006.

DUARTE, L. R. **The Stimulation of bone growth by ultrasound.** Archives of Orthopaedic and Traumatic Surgery. 101; 153-159; 1983.

EL-GHANNAM, A. **Bone reconstruction: from bioceramics to tissue engineering.** Expert Rev Med Devices. 2005 Jan; 2(1): 87-101.

ESCADA, A. L. A., et al. **Surface characterization of Ti-7.5Mo alloy modified by biomimetic method.** Surface & Coatings Technology. Lausanne: Elsevier B.V. Sa, v. 205, n. 2, p. 383-387, 2010. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/9391>>.

FARCIC, T. S. **Efeitos de diferentes tempos de aplicação do ultrassom terapêutico no tratamento de tendão de ratos no processo de reparação tecidual.** 2011. Dissertação de mestrado. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

GARTNER, L. P. e HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em Cores.** 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

GOIA, T. S. **Implantes porosos à base de titânio, avaliação in vitro e in vivo.** 2013, 115 f. Tese (Doutorado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN). São Paulo, 2013.

GOMES, R. R. A. D. **Metodologia para detecção de porosidade central em tarugos de lingotamento contínuo.** 2011. Dissertação de Mestrado. Faculdade Engenharia Metalúrgica e de Minas, Universidade Federal de Minas Gerais – Belo Horizonte.

GRAVINA, P. A. **Biomimetização de diferentes superfícies de titânio com fibronectina.** 2010, 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Materiais). Instituto Militar de Engenharia. Rio de Janeiro, 2010.

GREGOLIN, R. G. et al. **Comparação entre propriedades mecânicas e microestruturais da liga Ti-6Al-4V, trabalhada a frio versus prototipagem por sinterização direta a laser de metal.** COLAOB, 2012.

GUASTALDI, A. C., APARECIDA, A. H., **Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos.** Quím. Nova, vol. 33, no. 6. São Paulo, 2010.

GUILLOT, R. et al. **The stability of BMP loaded polyelectrolyte multilayer coatings on titanium.** Biomaterials, 2013; 34(23): 5737-46.

GUIRRO, E. C. de O.; GUIRRO, R. R. de J. **Fisioterapia Dermatofuncional: Fundamentos, Recursos e Patologias.** 3 ed. Barueri: Manole, 2004. 584 p.

GUSMÃO, C. V. B. et al. **A influência do estímulo mecânico na expressão da quinase de adesão focal no osso in vivo.** Rio de Janeiro, 2007. Rev. Matéria 12(3), 470-479.

GUSMÃO, C. V. B., BELANGERO, W. D. Como a célula óssea reconhece o estímulo mecânico? **Revista Brasileira de Ortopedia.** 2009; 44(4):299-305

HABIBOVIC, P. et al. **BiomimeticHydroxyapatiteCoatingon Metal Implants.** Journal ofthe American Ceramic Society, Holanda, v.85, n.3, p.517-522, mar.2002.

HENCH, L. Biomateriais: uma introdução. In: ORÉFICE, R. L., MAGALHÃES, M. M., MANSUR, H. S. (eds). **Biomateriais: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. p. 1-7.

HOFFMANN, W. et al. Rapid prototyped porous nickel–titanium scaffolds as bone substitutes, **Journal of Tissue Engineering**, Volume 5: 1–14, 2014.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Perfil dos Idosos Responsáveis pelos Domicílios – Censo 2000. Brasília, 2002. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/perfilidoso/perfilidosos2000.pdf>>

INTROINI, S. O. **Avaliação do reparo tecidual em defeito ósseo por microtomografia tridimensional por Raio X**. (Dissertação) Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

IPAR, 2012- Revista CIATEC – UPF, vol.4 (1), p.p.33-47, 2012.

JORGE, F. A. J. **Influência da estimulação ultrassônica de baixa intensidade no reparo de osteotomias de tíbias com fixação flexível**. Dissertação (Mestrado). São Carlos: Escola de Engenharia; Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. 2004.

JUDAS, F. et al. **Estrutura e dinâmica do tecido ósseo** (2012). Disponível em: <http://rihuc.huc.min-saude.pt/bitstream/10400.4/1346/1/TECIDO%20%C3%93SSEO%20.pdf>

JUNQUEIRA L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2004.

KEDE, M. P. V.; SABATOVICH, O. (Org.). **Dermatologia Estética**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004.

KHAJURIA, D. K; RAZDAN. R; MAHAPATRA, D. R. **Medicamentos para o tratamento da osteoporose: revisão**. Rev. Bras. Reumatologia. Vol. 51, nº 4. São Paulo, jul./ago. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0482-50042011000400008>>

KIM, C.W. et al. **In situ fabrication of alendronato-loaded calcium phosphate microspheres: Controlled release for inhibition of osteoclastogenesis**. Journal of Controlled Release, 147(2010) 45-53.

KIM, H.M.et al. **Preparation of bioactive ti and its alloys via simple chemical surfaces**. Journal of Biomedical Materials Research, Cleveland, v.32, n,3, p.409-417, nov.1996.

KIMAID, M. I. E. **Crescimento da nanoapatita na liga Ti-30Ta para aplicações odontológicas**. Dissertação (Mestrado). 2010. 79f. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá.

KOCAOGLU, B. et al. **The Effect of Therapeutic Ultrasound on Metallic Implants: A Study in Rats**. ArchPhysMedRehabil.Vol.92, November 2011.

LEITE, V.L. **Estudo comparativo do efeito do ultrassom de 1Mhz com frequência de repetição de pulso de 100Hz e 16Hz no tratamento de fratura de fíbula de rato**. 2005. 75f. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, São Paulo, 2005.

LIRANI, A. P. R.; LAZARETTI-CASTRO, M. **Evidências da ação de agentes físicos sobre o metabolismo do tecido ósseo e seus potenciais usos clínicos**. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia. Vol. 49, nº 6. São Paulo, dez. 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27302005000600006>>

LOBATO, R. **Efeitos do ultrassom terapêutico na prevenção de aderências tendíneas**. Dissertação (Mestrado). São Carlos: Escola de Engenharia; Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo 2002.

LÓPEZ, J. C. R. R. **Avaliação histomorfométrica do percentual de osseointegração ao redor de implantes recobertos por hidroxiapatita por meio de dois métodos de secção histológica**. 2007, 88 f. Dissertação (Mestrado). Universidade do Grande Rio Prof. José de Souza Herdy. Escola de Odontologia. Duque de Caxias (RJ), 2007.

LU, H. et al. **Effects of low-intensity Pulsed ultrasound on new trabecular bone during bone-tendon junction healing in a rabbit model: A Synchrotron Radiation Micro-CT study**. PLOS ONE/DOI:10.1371/ Journal.pone.0124724 April 15, 2015.

MACÊDO, M. O. C., et al. **Estudo da porosidade de arcabouços de Ti-NB₂O₅-SN para aplicação biomédica**. Revista Brasileira de Inovação Tecnológica em Saúde. 2011.

MACHADO, A. C. P. **Biocompatibilidade in vivo de implantes de titânio submetidos ao processo biomimético**. 2008, 138 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP; 2008.

MARIOTTI, A. **Bisphosphonates and Osteonecrosis of the Jaws**. Journal of Dental Education. Vol. 72, Number 8 (929-939), August 2008.

MARQUES, L. C.; TEIXEIRA, G. F. D.; BRASIL, A. C. O. **Efeitos do ultrassom pulsado de baixa intensidade na regeneração óssea**. Saúde em Diálogo, v. 1, n. 1, p. 46-58. Fortaleza, Jul-Dez, 2010.

MASSARI, L. et al. **Pulsed electromagnetic fields and low intensity pulsed ultrasound in boné tissue**. Clinical Cases in mineral and Bone Metabolism 2009; 6 (2): 149-154

MASTROGIACOMO, M. et al. **Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics**. Biomaterials, v.27, p. 3230-37, 2006.

MATHEUS, C. P. **Avaliação do composto ósseo de Ricinus (C.O.R.) granulado e Hidroxiapatita (HAP-91) na osteointegração. Estudos: histológico, morfométrico e densitométrico**. Tese (Doutorado). 2013, 84 f. Universidade de São Paulo. Escola de Engenharia de São Paulo. São Carlos, 2013.

MATOS, P. S. **Avaliação de parâmetros ultrassônicos utilizados na caracterização de tecidos ósseos**. Ribeirão Preto, 2006. 256p. Tese (Doutorado) Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto./USP.

MAYR, E. **More rapid recovery after fracture. When can ultrasound accerate healing?** Interview by Petra Eiden. MMW Fortschr Med 142(35): 10. 2000.

MCARDLE, W. D.; KATCH, V. L. **Fisiologia do Exercício**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

MEIRA, P. S. et al. **Avaliação histológica e histomorfométrica do reparo ósseo em tíbias osteotomizadas de ratos (*rattusnovergicusalbinus*), submetidas a tratamento com ultrassom, frente à presença e ausência de carga**. Vet. e Zootec. 2010 dez 17(4): 528-540.

MEURER, Maria Inêset al. **Aquisição e manipulação de imagens por tomografia computadorizada da região maxilofacial visando à obtenção de protótipos biomédicos**. Radiol. Bras. vol. 41(1). São Paulo. Jan/Fev. 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-39842008000100013>

MOREIRA, M. S. et al. **Cytotoxicity analysis of alendronate on cultured endothelial cells and subcutaneous tissue**. A pilot study. Dent Traumatol 2005; 21:329–335. Blackwell Munksgaard, 2005.

NISHIGUCHI, S. et al. **Alkali and heattreated porous titanium for orthopedic implants**. J Biomed Mater Res. 2001; 54(2):198-208.

NOURI, A.; HODGSON, P. D.; WEN, C. **Biomimetic Porous Titanium Scaffolds for Orthopedic and Dental Applications**. Biomimetics Learning from Nature. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/biomimetics-learning-from-nature/biomimetic-porous-titanium-scaffolds-for-orthopedic-and-dental-applications>.

OLIVEIRA, J. A. G. de. **Efeito do tratamento de superfície na osseointegração de implantes dentários da liga Ti-7,5Mo**. 2012. 77 p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, 2012.

OLIVEIRA, L. S. A. F. et al. **Biomateriais com Aplicação na Regeneração Óssea. Método de Análise e Perspectivas Futuras**. Revista de Ciências Médicas e Biológicas. v. 9(1), 37-44. 2010. Disponível em: <<http://www.portalseer.ufba.br/index.php/cmbio/article/view/4730/3503>>

OLIVEIRA, L. Y. S. de. **Modificação da superfície do Ti6Al4V com tratamento SMAT e revestimento DLC: Estudos tribológicos e caracterização de fragmentos**. 2013, 140 f. Tese (Doutorado). Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2013.

OLIVEIRA, M. V. de. **Desenvolvimento de revestimento poroso de titânio para implantes cirúrgicos**. 2003, 185 p. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, 2003.

OLSSON. D. C. et al. **Comportamento biológico de matriz scaffold acrescida de células progenitoras na reparação óssea**. Ciência Rural, Santa Maria, v.38, n.8, p.2403-12, Nov, 2008.

OREFICE, R. L. et al. **Biomateriais - Fundamentos e Aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006.

PALLAROLAS, E. A. F. F. **Revisão técnica de processos de manufatura aditiva e estudo**

de configurações geométricas para estruturas de impressoras tridimensionais. Monografia (Graduação em Engenharia Mecânica). Escola de Engenharia de São Carlos - USP -2013.

PAOLILLO, A. R. **Avaliação por Microtomografia de Raio-X de reparo ósseo em osteotomia completa de tíbia de ratos após tratamento com ultrassom de baixa intensidade e Laser de baixa potência.** 2013. 129p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

PIATELLI, A. et al. **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; 13: 805-10

PILLA, A. et al. **Non-Invasive Low-intensity Pulsed Ultrasound Accelerates Bone Healing in the Rabbit.** Journal Orthopaedic and Trauma. 4: 246-253, 1990.

POUNDER, N. M., HARRISON, A. J. **Low intensity pulsed ultrasound for fracture healing: a review of the clinical evidence and the associated biological mechanism of action.** Ultrasonics. Aug 48(4):330-8. 2008.

QUINN, R. **Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years?** Nutrition, v. 21, n. 6, p. 775-7. Jun, 2005.

RAMAKRISHNA, S. et al. **An Introduction to Biocomposites.** In Series on Biomaterials & Bioengineering: Vol. 1. London, Imperial College Press, 2004.

RIGO, E. C. S., et al. **Implantes metálicos recobertos com hidroxiapatita.** Revista Brasileira de Engenharia Biomédica, v.15, n.1-2, p.21-29, jan/ago 1990.

ROCHA, T. L. da. **Resistência à corrosão eletroquímica da liga Ti-6Al4V prototipada para aplicações biomédicas.** 2013. 87 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, 2013.

RODRIGUES, M.B. **Diagnóstico por imagem no trauma músculo- esquelético-princípios gerais.** Ver. Med (São Paulo). 2011 out-dez.; 90(4): 185-94.

ROQUE, W. L. **Caracterização da Estrutura do Osso Trabecular a Partir de Imagens.** In: ANDRADE, A. O. et al (org.). Tecnologias, Técnicas e Tendências em Engenharia Biomédica. XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, Uberlândia, 2014.

ROSS, M. H. e PAWLINA, W. **Histologia: Texto e Atlas: em Correlação Com Biologia Celular e Molecular.** [revisão técnica Jorge Mamede de Almeida; tradução: Antonio Francisco Dieb Paulo, Fernando Diniz Mudim, José Eduardo Ferreira de Figueiredo]. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan; Buenos Aires [Argentina]: Ed. Panamericana, 2008.

RUIZ, S. L. M. **Processamento, caracterização microestrutural e propriedades elásticas de metais celulares do sistema Ti6Al4V para fins de regeneração óssea.** 2014. Tese (Doutorado) Programa de Pós- Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais. UNESP-Bauru – São Paulo.

RYAN, G.; PANDIT, A.; APATSIDIS, D. P. **Fabrication methods of porous metals for use in orthopaedic applications.** *Biomaterials*. 27(13):2651-70. 2006, May.

SALES, E. S. **Estudo da qualidade óssea através das técnicas de microtomografia e microfluorescência de Raio X.** 2010, 206 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio de Janeiro - COPPE. Rio de Janeiro, 2010.

SARGEANT, T. D. et al. **Titanium foam-bioactive nanofiber hybrids for bone regeneration.** *J Tissue Eng Regen Med*. 2008 Dec; 2(8):455-62.

SENA, K. et al. **Early gene response to low-intensity pulsed ultrasound in rat osteoblastic cells.** *Ultrasound Med Biol*. 2008; 31(5):703-8.

SHANBHAG, A. S. **Use of Bisphosphonates to Improve the Durability of Total Joint Replacements.** *J Am Acad Orthop Surg*, 2006; 14:215-225.

SILVA, S. N. et al. **Desenvolvimento de recobrimentos biativos sobre ligas metálicas (aço inoxidável 316 e titânio).** *Revista Unilestemg*, v.1/n.1 jan/jun. 2004. <http://www.unilestemg.br/revistaonline/index.html>

SU, W.T. **Manufatura aditiva da liga Ti-6Al-4V aplicada em uma biela automotiva.** 2013. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, 2013.

TABATA, Y. **Biomaterial technology for Tissue engineering applications.** *Journal of the royal society interface*, London, v.6,n.3,p.311-324, 2009.

TAKEBE, H. et al. **Effect of low intensity pulsed ultrasound stimulation on sinus augmentation in rabbits.** *Clinical Oral Implants Research*. 2014; 25(6): 735-741. doi:10.1111/clr.12136.

TIM, C. R. **Efeitos do Laser de Baixa Intensidade e do Scaffold de Biosilicato® no Processo de Reparação Óssea.** 2011, 80 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de São Carlos, 2011.

TURRER, C. L., FERREIRA, F. P. M. **Biomateriais em cirurgia craniomaxilofacial: Princípios básicos e aplicações - Revisão de literatura.** *Rev. Bras.Cir. Plást.* 23(3): 234-9, 2008.

VERCIK, L. C. de O. et al. **Recobrimento de apatitas "in vitro" sobre titânio: influência do tratamento térmico.** *Eclética Química*, v. 28, n. p. 25-31. 2003.

WANG, X. et al. **Biomimetic modification of porous TiNbZr alloy scaffold for bone tissue engineering.** *Tissue Engineering: part A*, vol. 16, no. 1, pp. 309-316. 2010.

WANG, Y, et al. **Development of highly porous titanium scaffolds by selective laser melting.** *Materials Letters*, 2010; 64: 674-676.

WIEDING, J. et al. **The Effect of Structural Design on Mechanical Properties and Cellular Response of Additive Manufactured Titanium Scaffolds.** *Materials*, 2012; 5: 1336-1347.

WILLIAMS, D. F. **Biofunctionality and Biocompatibility**. In: CAHN, R. W.; HAASEN, P.; KRAMER, E. J. (org.). Materials Science and Technology 14. Medical and Dental Materials. VHC Germany, 1992.

WILLIAMS, D. F. **Definitions in Biomaterials: Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials**. Amsterdam: Elsevier. v.4, chap.6, p.49-59. 1986.

XUE, W. et al. **In vivo evaluation of plasma-sprayed titanium coating after alkali modification**. Biomaterials, 26:3029-37, 2005.

YOUNG, S. **Terapia por ultrassom**. KITCHEN, S.; BAZIN, S. Eletroterapia de Clayton. 10.ed. São Paulo: Manole, 1998.

ANEXO A – Comitê de ética em pesquisa



FUNDAÇÃO EDUCACIONAL D. ANDRÉ ARCOVERDE
CENTRO DE ENSINO SUPERIOR DE VALENÇA
NÚCLEO BIOMÉDICO

COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº **CEUA/08/2014** sobre “Estudo do Processo de Reparo ósseo em implantes de Ti6AL4V sinterizados pela tecnologia de sinterização direta de metais a Laser (DMLS) submetidos à tratamento de superfície Biomimétrico e associado à Aplicação de Ultrassom de baixa intensidade , sob a responsabilidade de Jaqueline Silva Bastos, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Centro de Ensino Superior de Valença da Fundação Educacional Dom André Arcoverde, em **30/11/2014**.

Valença/RJ, 30 de novembro de 2014.

Prof. Rodrigo Neto Ferreira
Presidente do CEUA
Núcleo Biomédico
CESVA-FAA

Anexo B – Grupo Piloto – DMLS. Controle Radiográfico das Fases de Reparo Ósseo (Formação do Calo)

Grupo Piloto - DMLS

CONTROLE RADIOGRÁFICO DAS FASES DE REPARO ÓSSEO (FORMAÇÃO DO CALO)

- FASE INFLAMATÓRIA (7 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)
- FASE PROLIFERATIVA (14 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)
- FASE REMODELATIVA (21 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)

GP1	RATOS COM IMPLANTE DO SUPORTE DMLS (3 A 4 MESES - PESO CORPORAL 350 - 400G)		
	R1	R2	R3
7º DIA			
14º DIA			
21º DIA			

NOTA DE RODAPÉ

GP1. RATOS COM IMPLANTE DO SUPORTE DMLS
R1. RATO MAIS SUA REFERÊNCIA

Anexo C – Grupo Piloto – Tratamento Térmico. Controle Radiográfico das Fases de Reparo Ósseo (Formação do Calo)

Grupo Piloto - Tratamento Térmico

CONTROLE RADIOGRÁFICO DAS FASES DE REPARO ÓSSEO (FORMAÇÃO DO CALO)

- FASE INFLAMATÓRIA (7 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)
- FASE PROLIFERATIVA (14 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)
- FASE REMODELATIVA (21 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)

GP2	RATOS COM IMPLANTE - TRATAMENTO TÉRMICO (3 A 4 MESES - PESO CORPORAL 350 - 400g)		
	R1	R2	R3
7º DIA			
14º DIA			
21º DIA			

NOTA DE RODAPÉ

GP2. RATOS COM IMPLANTE - TRATAMENTO TÉRMICO
R1. RATO MAIS SUA REFERÊNCIA

Anexo D – Grupo Piloto – Biomimético Alcalino. Controle Radiográfico das Fases de Reparo Ósseo (Formação do Calo)

Grupo piloto - Biomimético Alcalino			
CONTROLE RADIOGRÁFICO DAS FASES DE REPARO ÓSSEO (FORMAÇÃO DO CALO)			
• FASE INFLAMATÓRIA (7 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO) • FASE PROLIFERATIVA (14 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO) • FASE REMODELATIVA (21 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)			
GP3	RATOS COM IMPLANTE DO SUPORTE PRODUZIDO DMLS, TRATADO TÉRMICO E IMERSÃO AQUOSA DE NaOH (3 A 4 MESES - PESO CORPORAL 350 - 400G)		
	R1	R2	R3
7º DIA			
14º DIA			
21º DIA			
NOTA DE RODAPÉ GP3. RATOS COM IMPLANTE DO SUPORTE PRODUZIDO DMLS, TRATADO TERMICO E IMERSÃO AQUOSA DE NaOH R1. RATO MAIS SUA REFERÊNCIA			

Anexo E – Grupo Piloto – Biomimético SBF5x. Controle Radiográfico das Fases de Reparo Ósseo (Formação do Calo)

Grupo Piloto - Biomimético SBF5x

CONTROLE RADIOGRÁFICO DAS FASES DE REPARO ÓSSEO (FORMAÇÃO DO CALO)

- FASE INFLAMATÓRIA (7 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)
- FASE PROLIFERATIVA (14 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)
- FASE REMODELATIVA (21 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)

GP4	RATOS COM IMPLANTE DO SUPORTE PRODUZIDO DMLS E TRATAMENTO TÉRMICO E IMERSÃO AQUOSA DE NaOH E SBF 5X (3 A 4 MESES - PESO CORPORAL 350 - 400G)		
	R1	R2	R3
7º DIA			
14º DIA			
21º DIA			

NOTA DE RODAPÉ

GP4. RATOS COM IMPLANTE DO SUPORTE PRODUZIDO DMLS E TRATAMENTO TÉRMICO E IMERSÃO AQUOSA DE NaOH E SBF 5X

R1. RATO MAIS SUA REFERÊNCIA

Anexo F – Grupo Piloto – Biomimético incorporado Alendronato de Sódio. Controle Radiográfico das Fases de Reparo Ósseo (Formação do Calo)

Grupo piloto - Biomimético incorporado Alendronato de Sódio

CONTROLE RADIOGRÁFICO DAS FASES DE REPARO ÓSSEO (FORMAÇÃO DO CALO)

- FASE INFLAMATÓRIA (7 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)
- FASE PROLIFERATIVA (14 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)
- FASE REMODELATIVA (21 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)

GP5	RATOS COM IMPLANTE DO SUPORTE PRODUZIDO DMLS, TRATAMENTO TÉRMICO, IMERSÃO AQUOSA DE NaOH, SBF 5X E ALENDRONATO DE SÓDIO (3 A 4 MESES - PESO CORPORAL 350 - 400G)		
	R1	R2	R3
7º DIA			
14º DIA			
21º DIA			

NOTA DE RODAPÉ

GP5. RATOS COM IMPLANTE DO SUPORTE PRODUZIDO DMLS, TRATAMENTO TÉRMICO, IMERSÃO AQUOSA DE NaOH, SBF 5X E ALENDRONATO DE SÓDIO

R1. RATO MAIS SUA REFERÊNCIA

Anexo G – Grupo de ratos sem implante e sem ultrassom – Controle Radiográfico das Fases de Reparo Ósseo (Formação do Calo)

GE1A - Grupo de ratos sem implante e sem ultrassom.

CONTROLE RADIOGRÁFICO DAS FASES DE REPARO ÓSSEO (FORMAÇÃO DO CALO)

- FASE INFLAMATÓRIA (7 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)
- FASE PROLIFERATIVA (14 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)
- FASE REMODELATIVA (21 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)

GE1A	RATOS JOVENS IMPLANTE E SEM ULTRASSOM CONTROLE (3 A 4 MESES - PESO CORPORAL 350 - 400G)		
	R1	R2	R3
7º DIA			
14º DIA			
21º DIA			

NOTA DE RODAPÉ

GE1A. RATOS SEM IMPLANTE E SEM ULTRASSOM
R1. RATO MAIS SUA REFERÊNCIA

Anexo H – Grupo de ratos sem implante submetido a ultrassom 1MHz – Controle Radiográfico das Fases de Reparo Ósseo (Formação do Calo)

GE1B - Grupo de ratos sem implante submetido à ultrassom 1MHz.

CONTROLE RADIOGRÁFICO DAS FASES DE REPARO ÓSSEO (FORMAÇÃO DO CALO)

- FASE INFLAMATÓRIA (7 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)
- FASE PROLIFERATIVA (14 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)
- FASE REMODELATIVA (21 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)

GE1B	RATOS SEM IMPLANTE E SUBMETIDO AO TRATAMENTO DE ULTRASSOM COM FREQUÊNCIA 1MHz (3 A 4 MESES - PESO CORPORAL 350 - 400g)		
	R1	R2	R3
7º DIA			
14º DIA			
21º DIA			

NOTA DE RODAPÉ

GE1B. RATOS SEM IMPLANTE COM ULTRASSOM 1MHz
R1. RATO MAIS SUA REFERÊNCIA

Anexo I – Grupo de ratos sem implante submetido a ultrassom 3MHz – Controle Radiográfico das Fases de Reparo Ósseo (Formação do Calo)

GE1C - Grupo de ratos sem implante submetido à ultrassom 3MHz.

CONTROLE RADIOGRÁFICO DAS FASES DE REPARO ÓSSEO (FORMAÇÃO DO CALO)

- FASE INFLAMATÓRIA (7 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)
- FASE PROLIFERATIVA (14 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)
- FASE REMODELATIVA (21 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)

GE1C	RATOS SEM IMPLANTE E SUBMETIDO AO TRATAMENTO DE ULTRASSOM COM FREQUÊNCIA 1MHz (3 A 4 MESES - PESO CORPORAL 350 - 400g)		
	R1	R2	R3
7º DIA			
14º DIA			
21º DIA			

NOTA DE RODAPÉ

GE1C. RATOS SEM IMPLANTE COM ULTRASSOM 3MHz.
R1. RATO MAIS SUA REFERÊNCIA

Anexo J – Grupo de ratos com implante do suporte DMLS – Controle Radiográfico das Fases de Reparo Ósseo (Formação do Calo)

GE2A - Grupo de ratos com implante do suporte DMLS

CONTROLE RADIOGRÁFICO DAS FASES DE REPARO ÓSSEO (FORMAÇÃO DO CALO)

- FASE INFLAMATÓRIA (7 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)
- FASE PROLIFERATIVA (14 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)
- FASE REMODELATIVA (21 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)

GE2A	RATOS COM IMPLANTE DO SUPORTE DMLS (3 A 4 MESES - PESO CORPORAL 350 - 400G)		
	R1	R2	R3
7º DIA			
14º DIA			
21º DIA			

NOTA DE RODAPÉ

GE2A. RATOS COM IMPLANTE DO SUPORTE DMLS
R1. RATO MAIS SUA REFERÊNCIA

Anexo K – Grupo de ratos com implante do suporte DMLS submetido a ultrassom 1 MHz – Controle Radiográfico das Fases de Reparo Ósseo (Formação do Calo)

GE2B - Grupo de ratos com implante do suporte DMLS submetido à ultrassom 1MHz

CONTROLE RADIOGRÁFICO DAS FASES DE REPARO ÓSSEO (FORMAÇÃO DO CALO)

- FASE INFLAMATÓRIA (7 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)
- FASE PROLIFERATIVA (14 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)
- FASE REMODELATIVA (21 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)

GE2B	RATOS COM IMPLANTE DO SUPORTE DMLS SUBMETIDO À ULTRASSOM 1MHz (3 A 4 MESES - PESO CORPORAL 350 - 400G)		
	R1	R2	R3
7º DIA			
14º DIA			
21º DIA			

NOTA DE RODAPÉ

GE2B. RATOS COM IMPLANTE DO SUPORTE DMLS SUBMETIDO À TRATAMENTO DE ULTRASSOM 1MHz
R1. RATO MAIS SUA REFERÊNCIA

Anexo L – Grupo de ratos com implante do suporte DMLS submetido a ultrassom 3MHz – Controle Radiográfico das Fases de Reparo Ósseo (Formação do Calo)

GE2C - Grupo de ratos com implante do suporte DMLS submetido à ultrassom 3MHz

CONTROLE RADIOGRÁFICO DAS FASES DE REPARO ÓSSEO (FORMAÇÃO DO CALO)

- FASE INFLAMATÓRIA (7 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)
- FASE PROLIFERATIVA (14 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)
- FASE REMODELATIVA (21 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)

GE2C	RATOS COM IMPLANTE DO SUPORTE DMLS SUBMETIDO À ULTRASSOM 3MHz (3 A 4 MESES - PESO CORPORAL 350 - 400G)		
	R1	R2	R3
7º DIA			
14º DIA			
21º DIA			

NOTA DE RODAPÉ

GE2C. RATOS COM IMPLANTE DO SUPORTE DMLS SUBMETIDO À TRATAMENTO DE ULTRASSOM 3MHz
R1. RATO MAIS SUA REFERÊNCIA

Anexo M – Grupo de ratos com implante do suporte DMLS e tratamento térmico – Controle Radiográfico das Fases de Reparo Ósseo (Formação do Calo)

GE3A - Grupo de ratos com implante do suporte DMLS e tratamento térmico

CONTROLE RADIOGRÁFICO DAS FASES DE REPARO ÓSSEO (FORMAÇÃO DO CALO)

- FASE INFLAMATÓRIA (7 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)
- FASE PROLIFERATIVA (14 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)
- FASE REMODELATIVA (21 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)

GE3A	RATOS COM IMPLANTE - TÉRMICO SEM ULTRASSOM (3 A 4 MESES - PESO CORPORAL 350 - 400g)		
	R1	R2	R3
7º DIA			
14º DIA			
21º DIA			

NOTA DE RODAPÉ

GE3A. RATOS COM IMPLANTE TÉRMICO SEM ULTRASSOM
R1. RATO MAIS SUA REFERÊNCIA

Anexo N – Grupo de ratos com implante do suporte DMLS e tratamento térmico submetido a ultrassom 1 MHz – Controle Radiográfico das Fases de Reparo Ósseo (Formação do Calo)

GE3B - Grupo de ratos com implante do suporte DMLS e tratamento térmico submetido à ultrassom 1MHz.

CONTROLE RADIOGRÁFICO DAS FASES DE REPARO ÓSSEO (FORMAÇÃO DO CALO)

- FASE INFLAMATÓRIA (7 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)
- FASE PROLIFERATIVA (14 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)
- FASE REMODELATIVA (21 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)

GE3B	RATOS COM IMPLANTE - TÉRMICO SUBMETIDO AO TRATAMENTO DE ULTRASSOM COM FREQUÊNCIA 1MHz (3 A 4 MESES - PESO CORPORAL 350 - 400g)		
	R1	R2	R3
7º DIA			
14º DIA			
21º DIA			

NOTA DE RODAPÉ

GE3B. RATOS COM IMPLANTE - TÉRMICO SUBMETIDO À ULTRASSOM 1MHz
R1. RATO MAIS SUA REFERÊNCIA

Anexo O – Grupo de ratos com implante do suporte DMLS e tratamento térmico submetido a ultrassom 3 MHz – Controle Radiográfico das Fases de Reparo Ósseo (Formação do Calo)

GE3C - Grupo de ratos com implante do suporte DMLS e tratamento térmico submetido à ultrassom 3MHz.

CONTROLE RADIOGRÁFICO DAS FASES DE REPARO ÓSSEO (FORMAÇÃO DO CALO)

- FASE INFLAMATÓRIA (7 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)
- FASE PROLIFERATIVA (14 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)
- FASE REMODELATIVA (21 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)

GE3C	RATOS COM IMPLANTE - TÉRMICO SUBMETIDO AO TRATAMENTO DE ULTRASSOM COM FREQUÊNCIA 3MHz (3 A 4 MESES - PESO CORPORAL 350 - 400g)		
	R1	R2	R3
7º DIA			
14º DIA			
21º DIA			

NOTA DE RODAPÉ

GE3C. RATOS COM IMPLANTE - TÉRMICO SUBMETIDO À ULTRASSOM 3MHz
R1. RATO MAIS SUA REFERÊNCIA

Anexo P – Grupo de ratos com implante do suporte DMLS e tratamento com Alendronato de Sódio – Controle Radiográfico das Fases de Reparo Ósseo (Formação do Calo)

GE4A - Grupo de ratos com implante do suporte DMLS tratados com Alendronato de Sódio.

CONTROLE RADIOGRÁFICO DAS FASES DE REPARO ÓSSEO (FORMAÇÃO DO CALO)

- FASE INFLAMATÓRIA (7 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)
- FASE PROLIFERATIVA (14 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)
- FASE REMODELATIVA (21 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)

GE4A	RATOS COM IMPLANTE DO SUPORTE DMLS TRATADOS COM ALENDRONATO DE SÓDIO (3 A 4 MESES - PESO CORPORAL 350 - 400G)		
	R1	R2	R3
7º DIA			
14º DIA			
21º DIA			

NOTA DE RODAPÉ

G4A. RATOS COM IMPLANTE DO SUPORTE DMLS TRATADOS COM ALENDRONATO DE SÓDIO
R1. RATO MAIS SUA REFERÊNCIA

Anexo Q – Grupo de ratos com implante do suporte DMLS e tratamento com Alendronato de Sódio submetido a ultrassom 1MHz – Controle Radiográfico das Fases de Reparo Ósseo (Formação do Calo)

GE4B - Grupo de ratos com implante do suporte DMLS tratados com Alendronato de Sódio submetido a ultrassom 1MHz

CONTROLE RADIOGRÁFICO DAS FASES DE REPARO ÓSSEO (FORMAÇÃO DO CALO)

- FASE INFLAMATÓRIA (7 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)
- FASE PROLIFERATIVA (14 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)
- FASE REMODELATIVA (21 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)

GE4B	RATOS COM IMPLANTE DO SUPORTE DMLS TRATADOS COM ALENDRONATO DE SÓDIO SUBMETIDO A ULTRASSOM 1 MHz (3 A 4 MESES - PESO CORPORAL 350 - 400G)		
	R1	R2	R3
7º DIA			
14º DIA			
21º DIA			

NOTA DE RODAPÉ

GE4B. RATOS COM IMPLANTE DO SUPORTE DMLS TRATADOS COM ALENDRONATO DE SÓDIO SUBMETIDO À ULTRASSOM 1 MHz
R1. RATO MAIS SUA REFERÊNCIA

Anexo R – Grupo de ratos com implante do suporte DMLS e tratamento com Alendronato de Sódio submetido a ultrassom 3MHz – Controle Radiográfico das Fases de Reparo Ósseo (Formação do Calo)

GE4C - Grupo de ratos com implante do suporte DMLS tratados com Alendronato de Sódio submetido a ultrassom 3MHz

CONTROLE RADIOGRÁFICO DAS FASES DE REPARO ÓSSEO (FORMAÇÃO DO CALO)

- FASE INFLAMATÓRIA (7 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)
- FASE PROLIFERATIVA (14 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)
- FASE REMODELATIVA (21 DIAS APÓS O ATO CIRURGICO)

GE4C	RATOS COM IMPLANTE DO SUPORTE DMLS TRATADOS COM ALENDRONATO DE SÓDIO SUBMETIDO A ULTRASSOM 3 MHz (3 A 4 MESES - PESO CORPORAL 350 - 400G)		
	R1	R2	R3
7º DIA			
14º DIA			
21º DIA			

NOTA DE RODAPÉ

GE4C. RATOS COM IMPLANTE DO SUPORTE DMLS TRATADOS COM ALENDRONATO DE SÓDIO SUBMETIDO A ULTRASSOM 3 MHz
R1. RAT0 MAIS SUA REFERÊNCIA