



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

EVELYN LUZIA DE SOUZA SANTOS

**COMPARAÇÃO *IN VIVO* DA BIOCOMPATIBILIDADE
DE AMOSTRAS COM SUPERFÍCIE POROSA
CONFECCIONADAS COM DIFERENTES LIGAS DE
TITÂNIO**

2014

EVELYN LUZIA DE SOUZA SANTOS

**COMPARAÇÃO *IN VIVO* DA BIOCOMPATIBILIDADE DE AMOSTRAS
COM SUPERFÍCIE POROSA CONFECCIONADAS COM DIFERENTES
LIGAS DE TITÂNIO**

Dissertação apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós- Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Patologia.

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

São José dos Campos

2014

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José dos
Campos: ICT/UNESP; 2013.

S59c Santos, Evelyn Luzia de Souza

Comparação in vivo da biocompatibilidade de amostras com superfície porosa
confeccionadas com diferentes ligas de titânio / Evelyn Luzia de Souza Santos. -
São José dos Campos : [s.n.], 2014.
86 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) – Instituto de Ciência e Tecnologia
de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2014.
Orientador: Profª Drª Luana Marotta Reis de Vasconcellos.

1. Oosseointegração. 2. Ligas de titânio. 3. Módulo elástico. 4. Porosidade. I
Vasconcellos, Luana Marotta Reis de. II. Instituto de Ciência e Tecnologia de São
José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista. III. Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. IV. UNESP – Univ Estadual Paulista. V. Título

tD 74

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

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por
qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 03 de Fevereiro de 2014.

E-mail: evelynsousantos@gmail.com

Assinatura: _____



BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Luana Marotta Reis de Vasconcellos (Orientadora)

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

Prof^a Dr^a Heloisa Andréa Acciari

Faculdade de Engenharia
UNESP – Universidade Estadual Paulista
Campus de Guaratinguetá

Prof^a Titular Yasmin Rodarte Carvalho

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

São José dos Campos, 03 de fevereiro de 2014.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Jaime e Sueli**, por todo amor incondicional e carinho, dedicação e esforço para que eu conseguisse alcançar meus objetivos. Eles são meu exemplo de vida, determinação e coragem. Sei que mesmo longe de casa, eles estavam por perto me apoiando e incentivando para que tudo ocorresse da melhor forma possível.

Obrigada por tudo!!! Amo vocês!!

Às minhas irmãs, **Amanda e Ingrid**, pelo carinho e amizade, por sempre estarem comigo e sempre uma contando com apoio da outra.

Amo vocês!!

Ao **José Cláudio**, pelo amor e carinho, paciência e dedicação me dando força para não perder o equilíbrio nos momentos de dificuldade. Tê-lo presente nesta caminhada foi essencial para me mostrar que na vida temos que ter perseverança.

Amo você!!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço a **Deus** por esta conquista e graça realizada. Obrigada pela saúde, força e coragem para que eu pudesse enfrentar os momentos mais difíceis e nunca desistir. Obrigada Deus!

À minha orientadora, **Profª Drª Luana Marotta Reis de Vasconcellos**, agradeço todo o respeito e ensinamentos durante estes anos. Por dar todo suporte e incentivo nos momentos mais difíceis ao longo desses anos e por sempre acreditar e confiar em mim. Sei que foi mais que uma simples relação, orientadora e orientanda, foi o crescimento e fortalecimento de uma amizade que sempre levarei comigo. Com grande reconhecimento e admiração,
Muito Obrigada!!

À **Profª Titular Yasmin Rodarte Carvalho**, agradeço por ter me acolhido naquele primeiro momento, abrindo os caminhos e me dado oportunidade de iniciar na carreira acadêmica. Um exemplo de mestre a ser seguida, a qual tenho respeito e admiração.
Obrigada pela paciência, amizade e confiança.
Muito Obrigada!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Instituto de Ciência e Tecnologia, Campus São José dos Campos, na pessoa do Diretor **Profº Drº Carlos Augusto Pavanelli** e do vice-diretor **Profº Titular Estevão Tomomitsu Kimpára**, pela oportunidade de realização do curso de graduação e pós-graduação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, em especial a **Profª Adj. Juliana Campos Junqueira**, coordenadora do curso, pela amizade, exemplo profissional e dedicação a todos os discentes.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP)** pela concessão da bolsa de mestrado (Processo 2011/15342-9), pela bolsa de Iniciação Científica concedida a aluna Daiane Acacia Griti Bueno (Processo 2012/22158-2), pela concessão do Auxílio à Pesquisa que possibilitou aquisição dos materiais necessários para realização deste projeto (Processo 2012/20311-8) e consequentemente a concessão deste auxílio a concessão da bolsa de treinamento técnico a aluna Laís Siebra (Processo 2013/08323-3).

À **Profª Drª Renata Falchete do Prado**, com quem tive a primeira oportunidade de ser aluna de iniciação científica. Obrigada pelos ensinamentos, paciência, pelo apoio, atenção e colaboração em todos os momentos.

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

A toda equipe da Divisão de Materiais do IAE/DCTA, **Profº Drº Vinicius André Rodrigues Henriques, João Marcos Kruszynski de Assis, Miriam Auxiliadora Saldanha Laurindo, Dario Sumizo Yamagishi, José Luis de Oliveira (Gil), João Batista Rodrigues e Luis Príncipe Duarte** pelo apoio, disponibilidade e auxílio durante a fase de confecção das amostras utilizadas nesta pesquisa.

A todos os **docentes** do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, pela amizade e todos os ensinamentos transmitidos no decorrer da minha formação acadêmica.

Aos funcionários do biotério, **Antônio Domingos Barbosa Maia Vasconcelos e Michelle Faria Alves**, pela paciência e colaboração na fase experimental desta pesquisa.

Ao técnico do Laboratório de Apoio à Pesquisa, **Walter Cruz**, pela amizade e auxílio durante as etapas dos preparos histológicos.

À técnica do Laboratório Pesquisas de Materiais Dentários, **Thaís Cachuté Paradella**, pelo auxílio e paciência durante a utilização do Microscópio Eletrônico de Varredura.

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

Aos demais **funcionários** do Instituto de Ciência e Tecnologia, Campus São José dos Campos – UNESP, pela ajuda sempre que solicitados.

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

Ao **Carlos Guedes**, pela paciência e prontidão em nos ajudar nos processos FAPESP.

A minha amiga e aluna de mestrado, **Gabriela Esteves de Campos**, obrigada pelo companheirismo durante esses oito anos, paciência e compreensão nos momentos mais difíceis, que foram superados pelo apoio e momentos de descontração, sua ajuda neste trabalho foi imprescindível. Muito obrigada amiga!

Às alunas de iniciação científica, **Renata Sagnori, Fernarda Tessarin** e **Laís Siebra**, pelos momentos de descontração, pela grande amizade que foi construída e colaboração nesta pesquisa e em especial a “minha” aluna, **Daiane Accacia Griti Bueno**, pela dedicação, disponibilidade, amizade e sua fundamental colaboração para realização deste trabalho.

Aos queridos amigos de casa, **Rodnei Dennis Rossoni, Tânia Mara da Silva** e **Felipe Eduardo de Oliveira**, pela amizade, compreensão, apoio e todo carinho durante nosso convívio. Todos os nossos momentos serão lembrados com muito carinho. Obrigada!

Às amigas da patologia, **Lais Morandini Carvalho, Gabriela Santana, Isabel Chaves Carvalho, Mônica Oliveira Alves, Elis Lima Zutin, Stephanie Dias, Noala Vicensoto Milhan, Gabriela Lima, Miriane Machado**, pela amizade e momentos de descontração durante este período.

Aos amigos da microbiologia, **Júnia Oliveira Barbosa, Simone Godinho Vilela, Patrícia Pimentel, Felipe Camargo, Sérgio Giovanny Alves** pela amizade e convívio fraterno durante todo o decorrer do curso.

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

Enfim, a todos os **meus familiares e amigos**, que de forma direta ou indireta, contribuíram e apoiaram para mais esta etapa da minha vida, meu muito obrigada!

“Procuro semear otimismo e plantar sementes de paz e justiça. Digo o que penso, com esperança. Penso no que faço, com fé. Faço o que devo fazer, com amor. Eu me esforço para ser cada dia melhor, pois bondade também se aprende. Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir.”

Cora Coralina

SUMÁRIO

RESUMO	12
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Osseointegração	18
2.2 Biomateriais	19
2.3 Titânio como Biomaterial	20
2.4 Ligas De Titânio	21
2.4.1 Liga Ti-6Al-4V	21
2.4.2 Ligas Experimentais	22
2.5 Superfície Porosa	25
3 PROPOSIÇÃO	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Comitê de ética	30
4.2 Confeção das amostras	30
4.3 Caracterização morfológica das amostras	34
4.4 Animais	35
4.4.1 Procedimento cirúrgico	35
4.4.2 Processamento histológico	37
4.4.3 Análise histológica e histomorfométrica	40
5 ANÁLISE DOS RESULTADOS	41
6 RESULTADOS	42
6.1 Análise morfológica	42
6.2 Análise por EDS	48
6.3 Análise histológica	49
6.4 Análise histomorfométrica	55

7 DISCUSSÃO	61
8 CONCLUSÃO	73
9 REFERÊNCIAS	74
ANEXO	86

Santos ELS. Comparação *in vivo* da biocompatibilidade de amostras com superfície porosa confeccionadas com diferentes ligas de titânio [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2014

RESUMO

Atualmente, a implantodontia se concentra em estudos que direcionem e permitam a mais rápida osseointegração dos implantes cirúrgicos. O objetivo deste estudo foi comparar a resposta óssea frente às amostras de superfície porosa, confeccionadas com diferentes ligas de titânio que apresentam baixo módulo de elasticidade. Foram confeccionadas, por metalurgia do pó, 75 amostras, que foram divididas em 5 grupos: a) Grupo 1: controle - Ti comercialmente puro (Ticp); b) Grupo 2: liga titânio-6alumínio-4vanádio (Ti-6Al-4V); c) Grupo 3: liga titânio-13nióbio-13zircônio (Ti-13Nb-13Zr); d) Grupo 4: liga titânio-35nióbio (Ti-35Nb); e) Grupo 5: liga titânio-35nióbio-7zircônio-5tântalo (Ti-35Nb-7Zr-5Ta). Cinco amostras de cada grupo foram submetidas à caracterização química e morfológica. Neste estudo foram utilizados quinze coelhos para avaliar e comparar a neoformação óssea nas amostras de superfície porosa, por meio de análise histológica e histomorfométrica. Cada coelho recebeu uma amostra de cada grupo, as amostras G1, G2, G3 foram inseridas na tíbia direita e G4, G5 na tíbia esquerda. Cinco coelhos, selecionados aleatoriamente, foram eutanasiados 2, 4 e 8 semanas após a cirurgia. Os resultados da caracterização morfológica confirmaram porosidade de 40% e através do MEV, as amostras revelaram superfície porosa com poros abertos e interconectados, integrada ao núcleo denso. Na análise por EDS foi observada a presença e o pico de cada elemento químico específico das ligas utilizadas. Nas análises, histológica e histomorfométrica, foi observada maior neoformação óssea nas ligas de titânio no período inicial, quando comparadas ao Ticp e Ti-6Al-4V. Conclui-se que as amostras confeccionadas com as ligas de titânio com baixo módulo de elasticidade, exercem melhor influência sobre os osteoblastos no período inicial favorecendo precocemente a osseointegração.

Palavras-chave: Osseointegração. Ligas de titânio. Módulo elástico. Porosidade.

Santos ELS. *In vivo comparison of biocompatibility of porous surface samples made with different titanium alloys [dissertation]*. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2014.

ABSTRACT

Today, the implantology concentrates in studies that direct and enable a faster osseointegration of surgical implants. The purpose of this study was to compare the bone neoformations with porous surface samples, made of different titanium alloys with low elastic modulus. By means of powder metallurgy, 75 samples were made and split into five groups: a) Group 1: control - commercially pure titanium (cpTi); b) Group 2: titanium-6aluminium-4vanadium (Ti-6Al-4V) alloy; c) Group 3: Ti-13Nb-13Zr (titanium-niobium-zirconium) alloy; d) Group 4: titanium-35niobium (Ti-35Nb) alloy; e) Group 5: titanium-35niobium-7zirconium-5tantalum (Ti-35Nb-7Zr-5Ta). Five samples of each group were submitted to chemical and morphological characterization. In this study fifteen rabbits were used to evaluate and to compare the bone neoformation obtained from the porous surface samples, by means of histological and histomorphometric analysis. Each rabbit received one sample from each group; the G1, G2, G3 samples were inserted into the right tibiae and the G4, G5 samples in the left tibiae. Five rabbits, randomly selected, were euthanized 2, 4 and 8 weeks after the surgery. The results of the morphological characterization of the samples confirmed 40% porosity, and through the scanning electron microscope (SEM) the samples showed the surface pores open and integrated with the dense core structure. The analysis by energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) showed the presence and the peak of each specific chemical element of the used alloys. The histological and histomorphometric analysis showed a greater bone neoformation in the titanium alloys during the initial period, when compared with cpTi and Ti-6Al-4V. It was concluded that the samples made of titanium alloys with low elastic modulus have better influence on the osteoblasts, in the initial period, favoring an early osseointegration.

Keywords: Osseointegration. Titanium alloys. Modulus elastic. Porosity.

1 INTRODUÇÃO

Desde o início do século XX, os biomateriais vêm sendo largamente utilizados nas áreas de medicina e odontologia (Ratner et al., 2004b). O emprego de implantes como forma de reabilitação de estruturas corpóreas perdidas vem apresentando notáveis avanços nos últimos anos, proporcionando melhor qualidade de vida e longevidade aos pacientes (Brentel et al., 2006; Callister, 2007; Dewidar et al., 2007; Bottino et al., 2008; Laheurte et al., 2010; Biesiekierski et al., 2012; Nag, Banerjee, 2012; Niinomi et al., 2012; Abdel-Hady Gepreel M, Niinomi M, 2013; Guo et al., 2013a, 2013b; Park YJ et al., 2013; Yang et al., 2013; Hoerth et al., 2014).

O titânio comercialmente puro (Ticp) e a liga de titânio-6alumínio-4vanádio (Ti-6Al-4V) são amplamente utilizados como materiais de implantes biomédicos, pois possuem uma excelente biocompatibilidade e boas propriedades mecânicas (Bigi et al., 2008; Yu et al., 2012). Entretanto seus módulos de elasticidades (100GPa – Ticp e 110GPa - Ti-6Al-4V) são bem maiores que o módulo de elasticidade do osso (10-30GPa) (Branermark, 1983; Bennett et al., 2001; Bhattarai et al., 2008). Essa diferença entre o módulo elástico do implante e do tecido ósseo ocasiona um fenômeno conhecido com “*stress shielding*”, no qual há uma transferência não uniforme de tensões entre o implante e o osso. Esse estresse é predominantemente transferido através do implante, conduzindo a uma reabsorção óssea, o que pode resultar em perda do implante ou fratura óssea (Laheurte et al., 2010; Biesiekierski et al., 2012; Niinomi et al., 2012; Guo et al., 2013a, 2013b; Hoerth et al., 2014).

O desenvolvimento de novas ligas de titânio, tais como, Ti-13Nb-13Zr, Ti-12Mo-6Zr-2Fe, Ti-15Mo, Ti-16Nb-10Hf, Ti-15Mo-

5Zr-3Al, Ti-35.3Nb-5.1Ta-7.1Zr e Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr (Taddei et al., 2004; Biesiekierski et al., 2012; Niinomi et al., 2012), que exibem elementos biocompatíveis e fase cristalina do tipo beta visam melhorar as propriedades do material, incluindo resistência à corrosão, biocompatibilidade, menor módulo elástico, ductilidade, e formabilidade (Freese et al., 2001; Qazi, Rack, 2005; Laheurte et al., 2010; Biesiekierski et al., 2012; Niinomi et al., 2012; Abdel-Hady Gepreel M, Niinomi M, 2013). Estas características associadas promovem o desenvolvimento de novas ligas promissoras para aplicação biomédica.

Além do material de fabricação, a superfície do implante também pode ser considerada um fator importante para o sucesso clínico da osseointegração. Atualmente diversas topografias de implantes têm sido preconizadas e empregadas com o objetivo de aumentar a fixação desse ao osso (Svehla et al., 2000; Zinger et al., 2005; Bottino et al., 2008; Dabrowki et al., 2010; Wazen et al., 2010; Basalah et al., 2012; Sverzut et al., 2012). A topografia de superfície favorece a fixação das células e a cicatrização de tecidos, especialmente logo após a cirurgia de implante, que é uma etapa importante da osseointegração (Yu et al., 2012). Uma alteração topográfica de superfície é a confecção de poros, que aumenta significativamente a área de contato osso-implante, resultando na aceleração do processo de osseointegração (Frosch et al., 2002, 2003; Otsuki et al., 2006; Barbas et al., 2012). Adicionalmente, o crescimento de osso para o interior dos poros denominado “*bone ingrowth*” (Bobyen et al., 1987; Deporter DA et al., 1996, 1999; Deporter D et al., 2001, 2002) melhora o embricamento mecânico, a interdigitação do tecido ósseo ao implante, pode trocar por auxiliando no sucesso a longo prazo (Steinemann, 1998; Vasconcellos et al., 2008a, 2008b, 2010, 2012).

Diante deste contexto, Vasconcellos et al. (2010, 2012), desenvolveram um modelo de implante confeccionado com Ticp, por meio da técnica de metalurgia do pó, o qual exibe no seu interior um núcleo denso e na sua superfície poros, e através da alteração na superfície

deste implante visa aproximar o módulo de elasticidade entre osso e implante, já que permitiu criar uma área de interação entre osso e implante.

Desta forma, estudos *in vivo* comparando a influência das diferentes ligas de titânio na neoformação óssea das amostras de núcleo denso integrado à superfície porosa, são importantes para o desenvolvimento de um implante biomédico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Diversas áreas da saúde, bem como da engenharia estão envolvidas no processo de desenvolvimento do biomaterial. Neste capítulo de revisão de literatura, visa-se demonstrar a importância do conhecimento e elucidar a resposta do tecido ósseo frente ao biomaterial. Outros fatores, que serão destacados para dar maior embasamento teórico a esta pesquisa referem-se ao titânio e suas ligas, superfície do implante e técnica de metalurgia do pó, os quais podem influenciar no processo de osseointegração.

2.1 Osseointegração

A utilização de implantes é datada de longo tempo, antes da II Guerra Mundial (Ratner, 2004a). Entretanto pesquisadores procuram entender os processos que ocorrem na interface implante/tecido ósseo. Branemark (1983) definiu o conceito de osseointegração como sendo a união anatômica e funcional direta entre o osso vivo e organizado com a superfície do implante, estabelecendo uma união estável entre os mesmos. Esse processo biológico é análogo à cicatrização óssea intramembranosa, como as que ocorrem em locais de fratura, e resulta na fixação de um biomaterial ao tecido ósseo (Kuzyk, Schemitsch, 2011).

O processo de cicatrização óssea peri-implantar pode ser dividido basicamente em dois estágios: inicial e tardio. Inicialmente a primeira mudança observada é a presença de células sanguíneas nos tecidos adjacentes ao local da lesão, devido ao sangramento inicial.

Dentro de poucos minutos do início do procedimento cirúrgico, ocorre ativação plaquetária e formação de coágulo, que culmina com a formação de uma rede de fibrina aderida à superfície do implante, cuja retenção é favorecida pela topografia superficial do mesmo (Davies, 2007). Essa rede de fibrina fornece os componentes mecânicos e bioquímicos necessários para a migração de células mesenquimais e células leucocitárias, principalmente neutrófilos e monócitos (Kuzyk, Schemitsch, 2011). Adicionalmente, esta rede de fibrina serve como um arcabouço para crescimento dos capilares, fibras de colágeno e pré-osteoblastos, iniciando a formação de tecido ósseo imaturo, que interliga o osso preexistente à superfície do implante. A fase tardia envolve o remodelamento do osso imaturo em osso lamelar, que, por sua vez, apresenta grande potencial para receber e distribuir carga, sendo particularmente importante para a estabilização do implante a longo prazo (Kuzyk, Schemitsch, 2011; Halldin et al., 2011; von Wilmowsky et al., 2013).

O sucesso da osseointegração pode estar relacionado com fatores externos ao paciente como o preparo da loja cirúrgica e o implante, bem como com fatores intrínsecos ao paciente, que envolvem aspectos de qualidade e quantidade de tecido ósseo, além de variáveis sistêmicas. Os fatores relacionados ao próprio implante referem-se ao tipo de material utilizado para a fabricação do mesmo, que deve exibir adequada propriedade mecânica e ser biocompatível. Estão relacionados também com a forma e a topografia de superfície (von Wilmowsky et al., 2013).

2.2 Biomateriais

A demanda de biomateriais metálicos está aumentando rapidamente uma vez que a população mundial está ficando cada vez mais velha devido à queda da taxa de mortalidade e os idosos vêm sendo o grupo representado que apresentam maior risco de fratura de tecido ósseo entre outras complicações sistêmicas (Niinomi et al., 2012).

Biomateriais são materiais sintéticos ou naturais modificados, comumente utilizados em contato com sistemas biológicos, sendo um campo multidisciplinar que abrange áreas como as ciências biológicas, físico-químicas e de materiais. Este campo está em constante crescimento e torna-se cada vez mais intenso o desenvolvimento de pesquisas direcionadas para a síntese de biomateriais ou visando o entendimento da interação material-hospedeiro, pois as aplicações desses biomateriais são de grande importância para população. Dentre as áreas mais pesquisadas estão próteses de válvulas cardíacas, articulações de quadris, implantes dentários, lentes intraoculares e dispositivos para assistência circulatória (Ratner et al., 2004b).

A interação do material com o ambiente biológico é extremamente complexa, sendo evidenciada tanto pelo comportamento das células quando em contato com a superfície do material, quanto pela adesão celular ao mesmo. Essas considerações são de grande relevância para aplicação do biomaterial (Anderson, Schoen, 2004).

Uma das classes de biomaterial utilizadas na implantodontia ou na substituição de partes do corpo perdida é o metal, principalmente o Ti e suas ligas. Os metais, assim como qualquer outro biomaterial, devem apresentar algumas características específicas, tais como resistência a corrosão, segurança biológica e apropriada resposta tecidual.

2.3 Titânio como Biomaterial

A aplicação do titânio como biomaterial na ortopedia e odontologia é datada pós II-Guerra, além do uso convencional para o manufaturamento aeroespacial e militar. O Ti apresenta comprovada biocompatibilidade e uma extraordinária combinação de propriedades, já que exhibe alta resistência à tração (200 a 700 MPa), baixo peso específico (densidade = $4,5 \text{ g/cm}^3$ a 25 °C), alto ponto de fusão (1.688 °C), módulo de elasticidade compatível com tecidos orgânicos calcificados (110 GPa), dureza Vickers entre 80 e 105, a qual varia de acordo com o grau de pureza do Ti, condutividade térmica 0.2 J/cm.K e expansão térmica $9,6 \times 10^{-7} \text{ K}^{-1}$ (Frosch et al., 2003; Callister, 2007).

A limitação principal do titânio é a sua reatividade química com outros materiais quando em elevadas temperaturas, porém em contato com o ar, à temperatura ambiente, perde a reatividade tornando-se extremamente inerte. Este fenômeno ocorre devido à formação de uma película de óxido muito fina e altamente aderente sobre a superfície do metal, a qual serve como barreira protetora adicional contra a corrosão (Callister, 2007). Logo, a grande vantagem dos materiais de Ti para o uso biomédico é que eles são completamente inertes e, portanto, representam uma excelente alternativa para pacientes que têm alergia ou reações tóxicas a vários outros metais (Kasemo, 1983; Bracraft, Cook, 1994; Niinomi, 2008b).

Outra característica interessante do titânio é a de ser um elemento alotrópico, uma vez que pode exibir mais de uma forma cristalográfica. O titânio puro exhibe estrutura cristalina do tipo hexagonal compacta (hc) até $882,5 \text{ °C}$ e, em tal faixa de temperatura, essa estrutura é denominada fase α (alfa). Em temperaturas superiores a $882,5 \text{ °C}$ o titânio sofre transformação alotrópica e passa a apresentar estrutura cúbica de corpo centrado (ccc), conhecida como fase β (beta) (Stephen,

Froes, 1988). Estas duas estruturas de cristal são a base para as três classes de nomenclatura geralmente aceitas de ligas de titânio: alfa, alfa-beta e beta (Boyer, 1994; Freese et al., 2001; Geetha et al., 2009; Laheurte et al., 2010; Biesiekierski et al., 2012).

Entretanto os implantes de Ti na prática ortopédica e dentária, apresentam um inconveniente, que é a diferença entre o módulo de elasticidade do implante metálico de Ti6Al4V (100 GPa) e o módulo de elasticidade do osso (10-30 GPa) (Dewidar et al., 2007). O maior valor no módulo de elasticidade dos implantes pode resultar em uma ineficiente transferência de carga do implante para o osso adjacente, causando o fenômeno chamado “*stress shielding*”, que em geral conduz a uma potencial reabsorção óssea ao redor do implante e eventual falha do mesmo. Logo, o material para reposição óssea, ou seja, o implante não deve ser somente biocompatível, mas também deve apresentar módulo de elasticidade o mais próximo possível do osso, o que o torna mecanicamente compatível (Sumner et al., 1992; Long, Rack, 1998; Niinomi, 2008; Ning et al., 2010). Assim sendo, ligas de baixo módulo elástico, resistência à corrosão e nenhum potencial tóxico vêm sendo amplamente desenvolvidas desde o início dos anos 90 (Long, Rack, 1998; Niinomi, 2008a).

2.4 Ligas de Titânio

2.4.1 Liga Ti-6Al-4V

As ligas de titânio foram desenvolvidas nos meados da década de 40 para aviação e foram utilizadas posteriormente em próteses ortopédicas na área médica. A liga inicialmente mais utilizada foi a de

titânio-alumínio-vanádio (Ti-6Al-4V) (Misch CE, 2000), devido as suas favoráveis propriedades mecânicas, baixo custo, resistência à corrosão e boa tolerância pelos tecidos (Eisenbarth et al., 2004). Por outro lado, esta liga apresenta módulo elástico de 110 GPa, aspecto que pode desfavorecer sua utilização em implantes biomédicos (Misch CE, 2000). Entretanto, este problema pode ser amenizado pela fabricação de poros nas amostras, que passam a apresentar módulo elástico entre 11 e 19 GPa (Bhattacharai et al., 2008). Embora o módulo elástico possa ser diminuído, a liga de Ti-6Al-4V ainda exhibe outros inconvenientes como a toxicidade do Al e V (Lauher et al., 2010). Os produtos gerados desta degradação podem reagir com os tecidos, induzindo a liberação de níveis aumentados de mediadores pró-inflamatórios e osteolíticos, os quais podem causar problemas graves como a perda do implante (Rogers et al., 1997). O V tem sido associado a possíveis efeitos citotóxicos e reações teciduais adversas. Já o Al, pode estar relacionado à inibição de crescimento ósseo e ao desencadeamento de distúrbios neurológicos (Khan et al., 1999). Além disso, o potencial de contribuição do Al e V para a doença de Alzheimer e distúrbios respiratórios também tem sido pesquisado (Rogers et al., 1997; Cortizo et al., 2000; Bigi et al., 2008).

2.4.2 Ligas Experimentais

Diante da citotoxicidade que o íons Al e V da liga Ti-6Al-4V apresenta e da diferença do módulo elástico entre o tecido ósseo e este metal, estão sendo desenvolvidas novas ligas de titânio visando aplicação biomédica (Niinomi, 2008a; Santos et al., 2008; Bottino et al., 2009; Taddei et al., 2009, Laheurte et al., 2010; Niinomi et al., 2012). A composição química dessas ligas é baseada em elementos não citotóxicos tais como zircônio (Zr), nióbio (Nb), tântalo (Ta) e que

apresentam uma combinação de alta resistência mecânica com baixo módulo de elasticidade, assim aproximando-o do tecido ósseo (Laheurte et al., 2010).

Em geral, as ligas de Ti são agrupadas em ligas do tipo α e β dependendo da sua estrutura cristalina, que é a característica responsável pelas propriedades mecânicas do material (Callister, 2007). Como descrito anteriormente, o titânio é um elemento alotrópico e a adição desses elementos químicos para a produção de uma liga visa basicamente à manutenção da fase α , β ou alfa-beta (Callister, 2007; Niinomi, 2008a; Geetha et al., 2009; Niinomi et al., 2012).

Atualmente, ligas de Ti tipo β estão sendo desenvolvidas visando melhorar a biocompatibilidade mecânica das ligas de Ti com o osso (Bottino et al., 2008; Niinomi, 2008a; Santos et al., 2008; Bottino et al., 2009; Taddei et al., 2007; Biesiekierski et al., 2012; Niinomi et al., 2012) já que trabalhos vêm demonstrando que estas ligas exibem menor módulo elástico do que as ligas do tipo α ou tipo α e β (Niinomi, 2008a; Niinomi, Nakai, 2012). A pesquisa com ligas de Ti tipo β visa reunir as propriedades mecânicas de baixo módulo de elasticidade, excelente resistência à compressão, boa resistência à corrosão, fácil conformabilidade, com a biocompatibilidade destes materiais (Niinomi, 2008a, 2008b; Santos et al., 2008; Taddei et al., 2007; Wang et al., 2009; Ning et al., 2010; Niinomi et al., 2012).

Uma das primeiras ligas de Ti desenvolvida com baixo módulo e do tipo β foi a liga Ti-13Nb-13Zr (Mishra et al., 1996). A partir deste trabalho, diversos pesquisadores avaliaram o potencial desta liga (Ti-Nb-Zr) para aplicação como biomaterial (Park JB, 1980; Park JW et al., 2008; Wang et al., 2010; Niinomi et al., 2012; Abdel-Hady Gepreel M, Niinomi M, 2013). Especificamente, a liga Ti-13Nb-13Zr apresenta resistência mecânica da ordem de 1.300 MPa, alta resistência à corrosão e menor módulo elástico do que as ligas de Ti-6Al-4V e Ti-6Al-7Nb (Okasaki et al., 1998; Bottino et al., 2009). Em 2009, Bottino et al.,

avaliaram a reparação óssea ao redor de implantes porosos confeccionados com liga Ti-13Nb-13Zr e observaram que houve um contato próximo entre o osso e o implante, revelando que este material é biocompatível e osteocondutor. Wang et al. (2009), desenvolveram promissoras estruturas porosas com a liga Ti-10Nb-10Zr para serem usadas como biomateriais. Estas amostras apresentam módulo elástico de 5.6 GPa, quando exibem 57% de porosidade, além de excelente ductibilidade e adequada biocompatibilidade quando submetida ao teste de citotoxicidade utilizando células semelhantes a osteoblastos (SaOS2).

Além da liga de Ti-Nb-Zr, outras ligas como Ti-Nb e Ti-Nb-Zr-Ta utilizam o nióbio (Nb) para a redução do módulo de elasticidade e estabilização da fase β do Ti (Song et al., 1999).

Em 2008, Santos et al., desenvolveram a liga de Ti-35Nb, que apresenta uma microestrutura bifásica com predomínio da fase β . Esta liga apresenta valor de módulo elástico na faixa de 80 GPa e resistência à tração de 600 MPa, aspectos que caracterizam a liga como um material com potencial para aplicações biomédicas. Entretanto, não há relatos na literatura da avaliação da osseointegração desta liga.

Com o objetivo de diminuir o módulo de elasticidade, das ligas de Ti-Nb-Zr, foi acrescentado o elemento tântalo a esta composição e assim foi desenvolvida a liga de Ti-Nb-Zr-Ta (titânio-nióbio-zircônio-tântalo), que apresenta um dos menores módulos de elasticidade das ligas de Ti, como a Ti-29Nb-11Ta-5Zr com módulo de 20 GPa (Laheurte et al., 2010). Além disso, a liga Ti-Nb-Zr-Ta exibe boa resistência mecânica (Taddei et al., 2007; Niinomi, 2008a) e adequado limite no teste de fadiga. Niinomi, (2003) e Taddei et al. (2007), avaliaram a citotoxicidade da liga Ti-Nb-Zr-Ta por meio de células de ovário de hamster e linhagem celular de fibroblastos (L929), respectivamente, e concluíram que esta liga não exibe citotoxicidade, podendo ser considerada para a utilização biomédica. Recentemente, Guo et al. (2013a), propuseram a utilização da liga Ti-35Nb-2Ta-3Zr para confecção

de implantes, com módulo de elasticidade de 48 GPa. Os autores realizaram uma etapa do estudo *in vitro* utilizando células osteoblásticas, e observaram que esta liga não é citotóxica, uma vez que ocorreu proliferação celular e expressão gênica de proteínas ósseas como osteopontina, osteocalcina. Na etapa *in vivo*, observaram a osseointegração desta liga em fêmures de coelhos.

Estudos prévios (Bennett et al., 2001; Bottino et al., 2008; Bracroft, Cook, 1994; Faria et al., 2010) mostraram que o processo de osseointegração com as novas ligas é favorável. No entanto ainda se buscam métodos para aperfeiçoar este processo, sendo um deles a alteração da topografia da superfície, a fim de melhorar a estabilidade do implante ao osso.

2.5 Superfície Porosa

A superfície de implantes dentais e ortopédicos tem sido considerada um fator muito importante no estudo da osseointegração, uma vez que pode induzir a uma multiplicidade de respostas celulares e alterar os eventos biológicos durante a cicatrização peri-implantar (Vasconcellos et al., 2008a,b). Nesse sentido, há um grande empenho dos pesquisadores em modificar a superfície dos implantes de titânio, visando melhorar a resposta celular, uma vez que as características de superfície influenciam diretamente na resposta inicial do processo de reparação peri-implantar (Ong, Lucas, 1998; Frosch et al., 2003; Fujibayashi et al., 2004; Vasconcellos et al., 2008a, 2008b, 2012).

Diversos pesquisadores demonstraram aumento da fixação do osso ao implante de superfície rugosa ou porosa em comparação as amostras de superfície lisa (Fergusson, 1999; Deporter D

et al., 2002; Frosch et al., 2002, 2003; Vasconcellos et al., 2008a, 2008b, 2012).

A estrutura porosa presente nesta superfície é formada por uma rede de poros interligados, a qual é um fator importante para melhorar e acelerar as características da osseointegração em implantes (Brentel et al., 2006; Taddei et al., 2007; Vasconcellos et al., 2008a, 2010, 2012; Rosa et al., 2009; Faria et al., 2010; Wang et al., 2010). Inúmeros estudos têm demonstrado que a porosidade dos implantes promove resultados positivos na neoformação óssea (Li et al., 2005, 2007; Brentel et al., 2006; Taddei et al., 2007; Bhattarai et al., 2008; Bottino et al., 2009; Faria et al., 2010; Wazen et al., 2010; Vasconcellos et al., 2012) uma vez que aumenta a área de contato entre o biomaterial e o tecido ósseo (Brentel et al., 2006; Vasconcellos et al., 2008a, 2008b, 2012) resultando na melhor estabilidade do implante ao longo do tempo (Wazen et al., 2010), além de acelerar o processo de osseointegração (Frosch et al., 2002, 2003). Contudo, essa rede de poros interligados deve apresentar alta porosidade para promover espaço suficiente para a adesão celular e posteriormente formação de novo osso, além de permitir o transporte de fluidos corpóreos, proliferação de nova vascularização e apresentar adequada propriedade mecânica para resistir aos esforços durante a implantação e utilização (Brentel et al., 2006; Rosa et al., 2009; Vasconcellos et al., 2008a, 2008b, 2010, 2012; Wazen et al., 2010).

O aumento da porosidade e do tamanho dos poros visa aumentar o crescimento de novo osso, porém esta característica pode diminuir as propriedades mecânicas do implante (Barbas et al., 2012). Segundo Hsu et al. (2013), o desenvolvimento de porosidade em ligas de titânio é promissor, uma vez que tem o potencial de proporcionar crescimento ósseo para o interior dos poros, além de melhorar o módulo de elasticidade destes metais, visando equipará-lo ao do osso natural. Sendo assim o implante cirúrgico deve apresentar uma combinação de fatores como propriedade mecânica adequada para suportar os esforços,

módulo de elasticidade semelhante ao osso e ao mesmo tempo exibir porosidade adequada para a neoformação óssea (Vasconcellos et al., 2008a, 2008b, 2012; Wazen et al., 2010).

No entanto, a fabricação dessa estrutura porosa não pode ser controlada por técnicas convencionais de produção, uma vez que tais metodologias não possibilitam produzir poros com dimensões previamente definidas (Li et al., 2007). Dentre os diversos processos aplicados para a confecção de implantes porosos à base de titânio, a técnica da metalurgia do pó vem sendo cada vez mais utilizada, em substituição aos processos metalúrgicos convencionais (Bram et al., 2000; Wen et al., 2002; Liang et al., 2003; Brentel et al., 2006; Vasconcellos et al., 2008a, 2008b, 2010, 2012; Medeiros et al., 2008; Faria et al., 2010; Wazen et al., 2010).

A técnica da metalurgia do pó permite a fabricação de superfícies com formas complexas, que podem assumir características similares ao formato de rede. Além disso, fatores fundamentais para um bom desempenho do implante, como o tamanho, a configuração e a quantidade de poros, podem ser controlados pela técnica de metalurgia do pó (Braga et al., 2007; Vasconcellos et al., 2008a, 2008b, 2012).

Uma das vantagens desta técnica é permitir o controle da porosidade, o que pode contribuir para a melhor fixação do osso ao implante, através do crescimento do tecido ósseo para o interior da rede porosa. Esses espaços abertos, poros, são adequados para a proliferação de células formadoras de matriz óssea e para aposição óssea contínua durante a cicatrização. Além disso, a fixação de implantes por crescimento ósseo pode conduzir a uma melhor distribuição da força entre o osso e o implante, como um resultado da interação de longo alcance entre o osso e o implante, em comparação com as interfaces comuns encontradas em dispositivos não porosos (Bottino et al., 2009).

Visando aproximar o módulo de elasticidade entre osso e implante, Vasconcellos et al. (2010, 2012), desenvolveram um implante,

fabricado pela técnica de metalurgia do pó, com núcleo denso e superfície porosa. Este tipo de implante permitiu criar uma área de interação entre osso e implante, uma vez que a dureza deste sistema osso-implante aumenta de forma centrípeta, isto é, o osso apresenta a menor dureza, seguida pela superfície porosa preenchida por osso (área de interação) e o titânio denso, que apresenta a maior dureza e menor elasticidade. Esta capacidade de aumentar gradativamente a dureza do sistema osso-implante pode evitar a reabsorção óssea ao redor dos implantes quando submetidos a carga por longo tempo. Este fenômeno de reabsorção óssea é comumente observado em implantes rosqueados, devido a diferença entre o módulo de elasticidade dos materiais (Consolaro et al., 2010) e também a geometria de roscas, que favorece este fenômeno devido a distribuição do estresse.

Neste estudo a apresentação de uma amostra que associa a geometria cilíndrica, com núcleo denso integrado à superfície porosa, com os diferentes tipos de ligas de titânio, pode ser uma alternativa para aumentar a longevidade dos implantes cirúrgicos, sendo portanto uma solução atrativa para o problema da diferença de módulo de elasticidade entre o metal e o osso. A combinação dos aspectos mecânicos e biológicos das ligas de Ti, tornam estes metais potentes candidatos para aplicações biomédicas, quer seja ortopédica ou dental (Li et al., 2005, 2007; Vasconcellos et al., 2008a, 2008b, 2012; Rosa et al., 2009; Bottino et al., 2009; Laheurte et al., 2010; Wazen et al., 2010).

3 PROPOSIÇÃO

Diante deste contexto, nosso estudo visa comparar a biocompatibilidade das ligas de Ti-6Al-4V, Ti-13Nb-13Zr, Ti-35Nb, Ti-35Nb-7Zr-5Ta por meio de pesquisa *in vivo*;

Sendo assim, os objetivos deste estudo foram:

- a) avaliar a influência das diferentes ligas de titânio na neoformação óssea em amostras de núcleo denso integrado à superfície porosa;
- b) caracterizar química e morfológicamente as amostras de núcleo denso integrado à superfície porosa.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Comitê de Ética

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos/UNESP sob o protocolo nº 018/2010/PA/CEP e foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.2 Confeção das amostras

Inicialmente foram adquiridos os pós dos elementos zircônio, alumínio, vanádio, nióbio e também o pó de Ti puro grau 2 (Ticp), no Departamento de Ciência e Tecnologia Aeroespacial (DCTA) - Divisão de Materiais do Instituto de Aeronáutica e Espaço (AMR/IAE). Após esta etapa, a confecção das amostras foi realizada por meio da técnica de metalurgia do pó. Os materiais utilizados para a fabricação das amostras foram os pós de cada elemento constituinte da liga associados à ureia, aditivo orgânico que funcionou como espaçador, permitindo a confecção dos poros. A porosidade das amostras foi de 40% (Vasconcellos et al., 2008a, 2008b, 2012).

O processo de conformação dos implantes foi iniciado pela mistura dos pós dos metais no misturador em Y com vibração (Figura

1a). Após esta etapa, foi adicionada ao pó metálico, a ureia no aparelho misturador Y (TREU) (Figura 1b). Em seguida, esta mistura foi inserida em uma matriz de aço ferramenta VND, desenvolvida especialmente no AMR/IAE para a confecção de amostras de núcleo denso integrado à superfície porosa. O conjunto formado pela matriz preenchida com a mistura de ureia + pó foi conduzido para a compactação uniaxial com 100 MPa na prensa uniaxial (Marconi) (Figura 1c) e posteriormente para a prensa isostática a frio com 300 MPa (Figura 1d). Em seguida, foi realizada a remoção do aditivo orgânico em um forno à vácuo (Figura 1e) com ciclo pré-determinado. Este ciclo foi iniciado à temperatura ambiente, e esta foi aumentando gradualmente até atingir 400 °C, visando à evaporação da ureia, sem que ocorra reação entre a ela e o Ti. Posteriormente, as amostras foram sinterizadas no forno a vácuo (Figura 1f), de 10⁻⁷ toneladas, com taxa de aquecimento de 10°C/minuto com patamar de 1 hora na temperatura de 1200 °C para o grupo 1 e temperatura de 1400 °C para os demais grupos. Em seguida, uma limpeza criteriosa dos implantes com solução de água destilada e detergente neutro, em cuba ultrassônica (Schuster), foi realizada por 10 minutos, visando remover possíveis resíduos. Posteriormente, os implantes foram imersos em álcool 70%, sendo submetidos à ação do ultrassom por mais 10 minutos. Finalizando, os implantes foram colocados em água destilada, por mais um ciclo de 10 minutos em ultrassom.

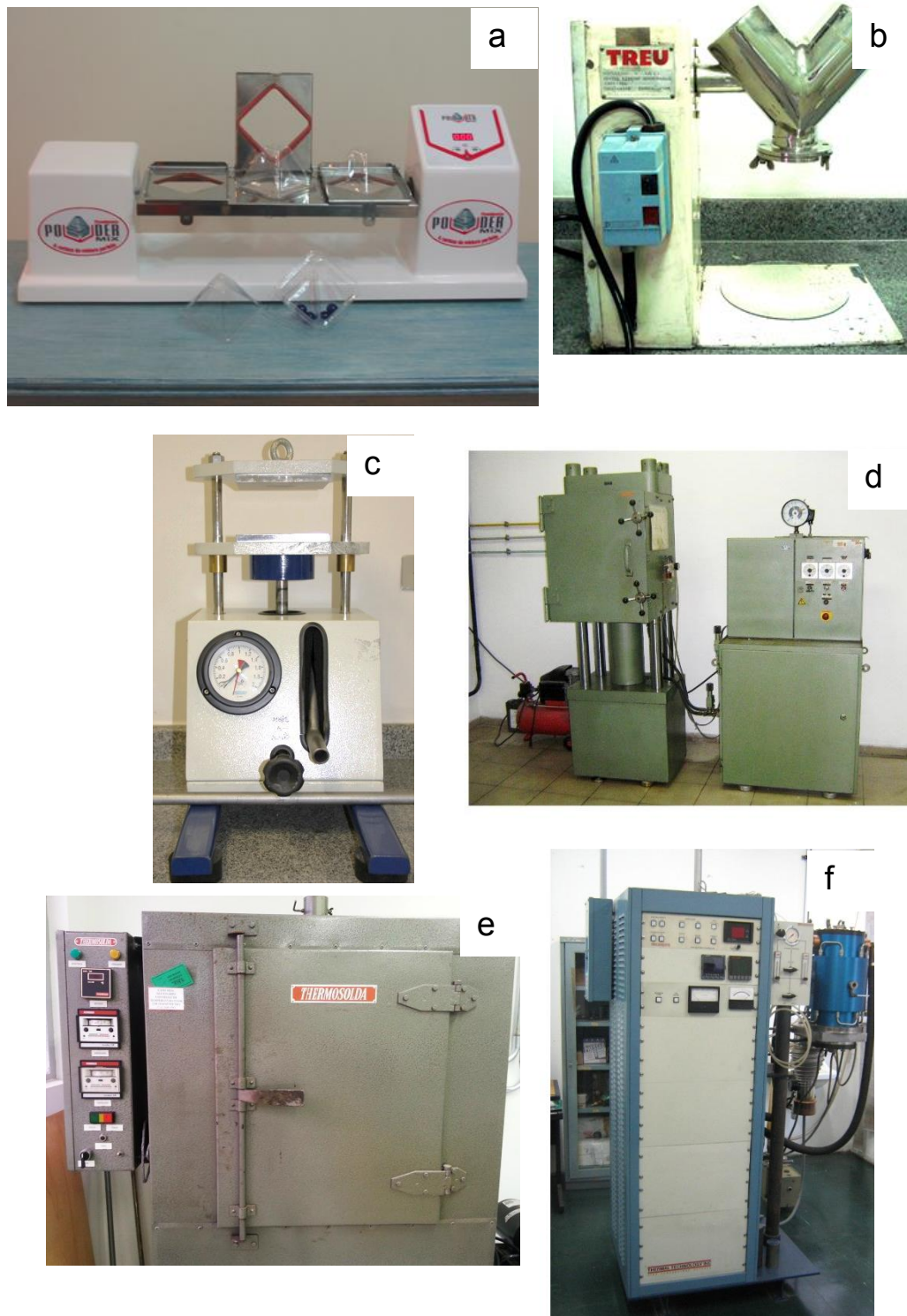


Figura 1 - Equipamentos utilizados na confecção dos implantes: a) misturador em Y com vibração (modelo Powdermix); b) misturador em Y; c) prensa hidráulica uniaxial; d) prensa isostática; e) forno a vácuo para remoção da ureia; f) forno a vácuo para sinterização.

Finalmente, as amostras (Figura 2) foram divididas em 5 grupos, descritos a seguir:

- a) Grupo 1 - controle: titânio puro grau 2 (Ticp);
- b) Grupo 2 - liga Ti-6Al-4V;
- c) Grupo 3 – liga Ti-13Nb-13Zr;
- d) Grupo 4 - liga Ti-35Nb;
- e) Grupo 5 - liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta.

No total geral, para cada grupo, foram confeccionadas 75 amostras de superfície porosa no CTA/IAE/AMR, por meio da técnica de metalurgia do pó. Todas as amostras utilizadas neste experimento apresentaram núcleo denso integrado à superfície porosa.

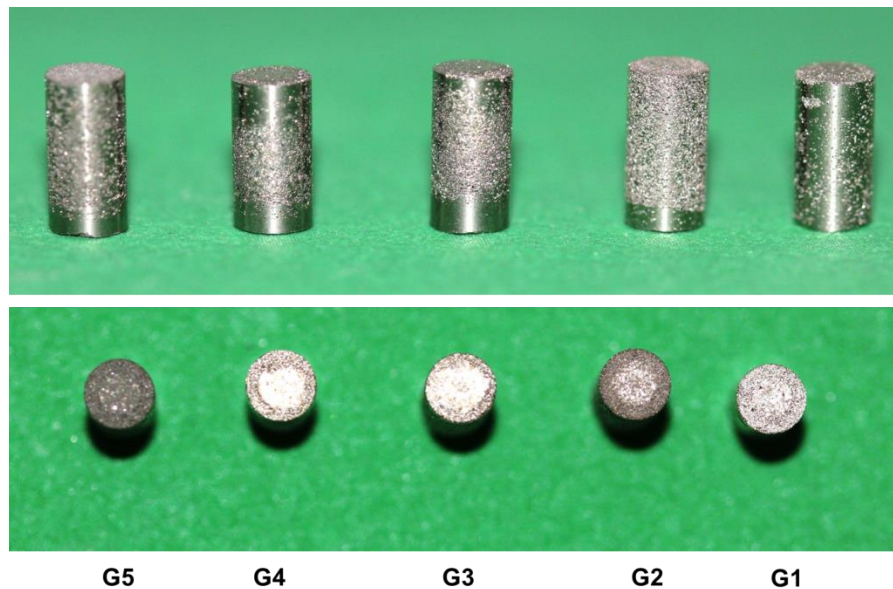


Figura 2 – Amostras confeccionadas por meio da técnica de metalurgia do pó.

4.3 Caracterização morfológica das amostras

Para análise morfológica da topografia de superfície foi utilizado o Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) Inspect S50 (FEI), localizado no Laboratório de Apoio a Pesquisa (L.A.P.) do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese na Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos, operando em alto-vácuo com detector de elétrons secundários em voltagem de 12,5 HV e spot de 4,5.

A análise da microtopografia interna do implante foi realizada na interface do núcleo denso integrado à superfície porosa. Inicialmente os implantes foram incluídos em resina, após o endurecimento da resina, as peças incluídas foram fixadas na máquina de corte de tecido duro Labcut 1010 (EXTEC) para seu hemisseccionamento, de maneira longitudinal. Posteriormente, a face de corte desses implantes foi polida em politriz Labpol 8-12 (EXTEC), utilizando lixas d'água 1200 e 2500 e discos de feltro (EXTEC) juntamente com sílica coloidal (EXTEC) e pastas de diamante com granulometria de 1, 3 e 6 μ (Erios), resultando em blocos de inclusão livres de ranhuras.

A porosidade foi calculada por meio de análise volumétrica de 05 amostras de cada grupo, utilizando a densidade relativa de cada material. As densidades relativas de cada liga foram determinadas baseadas na massa atômica de cada elemento químico. Inicialmente foi obtido o volume total de cada amostra baseado na altura, massa e diâmetro. O volume da porção densa foi determinado por meio da fórmula (1) matemática do cilindro:

$$\text{Volume} = \pi \times \text{raio}^2 \times \text{altura} \quad (1)$$

Posteriormente a massa desta porção foi obtida pela fórmula (2) da densidade:

$$\textbf{Densidade = massa/ volume} \quad (2)$$

Em seguida, o volume e a massa da porção porosa foram conhecidos subtraindo os valores totais da amostra em relação à porção densa. Finalmente foi obtida a porcentagem de poros considerando o volume do poroso em relação ao denso.

Para caracterização química dos implantes, foi utilizado detector de espectrometria por espalhamento de energia (EDS), acoplado ao MEV, juntamente com o programa Espirit 1.9 (Bruker), que realizou a análise dos elementos químicos presentes e sua quantificação. Por meio deste equipamento foi observada a composição química de cada material estudado.

4.4 Animais

4.4.1 Procedimento cirúrgico

Quinze coelhos albinos da raça Nova Zelândia, pesando cerca de 4,0 kg, com 5 meses, foram utilizados neste estudo. Previamente à cirurgia de implantação, os animais foram pesados e anestesiados por via intramuscular, com uma mistura de 13 mg/kg de solução aquosa a 2,3 g de cloridrato de xilazina (Anasedan – Vetbrands), substância sedativa analgésica e relaxante muscular, com 33 mg/Kg de quetamina (Dopalen - Agibrands do Brasil Ltda.) como anestésico geral.

Anestésico local composto por cloridrato de prilocaína 3% associado à felipressina 0,03 UI/mL (Citanest a 3%® – Dentsply) também foi utilizado.

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

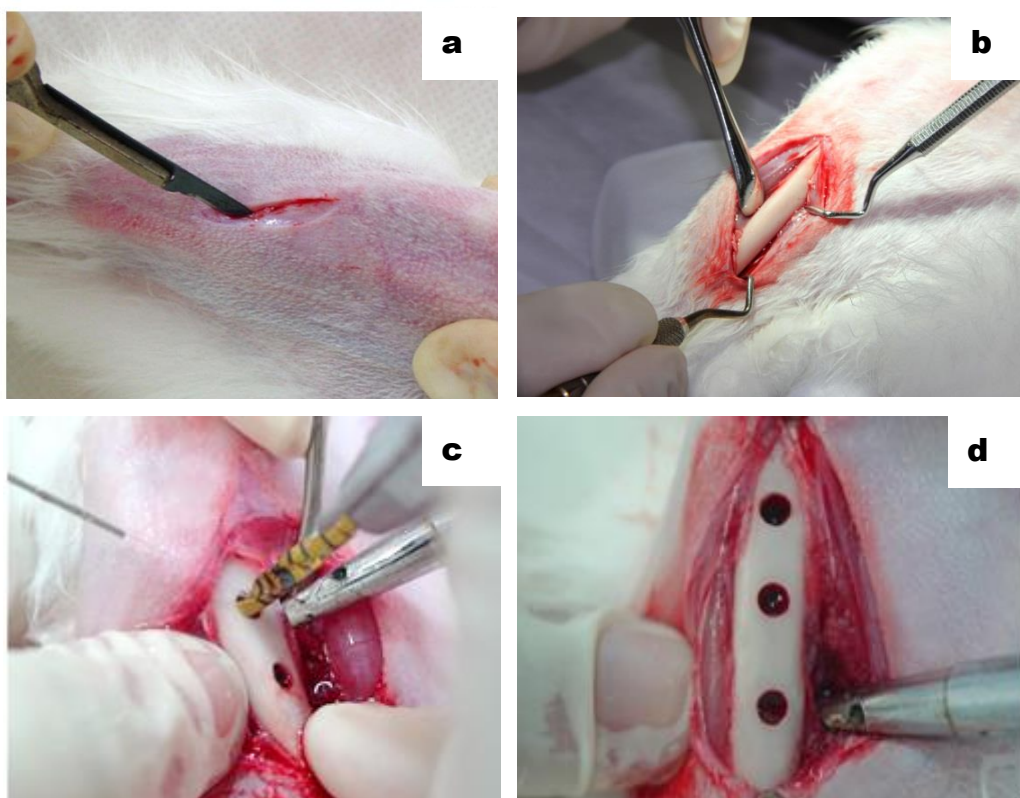


Figura 3 - **Procedimentos cirúrgicos:** a) incisão na face medial da tíbia do coelho; b) exposição da cortical óssea; c) confecção da loja cirúrgica; d) lojas cirúrgicas preparadas para a inserção das amostras.

Como padronização, na tíbia direita foram inseridas as amostras dos Grupos 1, 2, 3 iniciando da porção mais medial para a distal. Na tíbia esquerda foram inseridas as amostras dos Grupos 4, 5. Os implantes foram posicionados sob pressão até que houvesse fixação desses junto à cortical óssea oposta à perfuração.

O tecido muscular e a pele foram suturados com fio de vycril (Ethicon/Johnson & Johnson n°4) e novamente foi realizada antissepsia com álcool iodado. Os animais receberam terapia antibiótica com benzilpenicilina benzatina, benzilpenicilina procaína, benzilpenicilina potássica e diidroestreptomicina base sulfato em ampola de 6.000.000 UI (Pentabiótico – Fort Dodge), por via intramuscular na dose de 1,35 mL/kg, no pós-operatório imediato (48 horas). Após a cirurgia, os coelhos foram colocados em gaiolas individuais com ração e água *ad libitum*, e monitorados até o prazo da eutanásia de 2, 4, 8 semanas. O tempo máximo de 8 semanas *in vivo* foi adotado como comparativo ao tempo de reparação óssea em humano que é de 24 semanas (6 meses), uma vez que o metabolismo ósseo no coelho é em média três vezes superior ao da espécie humana (Bottino et al., 2009). Cada período de eutanásia foi composto de um grupo de 5 coelhos.

4.4.2 Processamento histológico

Após a fixação em formol a 10% por 48 horas, os fragmentos ósseos (Figura 4a) contendo as amostras foram lavados abundantemente, submetidos a concentrações crescentes de álcool (60%, 70%, 80%, 90% e 100%) para desidratação e imersos em xilol (P.A.), para diafanização. A seguir, a peça foi embebida em solução resinosa, gradativamente, utilizando como reagentes o metilmetacrilato

associado com dibutilfitalato na proporção de 85% e 15%, respectivamente, associado posteriormente a 1 g de peróxido de benzoila (Figura 4b).

O bloco de resina contendo a peça histológica (Figura 4c) foi posicionado no aparelho de corte Labcut® 1010 (EXTEC) e submetido ao disco diamantado de 3 polegadas de diâmetro (Figura 4d). A seguir, os cortes obtidos foram limpos, polidos em politriz Labpol® 8-12 (EXTEC) com lixa d'água de granulação 1500 (Figura 4e) e colados com éster de cianocrilato (Super Bonder®) sobre uma lâmina de acetato. A colagem foi realizada em um dispositivo para prensagem das lâminas, visando obter um maior paralelismo entre a lâmina e a superfície a ser desgastada, conseguindo-se, dessa maneira, uma fina e uniforme camada da cola. Com a utilização de um suporte para a placa de acetato, o corte foi desgastado em politriz Labpol® 8-12 (EXTEC), usando sequência crescente de lixas d'água (400, 600, 1200 e 2500). No decorrer do desgaste, os cortes (Figura f) foram observados em microscópio de luz para a verificação de uma mínima espessura com o máximo de detalhes.

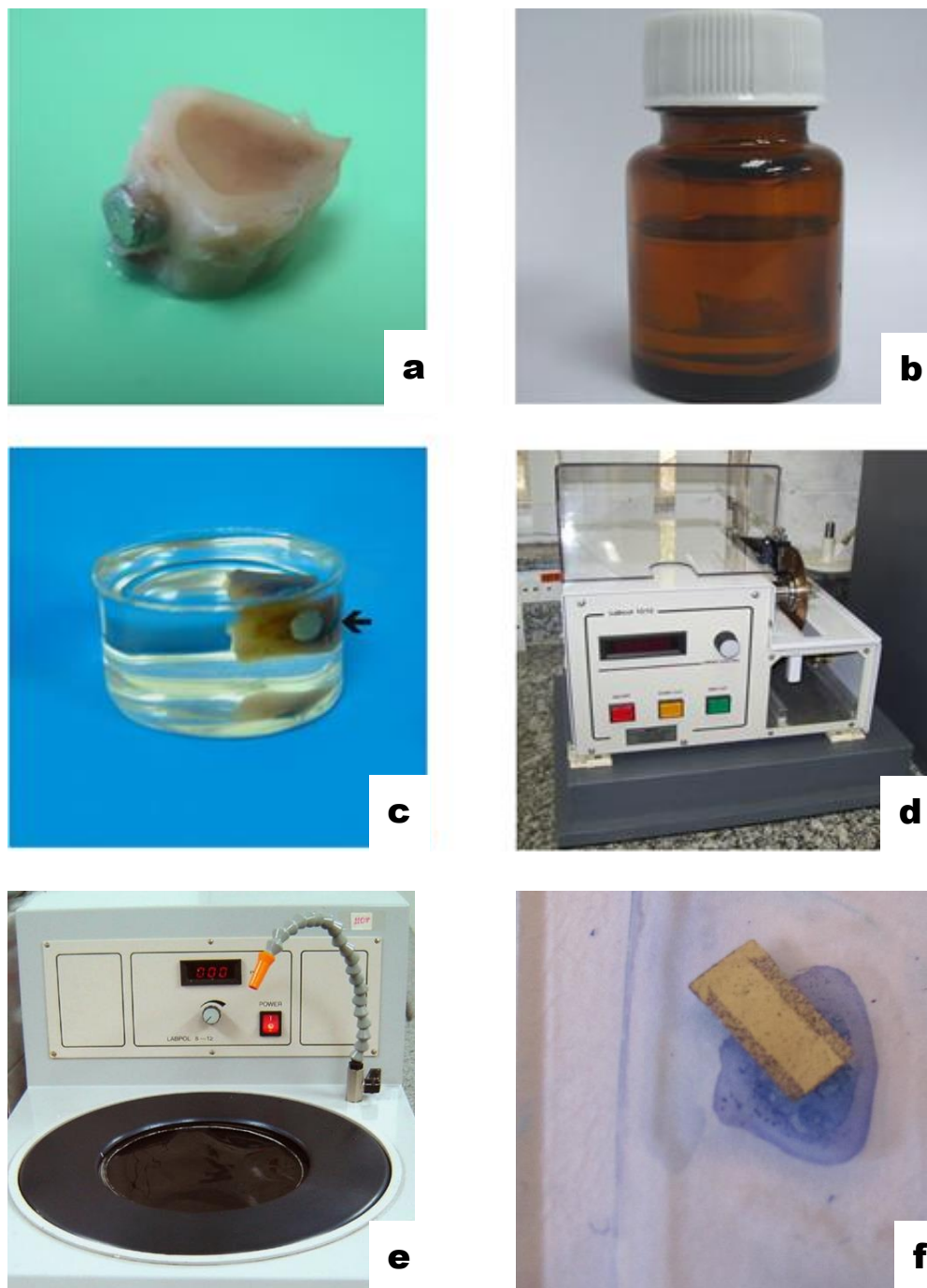


Figura 4 - **Processamento histológico**: a) fragmento de tíbia contendo o implante; b) inclusão do fragmento em solução resinosa, acondicionado em vidro âmbar; c) aspecto final do bloco de resina contendo o fragmento de tíbia com implante inserido (↔) ; d) máquina Labcut para corte de tecido duro; e) máquina politriz para desgaste e polimento dos cortes; f) visão detalhada do corte após colagem em lâmina de plexiglass, desgaste, polimento e coloração com azul de toluidina.

4.4.3 Análise histológica e histomorfométrica

As análises histológicas foram realizadas pelos seguintes métodos: a) campo claro com corante de azul de toluidina; b) MEV. O azul de toluidina é um corante indicado para tecido ósseo, tecido osteoide e também núcleos de células como osteoblastos, osteoclastos, células da medula, permitindo a observação da remodelação óssea que ocorre no processo de osseointegração dos implantes e a identificação das células (Bracraft JD, Cook HC, 1994).

Para a análise histomorfométrica, duas secções de cada amostra foram avaliadas quanto à porcentagem de neoformação óssea na interface osso-implante e no interior dos poros. Dois campos por secção foram digitalizados, no aumento de 100 X, representando a interface medial e distal do implante. A taxa de neoformação óssea foi calculada utilizando o software *Image J* (versão Java 1.6.0_20/ 64-bit), com o auxílio de um *grid* utilizando a seguinte fórmula (3):

$$\text{Total neoformação óssea (\%)} = \text{intersecções tecido ósseo} \times 100 / 300 \quad (3)$$

5 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Para os testes de caracterização morfológica das amostras, os valores foram submetidos ao teste estatístico ANOVA um fator e quando necessário ao teste de comparação múltipla de Tukey.

Para a avaliação dos dados obtidos da análise histomorfométrica foi realizada a estatística descritiva (média e desvio-padrão) e a inferencial, mediante o teste paramétrico ANOVA dois fatores de medidas repetidas e quando necessário ao teste de comparação múltipla de Tukey. O programa computacional utilizado foi o GRAPHPAD PRISM 6. O nível de significância adotado foi o valor convencional de 5%.

6 RESULTADOS

6.1 Análise metalográfica

Na análise metalográfica externa do implante, realizada por MEV, aumento de 37 x, foi possível caracterizar a superfície do implante em visão panorâmica do grupo 2 (Figura 5). Realizando uma aproximação nesta superfície, aumento de 350 x, os implantes apresentaram poros com tamanhos e formatos variados. Nos grupos 1 e 2, observou-se superfície caracteristicamente porosa (Figuras 6a e 6b), enquanto que nos grupos 3, 4 e 5, observou-se superfície caracteristicamente porosa com certo grau de rugosidade (Figuras 6c, 6d e 6e).

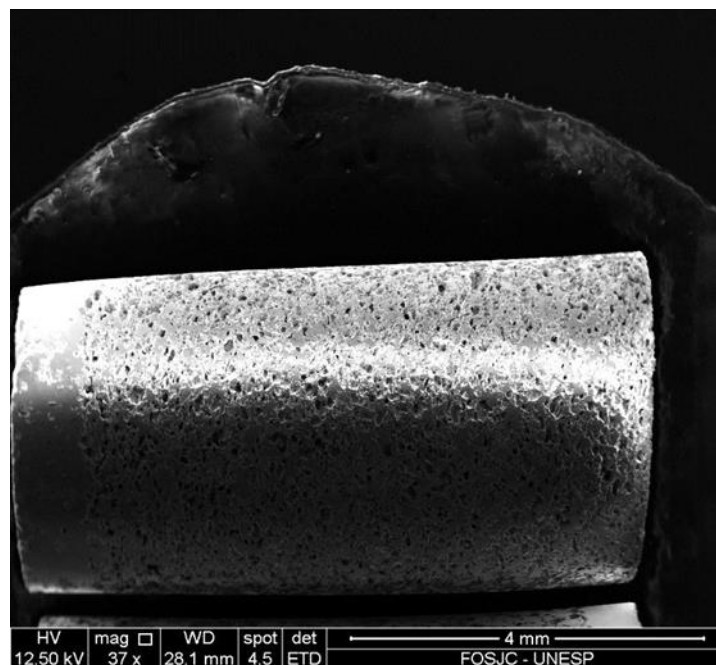


Figura 5 – Fotomicrografia da superfície: fotomicrografia panorâmica.

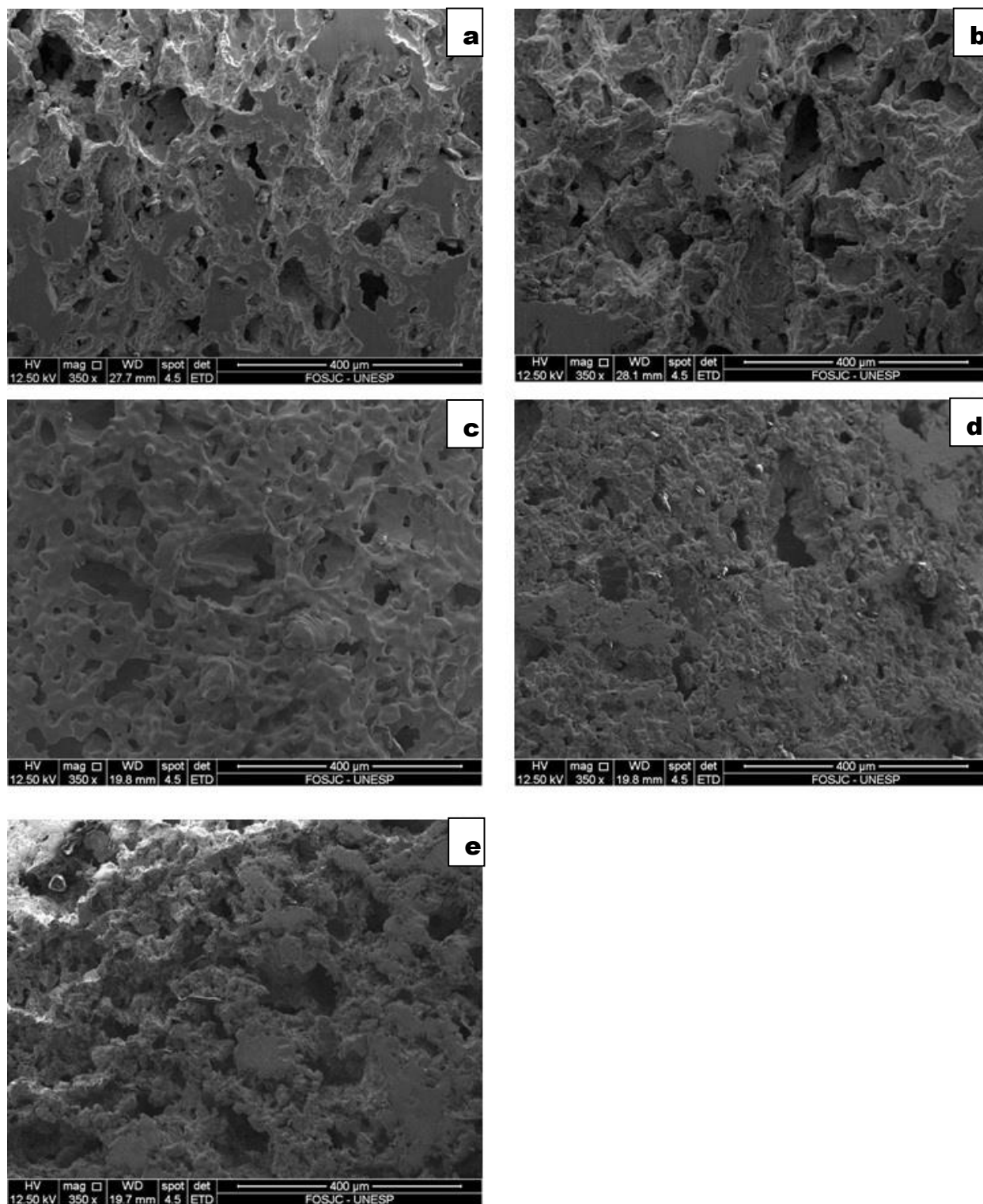


Figura 6– Fotomicrografia da superfície em MEV (350x): a) Grupo 01; b) Grupo 02; c) Grupo 03; d) Grupo 04; e) Grupo 05.

Na análise metalográfica detalhada do poro, aumento de 2500 x, realizada por MEV, pôde-se observar poros com áreas e formatos variados e interconectados (Figura 7). Os implantes demonstraram três tipos de poros: os microporos, os mesoporos e os macroporos. Os microporos eram pequenos e isolados, oriundos da porosidade residual do processo de sinterização, enquanto que os mesoporos e os macroporos eram abertos e interligados, oriundos da porosidade confeccionada pela adição da fase orgânica (ureia).

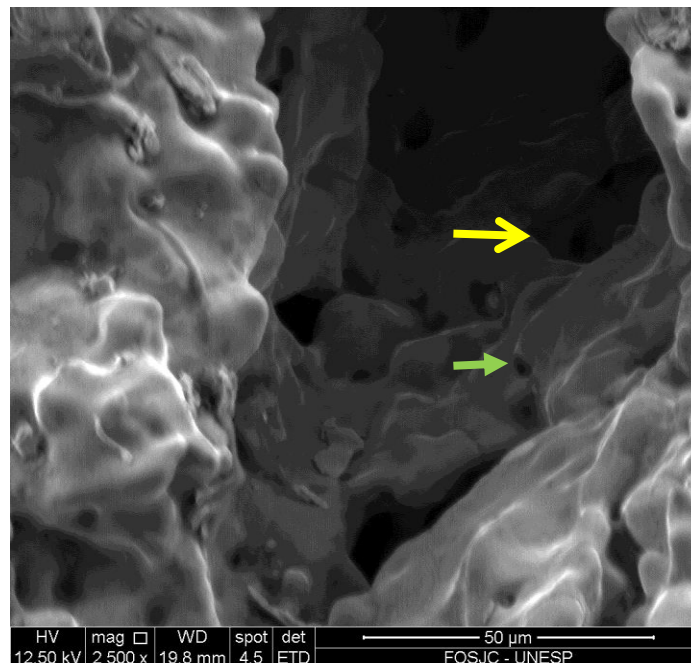


Figura 7 – Fotomicrografia MEV com aumento de 2500X: Metalografia do interior do poro superficial, mostrando microporos (→) e macroporos (→).

A análise da microtopografia interna do implante pode-se observar a interface do núcleo denso integrado à superfície porosa (Figura 8).

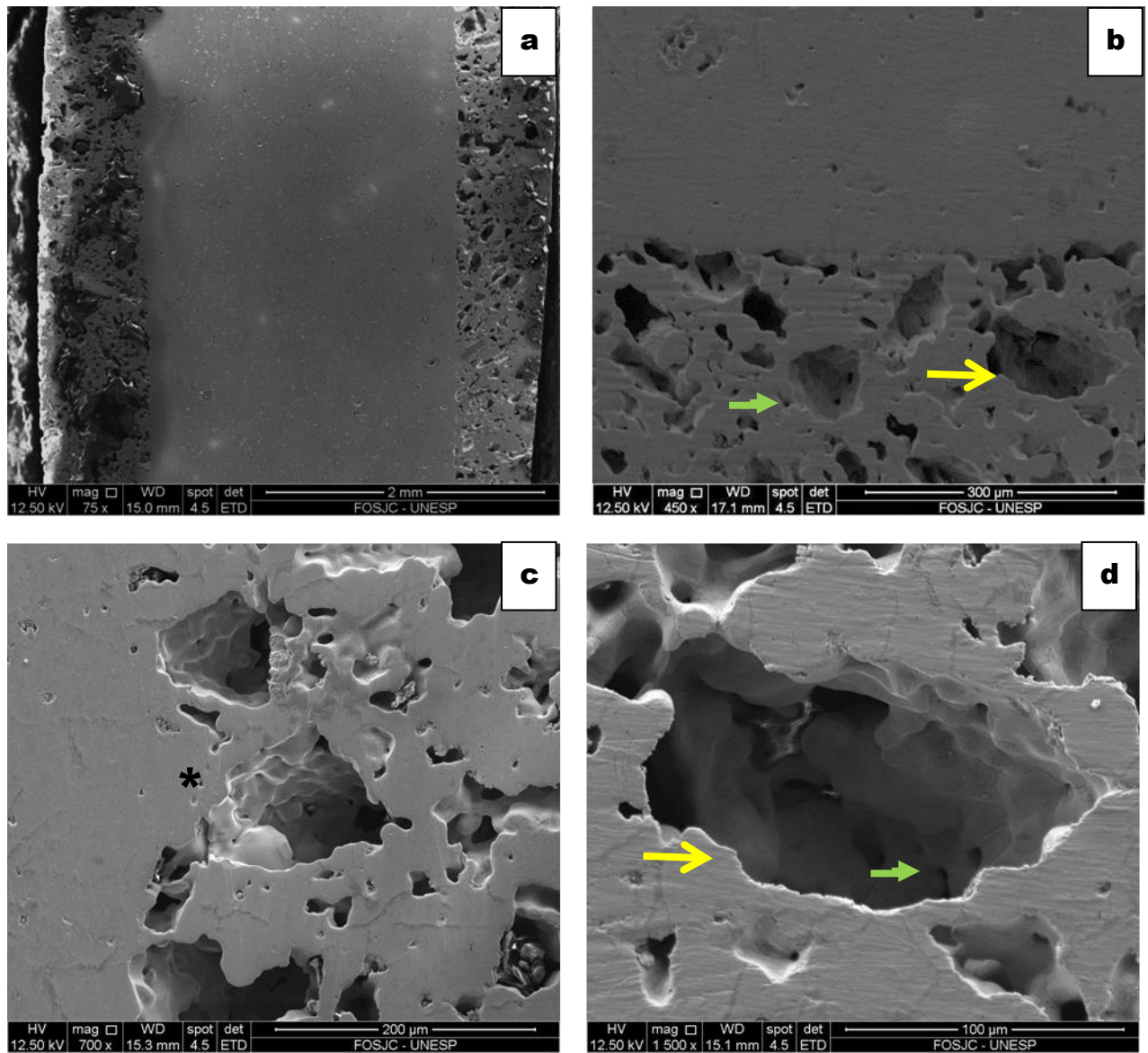


Figura 8 – Fotomicrografia em MEV interface: a) Aspecto geral da interface contínua superfície porosa com núcleo denso; b-c) Interface superfície porosa e núcleo denso(*); d) Presença de macroporos (→ amarelo) e microporos (→ verde).

Por meio do programa *Image J* (versão Java 1.6.0_20/ 64-bit), foi realizada a medida do diâmetro dos poros, utilizando a ferramenta *Straight*. Os dados encontrados foram submetidos à análise estatística descritiva.

A estatística descritiva do tamanho dos poros está descrita nas Tabela 1, seguida pela representação no gráfico (Figura 9).

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

IMPLANTE	N*	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MEDIANA
Grupo 1	5	113,00	$\pm 24,44$	120,50
Grupo 2	5	104,10	$\pm 16,16$	106,00
Grupo 3	5	105,00	$\pm 23,37$	110,00
Grupo 4	5	72,870	$\pm 8,533$	74,24
Grupo 5	5	102,70	$\pm 15,680$	94,26

* número de amostras

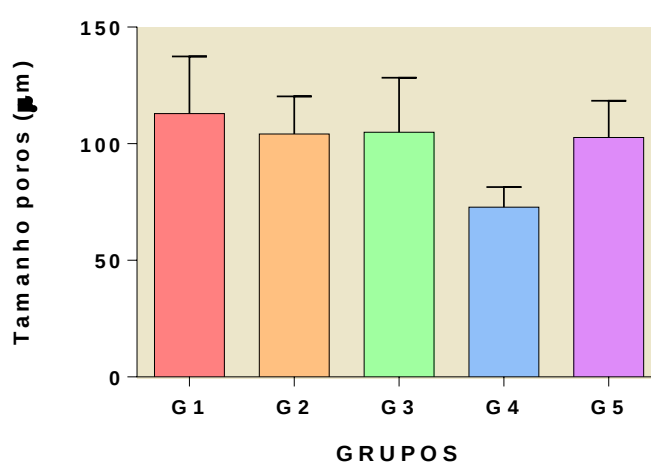


Figura 9 – Gráfico do tamanho dos poros.

Para melhor interpretação destes dados metalográficos foi utilizado o teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis. Com relação ao tamanho dos poros não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os cinco grupos ($kw = 9,386$; $p = 0,0521$).

A estatística descritiva da porcentagem dos poros está descrita na Tabela 2, seguida pela representação no gráfico (Figura 10).

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

IMPLANTE	N*	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MEDIANA
Grupo 1	5	39,06	$\pm 1,097$	38,94
Grupo 2	5	40,61	$\pm 7,818$	44,13
Grupo 3	5	39,91	$\pm 6,356$	40,06
Grupo 4	5	47,89	$\pm 4,538$	49,39
Grupo 5	5	42,55	$\pm 7,807$	40,86

* número de amostras

Para melhor interpretação destes dados metalográficos foi utilizado o teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis. Com relação à porcentagem de poros não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os cinco grupos ($kw = 7,674$; $p = 0,1043$).

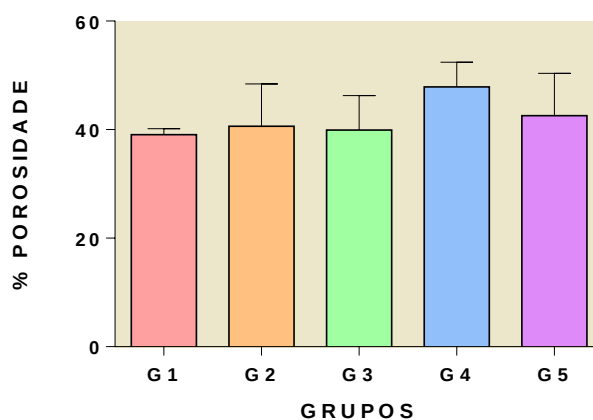


Figura 10 – Gráfico da porcentagem de poros.

6.2 Análise por EDS

Na análise por espectroscopia por dispersão de energia (EDS) uma amostra de cada grupo foi analisada para verificar os elementos químicos constituintes da mesma. A microanálise semiquantitativa mostrou os principais íons metálicos e a porcentagem relativa dos elementos que compõe cada liga proposta.

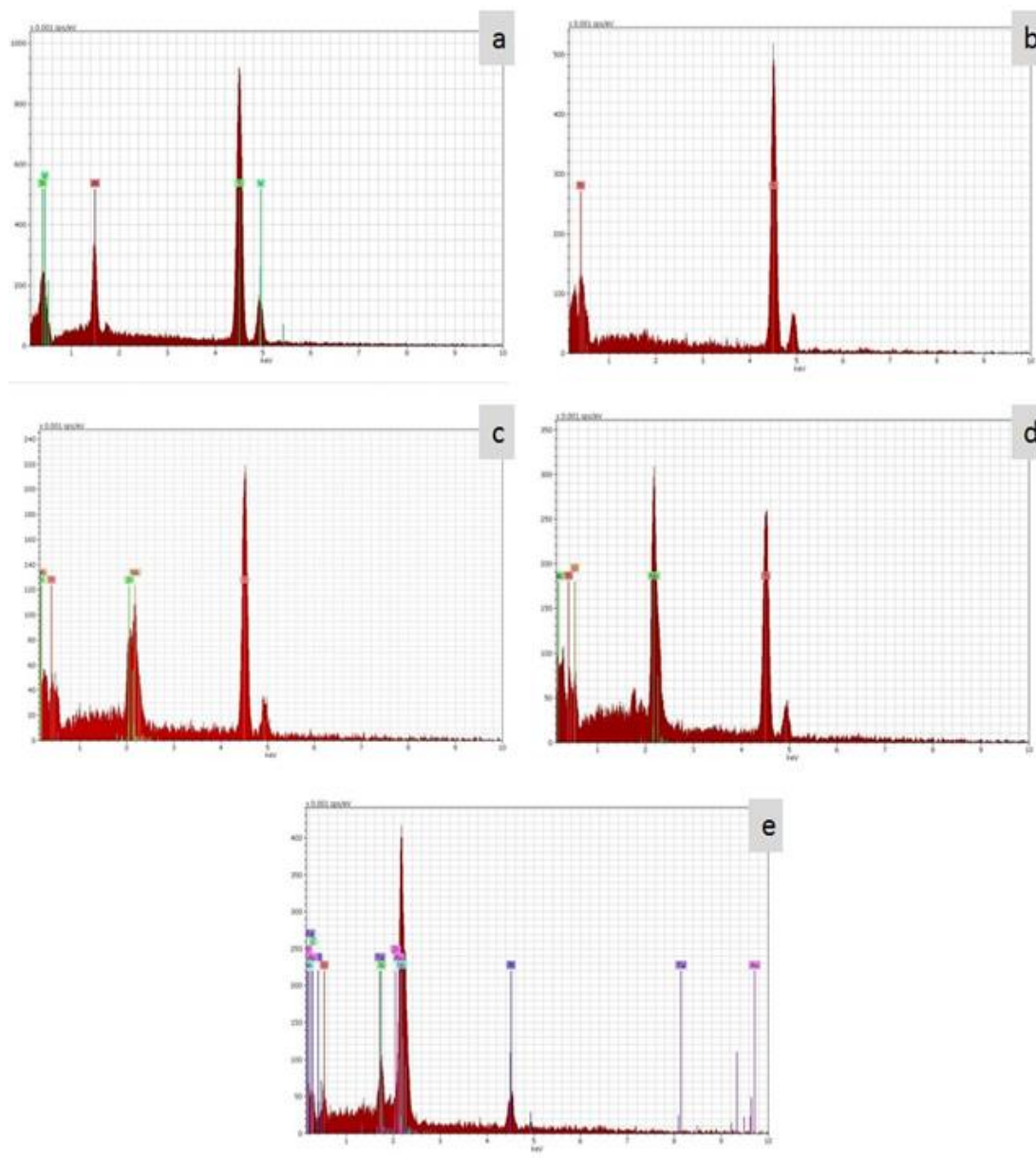


Figura 11- Difratograma da microanálise por espectroscopia por dispersão de energia (EDS) dos implantes: a) Grupo 01; b) Grupo 02; c) Grupo 03; d) Grupo 04; e) Grupo 05.

6.3 Análise Histológica da Neoformação Óssea

Não foi observada intercorrência no período pós-operatório dos animais, uma vez que não houve qualquer evidência de inflamação ou infecção no sítio cirúrgico.

Macroscopicamente, os implantes exibiram crescimento ósseo ao redor de sua superfície, em contato com a cortical, independente do tipo de liga e do tempo de eutanásia. No entanto, esse crescimento foi mais exuberante com a progressão do tempo, havendo até, em alguns casos, uma neoformação óssea recobrando parcial ou totalmente os implantes. O tecido medular apresentou-se com consistência amolecida, exibindo coloração ora amarelada ora avermelhada.

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

Nos animais eutanasiados no período de 2 semanas após a cirurgia, pôde-se notar proliferação de trabéculas ósseas a partir da face interna da cortical óssea, próxima ao implante, em direção ao mesmo (Figura 12a,12b,12c,12d,12e,12f). Em alguns animais, independente do tipo de liga, houve neoformação óssea, sob a forma de trabéculas mais desorganizadas, na margem superior da cortical óssea preexistente, ou seja, da região periosteal (Figura 12b). Tais trabéculas apresentavam-se imaturas e não pareciam proliferar em direção a região peri-implantar, como é o caso da neoformação óssea de origem endosteal, mas apenas

aumentavam a espessura da cortical pré-existente (Figura 12c). Na interface osso-implante, uma margem de tecido osteóide (Figura 12e) ou de tecido ósseo neoformado, ainda imaturo quanto a sua organização estrutural, pôde ser observado em grande parte das amostras. No caso dos implantes confeccionados com as ligas experimentais, notou-se maior proliferação celular para o interior dos poros, sendo que aqueles que estavam mais preenchidos localizavam-se na periferia dos implantes (Figura 12f). Em alguns poros, mesmo no período de 2 semanas, observou-se início de formação de matriz osteóide.

Os implantes do grupo 5, exibiram maior formação de trabéculas ósseas ao redor da superfície do implante, sendo que algumas amostras desse grupo apresentaram neoformação óssea mais intensa. Tal neoformação por vezes envolveu até mesmo as porções mais apicais da região medular peri-implantar.

Nos animais eutanasiados após 4 semanas, foi possível observar que o tecido ósseo neoformado na interface osso-implante e na região interna da cortical óssea pré-existente, exibia grau de organização e maturação mais avançado do que no período anterior (Figura 13a,13b,13c,13d). Pôde-se observar também que houve maior proliferação de tecido ósseo quando comparado com período de 2 semanas para o interior dos poros (Figura 13c,13e,13f), chegando próximo ao núcleo denso (Figura 13e), resultando, por vezes, no seu preenchimento total (Figura 13e,13f).

Nos animais submetidos à eutanásia 8 semanas após a cirurgia, notou-se intensa neoformação óssea na interface dos implantes, confirmando a osseointegração (Figura 14a,14b,14c,14d). Neste período, foi grande a interconexão entre osso e implante. Assim como nas amostras referentes a 4 semanas, neste período também não houve diferença qualitativa de neoformação óssea entre os grupos.

Na região adjacente a alguns implantes, ainda no período de 8 semanas, observou-se o padrão de remodelação óssea,

principalmente na cortical pré-existente. Nessas regiões de remodelação, notaram-se áreas de reabsorção e neoformação óssea, caracterizadas pela presença de lamelas intersticiais (Figura 14b). Outra característica observada foram trabéculas ósseas neoformadas a partir do endóstio que se uniram e cresceram em direção a superfície do implante, formando uma nova faixa de tecido ósseo abaixo da cortical pré-existente. Além disso, no interior dos poros notou-se tecido ósseo maduro e organizado (Figura 14e). Tal tecido era altamente celularizado, exibindo diversas lacunas de osteócitos, sendo possível observar a estruturação de um canal de Havers dentro de um poro (Figura 14f).

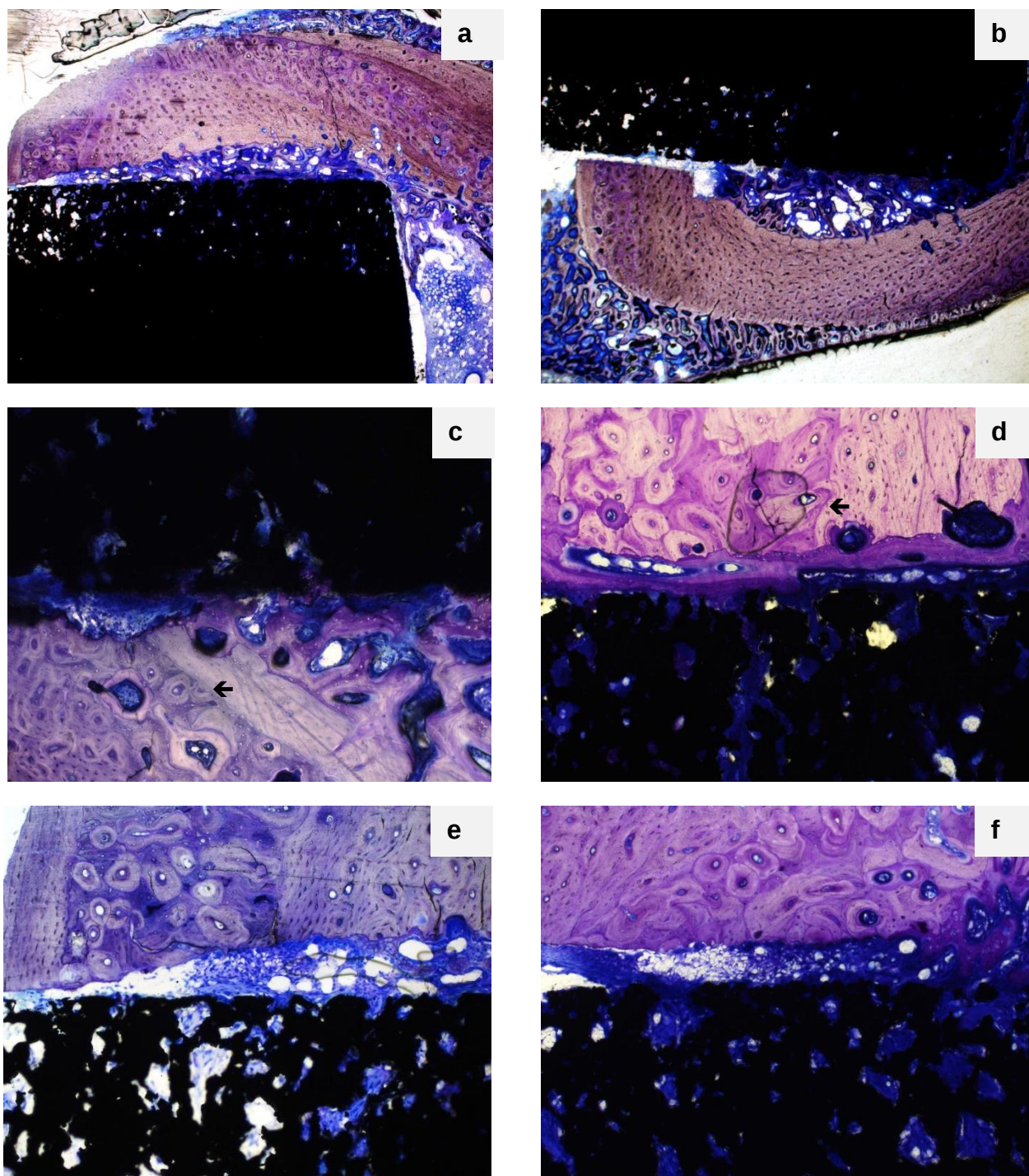


Figura 12 - Fotomicrografia em microscopia óptica referente ao período de 2 semanas: a) visão panorâmica da interface osso/implante face medial - 25x; b) visão panorâmica da interface osso/implante face distal - 25x; c-d) neoformação óssea (↔), de origem endosteal, ao redor de implante 100x; e) interface osso/implante poroso - 100x; f) proliferação óssea ao redor de implante poroso com preenchimento dos poros - 100x.

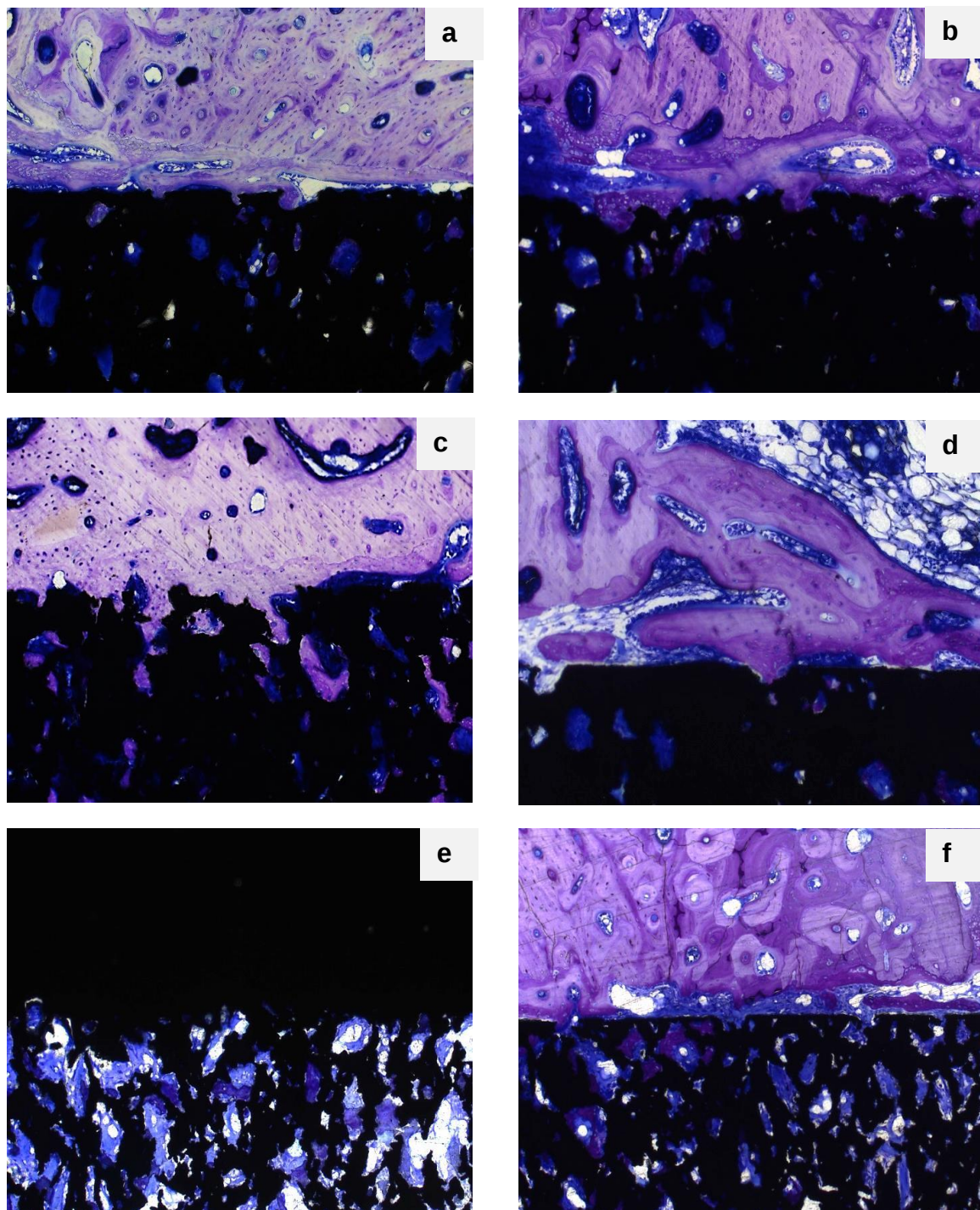


Figura 13 - Fotomicrografia em microscopia óptica referente ao período de 4 semanas: a) visão da osseointegração de implante poroso - 100x; b) visão panorâmica da interface osso/implante poroso 100x; c) osseointegração de implante poroso, e crescimento de osso para o interior dos poros - 100x; d) trabécula óssea de origem endosteal ao redor da amostra - 100x; e) poros preenchidos por tecido ósseo neoformado e imaturo, em amostras 100x; f) poros preenchidos totalmente ou parcialmente por tecido ósseo maduro, 100x.

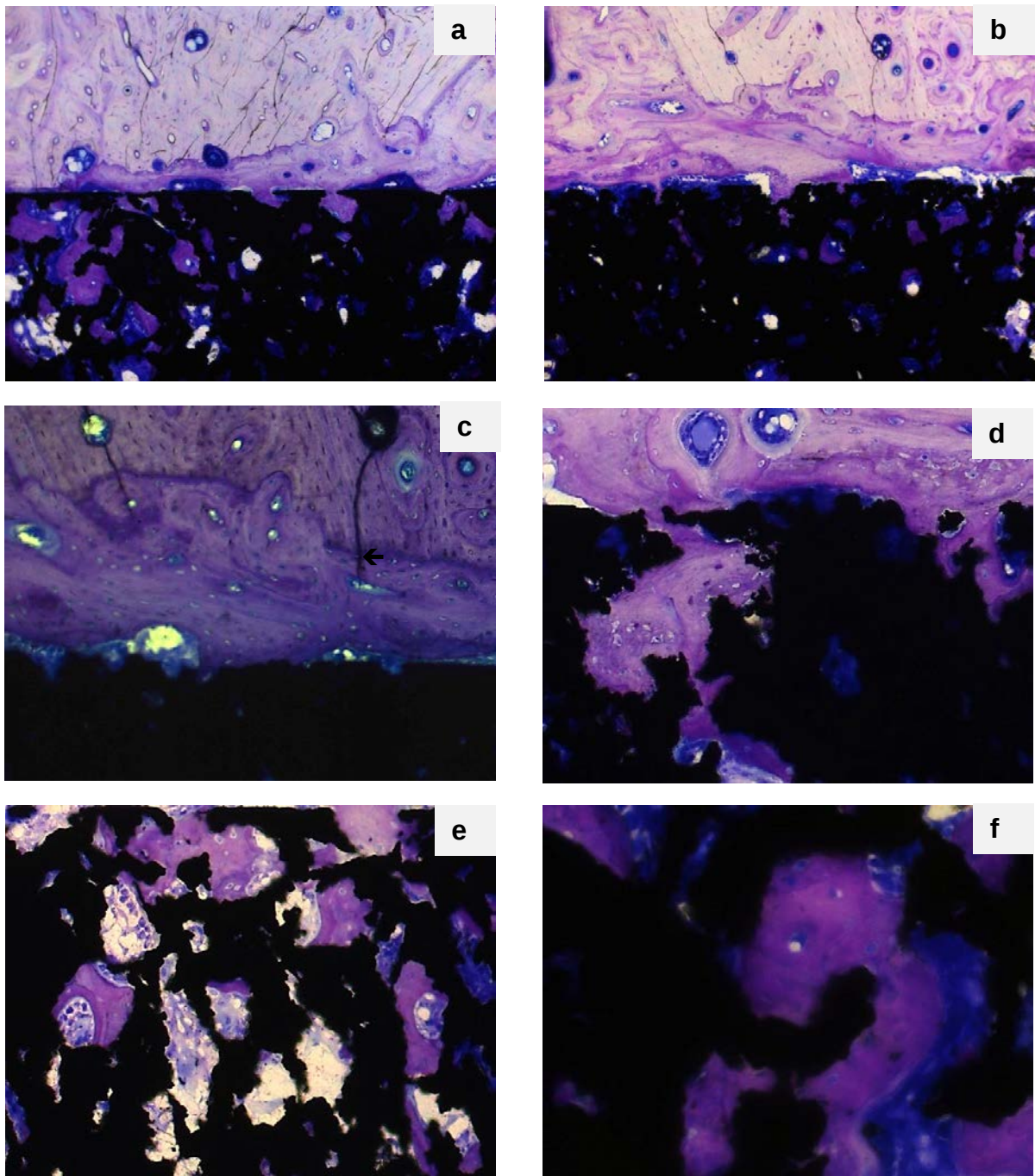


Figura 14 - Fotomicrografia em microscopia óptica referente ao período de 8 semanas: a) osseointegração à amostra- 100x; b) osseointegração da amostras, com áreas de remodelação óssea na cortical pré-existente - 100x; c) interface osso/amostra porosa, com áreas de remodelação óssea (↖) na cortical pré-existente - 100x; d) interface osso/amostra porosa, com crescimento de osso para o interior dos poros - 100x; e) poros total ou parcialmente preenchidos por tecido ósseo maduro, 100x; f) canal de Havers formado dentro de um poro -

6.4 Análise Histomorfométrica

A influência dos cinco tipos de materiais dos implantes (G1, G2, G3, G4 e G5) sob três diferentes tempos de eutanásia (2, 4 e 8 semanas) sobre a neoformação óssea constitui quinze condições experimentais a serem estudadas (5 x 3). A estatística descritiva dos mesmos é apresentada na Tabela 3 e representada na Figura 15 mostrada a seguir.

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

TIPO DE MATERIAL (Grupo)	TEMPO DE EUTANÁSIA (Semanas)		
	2	4	8
G1	34,67 $\pm$ 3,78	45.11 $\pm$ 7.46	56.67 $\pm$ 0,50
G2	48.11 $\pm$ 4.00	55.67 $\pm$ 6.64	55.28 $\pm$ 2.43
G3	41.61 $\pm$ 2.06	53.22 $\pm$ 5.50	63.17 $\pm$ 6.11
G4	50.67 $\pm$ 4.92	57.39 $\pm$ 4.84	60.27 $\pm$ 0.42
G5	53.11 $\pm$ 1.55	54.22 $\pm$ 1.27	61.8 $\pm$ 0.25

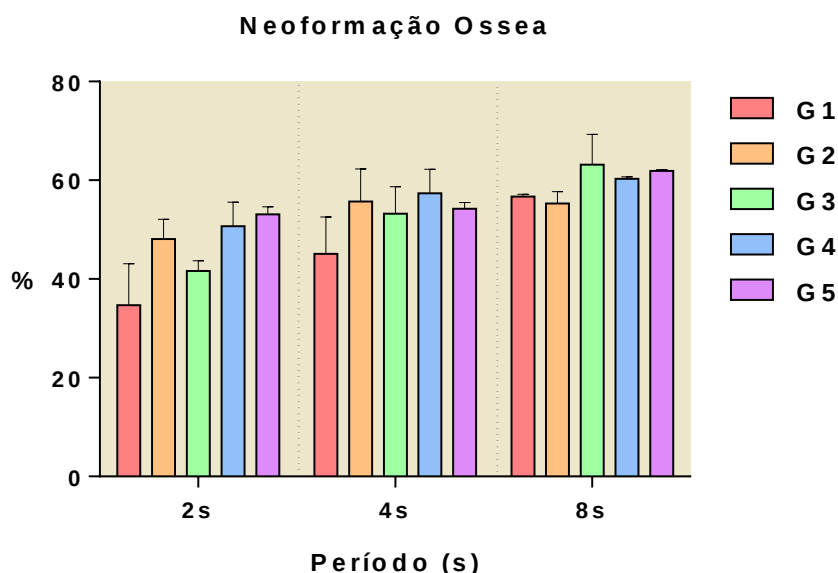


Figura 15 - **Neoformação óssea**. Gráfico de colunas (média $\pm$ desvio padrão) dos valores de neoformação óssea (%), obtidos sob cinco tipos de materiais e três tempos de eutanásia (em semanas).

Os dados obtidos na estatística descritiva permitiram concluir que a taxa de neoformação óssea aumentou gradativamente no decorrer dos períodos estudados. Observou-se ainda, que os grupos G2, G3, G4 e G5, apresentaram taxas de neoformação óssea maiores, quando comparado ao grupo G1.

Para determinar a influência das variáveis: tipo de material e tempo de eutanásia foi aplicado o teste estatístico ANOVA de dois fatores, representado na Tabela 4 e na Figura 16. A análise revelou que os efeitos tipo de material e tempo de eutanásia apresentaram diferença estatisticamente significativa.

Tabela 4 - Resultados do teste estatístico ANOVA de medidas repetidas para os dados de neoformação óssea (%) obtidos em 03 coelhos

EFEITO	GRAU DE LIBERDADE	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	RAZÃO F	P
Material	4	698,25	174,5	8,27	0,00001*
TE**	2	1436	718,1	34,06	0,00001*
Interação	8	380,4	47,55	2,25	0,05100
Erro	30	632,40	30		
Total	44	3147			

** tempo de eutanásia

* diferença estatisticamente significativa

A partir dos dados da estatística descritiva, quando se considera a influência do tipo de material, por meio do teste estatístico ANOVA (Tabela 4), pôde-se concluir que os grupos diferem entre si ($p = 0,00001$). O efeito dos diferentes tempos de eutanásia 2, 4 e 8 semanas, sobre a neoformação óssea, também diferem entre si ($p = 0,00001$). O efeito interação, não estatisticamente significativa ($p = 0,05100$), indica

que o aumento na quantidade de neoformação óssea, obtida devido ao tipo de material nos diferentes períodos, é similar.

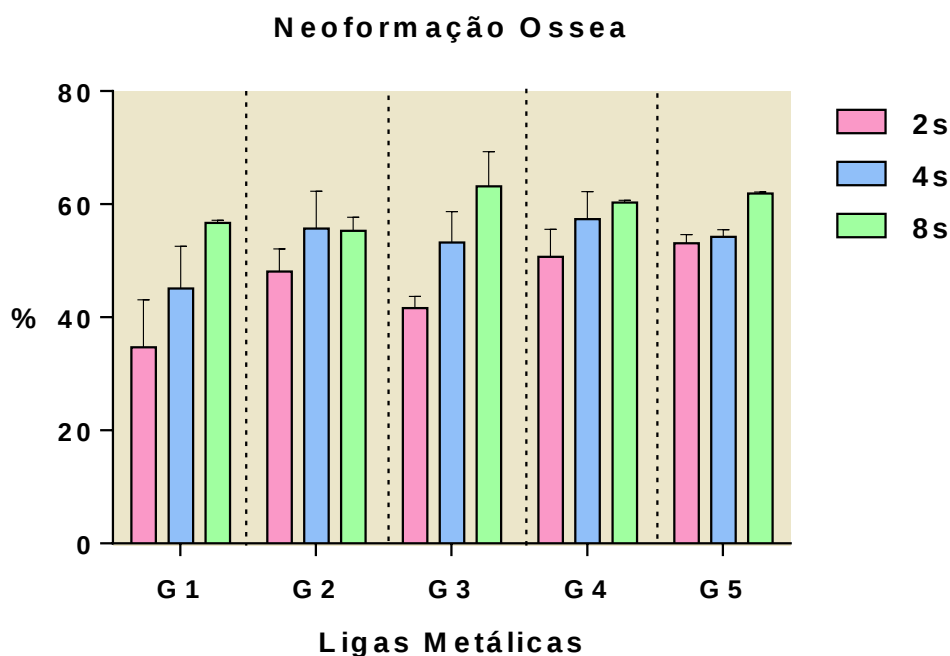


Figura 16 - Gráfico ANOVA dos valores médios de neoformação óssea (%) obtidos segundo as condições experimentais.

Quando se comparou as médias da neoformação óssea considerando o efeito tipo de liga, por meio do teste de Tukey (5%), Tabela 5, verificou-se que todas as ligas apresentaram maior neoformação óssea com relação ao G1, que exibiu menor neoformação óssea, sendo observada diferença estatisticamente significativa. Entretanto, a liga que apresentou maior neoformação óssea foi a liga do G5.

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

IMPLANTE	MÉDIA	GRUPOS NÃO HOMOGÊNEOS
G5	56,40	A
G4	56,10	A
G2	53,00	A
G3	52,70	A
G1	45,50	B*

* letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa

Quando se comparou as médias da neoformação óssea considerando o efeito tempo de eutanásia, por meio do teste de Tukey (5%), Tabela 6, verificou-se que a condição que apresentou maior neoformação óssea foi no período de 8 semanas, sendo observada diferença estatisticamente significativa com relação aos períodos de 2 e 4 semanas, os quais também diferiram entre si.

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

TEMPO DE EUTANÁSIA (SEMANAS)	MÉDIA	GRUPOS NÃO HOMOGÊNEOS
8	59,50	A
4	53,10	B*
2	45,60	C*

* letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa

Quando se comparou as médias da neoformação óssea considerando o efeito tempo de eutanásia e os materiais, por meio do teste de Tukey (5%), Tabela 7, verificou-se que no período inicial as ligas apresentaram maiores neoformação óssea, diferindo do grupo Ticp. Já para o período de 4 semanas, houve apenas diferença estatística entre o

grupo 1 e 4, sendo que o G4 obteve maior média neste período. No período de 8 semanas, não houve diferença estatística entre os grupos.

Tabela 7- Resultado do teste de multiplica comparação de Tukey (5%) para as médias de neoformação óssea (%), sob efeito tipo de material e tempo de eutanásia

TESTE DE MULTIPLICA COMPARAÇÃO DE TUKEY	DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS	DIFERENÇA ESTATÍSTICA?
2 semanas		
Ti vs. Ti-Al-V	-13.45	Sim
Ti vs. Ti-Zr-Nb	-6.943	Não
Ti vs. Ti-Nb	-16.00	Sim
Ti vs. Ti-Nb-Zr-Ta	-18.44	Sim
Ti-Al-V vs. Ti-Zr-Nb	6.503	Não
Ti-Al-V vs. Ti-Nb	-2.553	Não
Ti-Al-V vs. Ti-Nb-Zr-Ta	-4.997	Não
Ti-Zr-Nb vs. Ti-Nb	-9.057	Não
Ti-Zr-Nb vs. Ti-Nb-Zr-Ta	-11.50	Sim
Ti-Nb vs. Ti-Nb-Zr-Ta	-2.443	Não
4 semanas		
Ti vs. Ti-Al-V	-10.55	Não
Ti vs. Ti-Zr-Nb	-8.107	Não
Ti vs. Ti-Nb	-12.28	Sim
Ti vs. Ti-Nb-Zr-Ta	-9.107	Não
Ti-Al-V vs. Ti-Zr-Nb	2.447	Não
Ti-Al-V vs. Ti-Nb	-1.723	Não
Ti-Al-V vs. Ti-Nb-Zr-Ta	1.447	Não
Ti-Zr-Nb vs. Ti-Nb	-4.170	Não
Ti-Zr-Nb vs. Ti-Nb-Zr-Ta	-1.000	Não
Ti-Nb vs. Ti-Nb-Zr-Ta	3.170	Não
8 semanas		
Ti vs. Ti-Al-V	1.393	Não
Ti vs. Ti-Zr-Nb	-6.493	Não
Ti vs. Ti-Nb	-3.607	Não
Ti vs. Ti-Nb-Zr-Ta	-5.220	Não
Ti-Al-V vs. Ti-Zr-Nb	-7.887	Não
Ti-Al-V vs. Ti-Nb	-5.000	Não
Ti-Al-V vs. Ti-Nb-Zr-Ta	-6.613	Não
Ti-Zr-Nb vs. Ti-Nb	2.887	Não
Ti-Zr-Nb vs. Ti-Nb-Zr-Ta	1.273	Não
Ti-Nb vs. Ti-Nb-Zr-Ta	-1.613	Não

A partir dos dados obtidos, pode-se observar (Figura 17) que a neoformação óssea aumentou gradativamente de acordo com os períodos de eutanásia. No período de 2 semanas o grupo que obteve maior quantidade de neoformação óssea foi o grupo G5. Já para o período intermediário de 4 semanas no G4 foi observada maior quantidade de formação óssea, enquanto que no período de 8 semanas o grupo G3, foi que apresentou a maior porcentagem de neoformação óssea, entretanto não houve diferença estatística entre os grupos analisados.

Foi possível observar que o grupo que exibiu menor quantidade de neoformação óssea foi o G1, para todos os períodos avaliados.

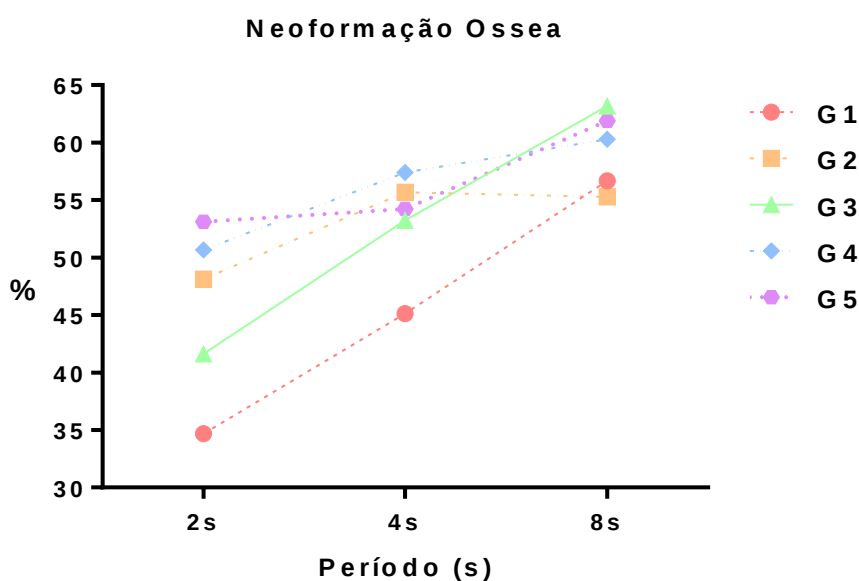


Figura 17 - **Neoformação óssea**. Gráfico XY (média) dos valores de neoformação óssea (%), obtidos sob cinco tipos de implantes e três tempos de eutanásia (em semanas).

7 DISCUSSÃO

No processo de desenvolvimento de um implante metálico utilizado para aplicação biomédica, estão envolvidas diversas áreas tais como engenharia de materiais, biomedicina, odontologia, tecnologia entre outras. Atualmente sabe-se que os materiais mais utilizados para confecção de implantes são o titânio comercialmente puro (Ticp) e a liga titânio-6alumínio-4vanádio (Ti-6Al-4V), utilizados respectivamente na odontologia e ortopedia. Estes materiais apresentam boa biocompatibilidade, resistência à corrosão e boa propriedade mecânica, características que os torna atrativos para utilização na área biomédica (Freese et al., 2001; Lui et al., 2004; Callister, 2007; Ferrandini et al., 2007; Park CH et al., 2011; Colombo et al., 2012; Grandfield et al., 2013; Wu et al., 2013).

Neste estudo foi comparada a neoformação óssea *in vivo* entre diferentes ligas de titânio em amostras de núcleo denso integrado à superfície porosa, confeccionados pela técnica da metalurgia do pó. Os resultados mostraram que as amostras, independente do tipo de material produzido, exibiram osseointegração nos períodos de 2, 4 e 8 semanas após a implantação, sendo essa integração mais evidente nos períodos mais longos. Entretanto, a neoformação óssea foi maior nas ligas experimentais do que nos implantes confeccionados por Ticp e Ti-6Al-4V que são os materiais mais comumente utilizados.

O Ticp e a liga Ti-6Al-4V se destacam na utilização para confecção dos implantes cirúrgicos por apresentarem propriedades adequadas, tais como mecânica, resistência à corrosão, resistência à fadiga e biocompatibilidade, características ideais para um biomaterial. (Escada et al., 2011; Laheurte et al., 2010). Contudo esses biomateriais

possuem módulo de elasticidade muito mais elevado quando comparado ao tecido ósseo. De acordo com a literatura o valor deste módulo do Tícp e da Ti-6Al-4V são 100 GPa e 110 GPa, respectivamente, enquanto que do tecido ósseo é em torno de 30 GPa (Niinomi, 2008; Geetha et al., 2009; Niinomi et al., 2012; Abdel-Hady Gepreel M, Niinomi M, 2013; Wu et al., 2013). Apesar desta diferença entre o módulo de elasticidade do implante e osso a utilização desses biomateriais não foi impedida.

No entanto foi relatado por diversos autores a ocorrência de um fenômeno designado como *stress shielding* que ocorre quando o módulo de elasticidade do implante é substancialmente mais elevado do que o osso circundante. As tensões aplicadas neste conjunto (implante-osso) não são transferidas de forma homogênea e o estresse é predominantemente transferido para o implante e não pelo tecido ósseo. Esse fenômeno é descrito como uma reabsorção óssea ao redor do implante, que pode resultar futuramente na perda deste implante e possível fratura do osso. (Niinomi et al., 2008; Geetha et al., 2009; Laheurte et al., 2010; Niinomi 2012; Guo et al., 2013b; Hoerth et al., 2014).

Atualmente, estudos relatam que o módulo de elasticidade pode ser influenciado pela alteração estrutural da amostra (Wen et al., 2002; Wang et al., 2010; Biesiekierski et al., 2012; Maya et al., 2012; Xu et al., 2013). Modificações na superfície dos implantes têm sido propostas formando arcabouços porosos, que visam mimetizar a estrutura de um tecido ósseo, assim influenciando positivamente os osteoblastos os quais poderão se aderir, multiplicar e migrar para o interior desses poros, melhorando a condutividade óssea e/ ou bioatividade do material e acelerando o processo de osseointegração (Liu et al., 2004; Bottino et al., 2008; Dabrowski et al., 2010; Basalah et al., 2012; Sverzut et al., 2012). Os poros confeccionados na superfície dos materiais promoveram uma redução no valor do módulo de elasticidade (Wang et al., 2010; Biesiekierski et al., 2012; Maya et al., 2012; Xu et al.,

2013) . Wang et al. (2010), fabricaram amostra com a liga Ti-10Nb-10Zr apresentando 69% de porosidade e obtiveram módulo de elasticidade de 3,9 GPa e tração mecânica de 67 MPa. Xu et al. (2013), desenvolveram amostras com liga de Ti-25Nb com 70% de porosidade e força de compressão de 94,8 MPa, demonstraram módulo de elasticidade de 2,23 GPa.

Diversas metodologias têm sido utilizadas para a obtenção de materiais porosos visando aplicações biomédicas, tais como sinterização seletiva a laser e modelagem por fusão e deposição, entretanto são técnicas com elevado custo e que necessitam de maior tempo para confecção do material (Marin et al., 2010). Com isso, têm-se proposto técnicas de confecção economicamente viáveis e com finalidade de melhorar as propriedades mecânicas, biocompatibilidade e módulo de elasticidade das ligas de titânio (Santos, 2006; Santos et al., 2008; Ning et al., 2010). Uma das técnicas propostas por diversos trabalhos é a metalurgia do pó (Bottino et al., 2009; Dabrowski et al., 2010; Fojt, Joska., 2013; Xu et al., 2013), a qual mostra-se uma alternativa viável, por permitir a obtenção de peças com geometrias complexas e próximas às dimensões finais (*“near-net-shape”*). Tal técnica apresenta-se eficiente na produção de implantes porosos uma vez que é possível obter estrutura altamente porosa com poros interconectados e permite o controle da estrutura porosa (Medeiros et al., 2008; Dabrowski et al., 2010, Vasconcellos et al. 2008a, 2012; Fojt, Joska., 2013; Xu et al., 2013). Outras características inerentes ao processo tais como economia de matéria prima, redução das etapas de usinagem, trabalho em temperaturas baixas, melhor acabamento superficial e maiores facilidades operacionais, podem reduzir o custo final da fabricação de peças metálicas confeccionadas pela metalurgia do pó (Pilliar, 1998; Froes, Eylon, 2000; Santos, 2006; Santos et al., 2008). Inicialmente a obtenção de ligas de titânio por esta técnica se dá a partir de pós-elementares ou pré-ligados, os quais podem ser misturados com substâncias como

carboreto de amônio e carbamida que são utilizadas como aditivos orgânicos, a fim de que amostras porosas possam ser confeccionadas (Bram et al., 2000), sendo esta característica mais uma vantagem desta técnica. No presente estudo, os implantes com superfície porosa integrada ao núcleo denso, foram confeccionados pela técnica de metalurgia do pó, na qual os pós metálicos foram misturados com o aditivo orgânico, ureia, para obtenção da superfície porosa, enquanto que no núcleo denso foi produzido utilizando apenas os pós das ligas. A metalurgia do pó se mostrou eficaz para a fabricação dos implantes com diferentes ligas, já que foi possível realizar a confecção do núcleo denso com a superfície porosa integrada em única etapa, como demonstrado por Vasconcellos et al., 2012.

Há um grande número de trabalhos que investigam a influência da porosidade e do tamanho dos poros no comportamento do tecido ósseo frente ao implante (Deporter et al., 1996; Bobyn et al., 1987; Bram et al., 2000; Kim et al., 2000; Deporter et al., 2002; Frosch et al., 2002, 2003; Liang et al., 2003; Brentel et al., 2006; Otsuki et al., 2006; Li et al., 2007; Zhang et al., 2009; Vasconcellos et al., 2008a, 2008b, 2010, 2012; Faria et al., 2010; Wazen et al., 2010; Teixeira et al., 2012; Yang et al., 2013). No entanto, nenhum consenso ainda foi alcançado no que diz respeito ao seu tamanho ideal (Li et al., 2007; Blinova et al., 2010; Barbas et al., 2012; Basalah et al., 2012; Teixeira et al., 2012; Vasconcellos et al., 2012; Yang et al., 2013). Diversos autores acreditam que a alteração no tamanho e na forma dos poros podem otimizar o crescimento do tecido ósseo para o interior do implante, uma vez que podem influenciar a proliferação de osteoblastos (Bobyn et al., 1987; Bowers et al., 1992; Pamula et al., 2008; Teixeira et al., 2012). A maioria dos estudos relata uma faixa de tamanho que varia entre 40 a 500 μm (Pilliar, 1998; Nishiguchi et al., 2001; Deporter et al., 2002; Barrère et al., 2003; Fujibayashi et al., 2004; Brentel et al., 2006; Vasconcellos et al., 2008, 2010, 2012; Faria et al., 2010; Teixeira et al., 2012; Yang et al., 2012).

Entretanto, estudos relataram que poros pequenos exibindo apenas 45 μm ou poros grandes com 1000 a 1500 μm também conseguem promover a colonização de osteoblastos para seu interior, favorecendo a osseointegração (Frosch et al., 2002; Nguyen et al., 2004; Otsuki et al., 2006; Chen et al., 2009; Barbas et al., 2012) No presente estudo, a faixa granulométrica específica de 177 a 250 μm dos grânulos da ureia, permitiu obter o tamanho médio dos poros entre os grupo na faixa de 72 a 113 μm , estando em acordo com a faixa de tamanho de poros propostos por estudos prévios acima citados. Tal valor mostrou-se adequado para permitir a proliferação de células osteogênicas para o interior do implante, favorecendo assim o imbricamento mecânico na interface osso/implante como demonstrado também em outros estudos (Bobyen et al., 1987; Deporter DA et al., 1996; Pilliar, 1998; Bram et al., 2000; Deporter D et al., 2002; Wei et al., 2002; Frosch et al., 2002, 2003; Brentel et al., 2006; Otsuki et al., 2006; Li et al., 2007; Vasconcellos et al., 2008, 2010, 2012; Zhang et al., 2009; Dabrowski et al., 2010; Faria et al., 2010; Wazen et al., 2010).

Em nosso estudo, no período inicial de 2 semanas, pode-se observar a formação óssea em todos grupos, independente do tamanho do poro. Entretanto, a liga Ti-35Nb que apresentou o menor tamanho do poro (72,870 μm) obteve maior média na neoformação óssea, quando comparado aos implantes confeccionados com Ticp e Ti-6Al-4V o qual foi observado maior tamanho do poro, 113 μm e 104 μm , respectivamente, havendo diferença estatística entre o grupo Ticp e Ti-35Nb. Este resultado está de acordo com o estudo prévio de Teixeira et al. (2012), que compararam diferentes tamanhos de poros (62 μm , 130 μm e 312 μm) e também verificaram que os poros menores promovem maior expressão do fenótipo de osteoblastos nas amostras.

Conjuntamente aos tamanhos dos poros, outro aspecto importante e foco de diversos estudos é a quantidade de poros e sua inteconectividade, pois deve haver uma quantidade suficiente para

permitir a adesão e a proliferação das células para o interior dos poros associado ao transporte de fluidos corpóreos. Neste presente estudo a porcentagem de porosidade obtida variou na faixa de 39 a 47 % para os grupos analisados, não tendo diferença estatística entre eles. Gagg et al. (2013), obtiveram uma variação na porosidade de 30 a 65 %. A maioria dos estudos relata que a porcentagem de porosidade entre 25 e 67% seria ideal para uma amostra porosa (Nishiguchi et al., 2001; Wen et al., 2002; Fujibayashi et al., 2004; Brentel et al., 2006; Li et al., 2007; Vasconcellos et al., 2008a, 2008b, 2010, 2012; Zhang et al., 2009; Wazen et al., 2010). Contudo, Wang et al. (2010), analisaram o comportamento de osteoblastos em amostras confeccionadas com a liga Ti-Nb-Zr e verificaram que foi melhor na amostras com porosidade de 69%, quando comparadas as amostras densas. Porosidade maiores também foram relatadas em implantes confeccionados com liga de titânio T1-25Nb, com faixa de 60-70% e verificou-se que houve crescimento ósseo em implantes com porosidade de 70% (Maya et al., 2012; Xu et al., 2013).

Além da porcentagem de poros, a interconexão dos poros também denota um importante papel na osseointegração, afetando diretamente a osteocondução (Fujibayashi et al., 2004; Gan et al., 2004; Li et al., 2007; Dabrowski et al., 2010; Faria et al., 2010). Otsuki et al. (2006), mostraram que a estrutura porosa deve ser interconectada para favorecer a interligação entre o osso e implante, contudo não há um consenso na literatura sobre o tamanho ideal dos poros e porcentagem de poros presentes. Poros interconectados com aspecto de rede permitem o transporte de sangue, células, assim proporcionando uma estrutura para formação de tecido ósseo no interior do implante (Li et al., 2007; Zhang et al., 2009; Dabrowski et al., 2010; Barbas et al., 2012), promovendo melhor resistência em um menor período de tempo, além de favorecer maior área de contato osso/implante e auxiliar na estabilidade a longo prazo (Pilliar, 1998; Vasconcellos et al., 2008a, 2008b, 2010; Brentel et al., 2006; Zhang et al., 2009; Faria et al., 2010; Wazen et al., 2010). Nas

imagens obtidas por MEV, realizadas neste estudo foi possível notar a interligação entre os poros a qual permitiu a proliferação de tecido ósseo para os poros mais centrais.

Além da diferença entre o módulo de elasticidade osso-implante, foi reportado na literatura outro fator danoso referente ao material, independente da topografia do implante que é a liberação de íons do material durante seu contato com o organismo. A liga Ti-6Al-4V mostrou-se vulnerável na degradação dos íons alumínio (Al) e vanádio (V), liberados nos tecidos podendo produzir efeitos citotóxicos (Ferrandini et al., 2007; Bigi et al., 2008; Geetha et al., 2009; Biesiekierski et al., 2012; Nag, Banerjee, 2012; Niinomi et al., 2012; Park YJ et al., 2013; Abdel-Hady Gepreel M, Niinomi M, 2013; Yang et al., 2013). Alguns pesquisadores correlacionam o impacto biológico da liberação do íon Al com doenças neurodegenerativas, por exemplo, a doença de Alzheimer, além de genotoxicidade e possíveis necroses, enquanto que seus efeitos do íon V estão relacionados com toxicidade celular (Bigi et al., 2008; Cortizo et al., 2000; Biesiekierski et al., 2012; Niinomi et al., 2012; Abdel-Hady Gepreel M, Niinomi M, 2013).

Em contrapartida a esses efeitos deletérios causados por estes materiais, diversos estudos propõe o desenvolvimento de novas ligas de titânio (Ferrandini et al., 2007; Bigi et al., 2008; Geetha et al., 2009; Laheurte et al., 2010; Biesiekierski et al., 2012; Nag, Banerjee, 2012; Niinomi et al., 2012; Park YJ et al., 2013; Abdel-Hady Gepreel M, Niinomi M, 2013; Yang et al., 2013). As ligas de titânio são agrupadas de acordo com o tipo da fase cristalina estrutural as quais se encontram. Há ligas do tipos α (alfa) e $\alpha+\beta$ (alfa + beta), sendo que ligas $\alpha+\beta$ demonstram alto módulo de elasticidade (Ti-6Al-4V - 120 GPa) e ligas do tipo β têm revelado baixo módulo de elasticidade, e geralmente englobam as ligas em desenvolvimento. (Boyer et al., 1994; Niinomi et al., 2012)

Atualmente os pesquisadores direcionam estudos para o desenvolvimento das ligas do tipo β para aplicação biomédica, as quais

demonstraram uma redução no módulo de elasticidade e apresentaram propriedade mecânica adequada. Entretanto para composição dessas ligas do tipo β , é necessário selecionar elementos metálicos que são classificados como β -estabilizadores tais como zircônio, háfnio, nióbio, tântalo. Além dessa característica esses metais não devem apresentar citotoxicidade e quando associados ao titânio devem manter as propriedades de resistência mecânica, biocompatibilidade, resistência à fadiga e à corrosão, além de diminuir o módulo de elasticidade, tornando-o mais próximo do tecido ósseo (Abdel-Hady Gepreel M, Niinomi M, 2013).

Para este estudo foi proposta a utilização *in vivo* de implantes confeccionados com as ligas Ti-13Nb-13Zr, Ti-35Nb e Ti-35Nb-7Zr-5Ta. Tais ligas têm sido estudadas e têm demonstrado viabilidade para aplicação biomédica, pois obtiveram menor módulo de elasticidade, além de apresentarem adequadas propriedades mecânicas (Freese et al., 2001; Banerjee et al., 2006; Ferrandini et al., 2007; Niinomi, 2008; Geetha et al., 2009; Wang et al., 2009; Laheurte et al., 2010; Wang et al., 2010; Nag, Banerjee, 2012; Biesiekierski et al., 2012; Niinomi et al., 2012; Abdel-Hady Gepreel M, Niinomi M, 2013; Guo et al., 2013a, 2013b; Nie et al., 2014).

A liga Ti-Nb-Zr foi proposta inicialmente como substituição a liga Ti-6Al-4V, pois os elementos Nb e Zr são metais extremamente biocompatíveis, exibindo baixa citotoxicidade *in vitro*, excelente biocompatibilidade *in vivo*, não havendo relatos de mutagenicidade ou carcinogenicidade (Niinomi et al., 2008; Wang et al., 2009; Laheurte et al., 2010; Biesiekierski et al., 2012; Park YJ et al., 2013; Nie et al., 2014). A primeira liga do tipo beta desenvolvida, foi a liga Ti-13Nb-13Zr (Goodman et al., 1993; Davidson et al., 1994; Mishra et al., 1996). Pesquisadores verificaram que esta liga apresentava módulo de elasticidade baixo comparado a liga de Ti-6Al-4V, em torno de 80 GPa, além de exibir alta resistência mecânica e resistência à corrosão (Geetha et al., 2009;

Niinomi et al., 2012; Abdel-Hady Gepreel M, Niinomi M, 2013; Nie et al., 2014).

Neste estudo, avaliando a neoformação óssea desta liga pôde-se notar um íntimo contato entre o tecido ósseo e o implante e ao longo dos períodos avaliados houve um aumento na taxa de neoformação óssea, fato também observado por (Maya et al., 2012). Comparando as médias de neoformação óssea ao final de 8 semanas da liga Ti-13Nb-13Zr com as médias do Ticp e da liga Ti-6Al-4V, pode-se observar que o maior índice ocorreu na liga experimental do que nos materiais mais comumente utilizados. Bigi et al. (2008), avaliando a resposta do tecido ósseo em tíbias de coelhos nas ligas Ti-6Al-4V e Ti-13Nb-11Zr, observaram que no final de 12 semanas a maior formação óssea foi presente na liga Ti-13Nb-11Zr.

Outro sistema de liga de titânio do tipo β desenvolvido foi o titânio-nióbio, apresentando apenas o elemento nióbio adicionado ao Ti, o qual não apresenta citotocidade e exibe excelente biocompatibilidade *in vivo* (Qazi, Rack, 2005; Niinomi et al., 2008b; Laheurte et al., 2010; Biesiekierski et al., 2012). Em 2008, Santos et al., desenvolveram a liga Ti-35Nb, e as amostras propostas apresentavam propriedades mecânicas satisfatórias além da redução do módulo de elasticidade, na faixa de 80 GPa, exibindo um valor aproximadamente 30% menor do que as ligas atualmente utilizadas. Andrade (2011) avaliou a biocompatibilidade *in vitro* utilizando a liga porosa proposta por Santos et al., 2008 (Ti-35Nb), a qual mostrou maior média de matriz mineralizada quando comparada ao Ticp. Em 2013, Park YJ et al., estudaram a citotoxicidade de compostos binários em fibroblastos de ratos e observaram que na presença do composto binário Ti-20Nb as células apresentaram-se mais viáveis quando comparadas ao Ticp. Entretanto há uma carência nos estudos que relacionam esse composto binário com pesquisas *in vivo*. Em nosso estudo, a taxa de neoformação óssea nos períodos de 2 e 4 semanas para a liga Ti-35Nb, foi maior quando comparado aos materiais Ticp e Ti-

6Al-4V, apresentando diferença estatística com o Tícp nos dois períodos. Já no período de 8 semanas, não houve diferença estatística entre os grupos. Xu et al., 2013, desenvolveram a liga Ti-25Nb e realizaram teste de citotoxicidade utilizando células mesenquimais de coelhos, para comparar entre as ligas Ti-6Al-4V e Ti-6Al-7Nb. Eles observaram que a liga Ti-25Nb não apresentou toxicidade celular. Além desta liga apresentar compatibilidade biológica, demonstrou boa propriedade mecânica, módulo elástico próximo ao tecido ósseo e maior resistência à corrosão quando comparado ao titânio puro.

Mesmo as ligas anteriores apresentando características satisfatórias para passível aplicação biomédica, alguns pesquisadores desenvolveram outro sistema de liga do tipo β , como a liga Ti-Nb-Zr-Ta. Neste sistema foi acrescentado o elemento tântalo, pois ele tem demonstrado excelente resistência a corrosão, baixa citotoxicidade e boa osteocompatibilidade (Biesiekierski et al., 2012). Diversos pesquisadores analisaram a liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta e notaram que a presença do Ta reduz ainda mais o módulo de elasticidade atingindo cerca de 55 GPa, sem que o material perdesse suas propriedades (Taddei et al., 2004; Qazi et al., 2005; Niinomi, 2008a; Geetha et al., 2009; Laheurte et al., 2010; Nag, Banerjee, 2012; Niinomi et al., 2012; Banerjee et al., 2013). Na avaliação da neoformação óssea desta liga quando comparadas aos grupos Tícp e Ti-6Al-4V para o período de 2 semanas, notou-se maior formação de tecido ósseo, havendo diferença estatística com o grupo Tícp. Ao longo do tempo pode-se observar aumento na formação óssea, para os demais períodos, não sendo observada diferença estatística entre os grupos. Guo et al. (2013a), compararam a formação óssea da liga Ti-35Nb-2Ta-3Zr com a liga Ti-6Al-4V e verificaram diferença estatística entre os grupos, fato que ocorre em nosso estudo.

Uma vez que o tipo de liga de titânio e as alterações na superfície dos implantes podem influenciar diretamente na resposta de cicatrização óssea, muitas pesquisas têm avaliado histologicamente o

comportamento celular e tecidual (Nishiguchi et al., 2001; Deporter et al., 2002; Barrère et al., 2003; Fujibayashi et al., 2004; Habibovic et al., 2004; Vasudev et al., 2004; Costa et al., 2005; Li et al., 2007; Bigi et al., 2008; Vasconcellos et al., 2008 a, 2008b). Neste estudo, a resposta osteogênica foi realizada em períodos curto de cicatrização, 2 semanas, e períodos longos, 4 e 8 semanas. Na análise histológica do período mais curto, notou-se maior proliferação celular em direção à região peri-implantar e neoformação óssea mais exuberante, sob a forma de trabéculas recém formadas, de origem endosteal nos implantes confeccionados com as ligas experimentais, nos quais também foi possível observar proliferação para o interior dos poros. Nos períodos de 4 e 8 semanas ocorreu proliferação de tecido ósseo ao redor e para o interior dos poros dos implantes, independente do grupo. Estes eventos também foram observados em outros estudos, nos quais a formação óssea nas ligas propostas foi maior quando comparadas ao Ticp e Ti-6Al-4V (Bigi et al., 2008; Saulacic et al., 2012; Guo et al., 2013a; Hoerth et al., 2014). Nestes tempos de eutanásia mais longos, não foi observada diferença qualitativa em relação à neoformação óssea quando comparados às ligas. Devido à técnica de processamento histológico, foi possível notar a medula óssea altamente celularizada, sugerindo aspecto de normalidade ao processo de cicatrização, além de células ósseas como osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, indicando uma remodelação constante.

No presente estudo, os resultados de neoformação óssea independente do tipo de implante, exibiram valores satisfatórios, já que a taxa variou de 45,50% a 56,40%, concordando com diversos estudos que demonstraram neoformação variando de 25 a 100% da área total disponível para contato (Deporter DA et al., 1996; Nishigushi et al., 2001; Deporter D et al., 2002; Barrère et al., 2003; Vasudev et al., 2004; Costa et al., 2005; Vasconcellos et al., 2008, 2010; Zhang et al., 2009; Wazen et al., 2010; Farrell et al., 2013; Shim et al., 2013). Em nosso estudo, a análise histomorfométrica para o período de 2 semanas, demonstrou taxa

de neoformação óssea maior nas ligas de titânio do que no Ticp, sendo observada diferença estatística. Comparando a neoformação óssea entre as ligas, a liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta, obteve maior formação óssea inicial. Já para o período de 4 semanas houve apenas diferença estatística entre a liga Ti-35Nb e o Ticp, sendo que a liga exibiu maior média na neoformação óssea. No período de 8 semanas, os resultados da neoformação óssea não demonstraram diferença estatística entre os grupos, sugerindo que houve preenchimento similar dos poros pelo tecido ósseo, bem como do processo de remodelação em torno do implante.

Baseados nos resultados encontrados na taxa de neoformação óssea, as ligas experimentais demonstraram valores adequados e por vezes superiores aos implantes Ticp e Ti-6Al-4V. Esses resultados associados aos baixos valores de módulo de elasticidade existentes na literatura constituem recursos consideráveis para o possível desenvolvimento de um novo modelo de implante para aplicação biomédica, o qual apresentará o design de superfície porosa integrada a núcleo denso fabricado com as novas ligas.

8 CONCLUSÃO

Diante destes resultados pôde-se concluir que as amostras confeccionadas com as ligas experimentais, exercem melhor influência sobre o comportamento celular *in vivo* nos períodos iniciais da osseointegração. Desta forma, esta amostra que associa um novo design de superfície porosa integrada ao núcleo denso, produzida com as ligas experimentais, é um biomaterial inovador que deve ser considerado para aplicação biomédica uma vez que acelera o processo de osseointegração e devido ao baixo módulo de elasticidade deve aumentar a longevidade do implante.

9 REFERÊNCIAS*

Abdel-Hady Gepreel M, Niinomi M. Biocompatibility of Ti-alloys for long-term implantation. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2013 Apr;20:407-15.

Anderson JM, Schoen FJ. Biomaterials Science: an introduction to materials in medicine. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. *In Vivo Assessment of tissue*. 2º ed. San Diego: Elsevier; 2004. p.360-1.

Andrade DP. Biocompatibilidade *in vitro* em amostras densas e porosas de titânio-35nióbio submetidas ao tratamento biomimético. [tese]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2011

Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*. 2000 Apr;21(7):667-81.

Banerjee R, Nag S, Samuel S, Fraser HL. Laser-deposited Ti-Nb-Zr-Ta orthopedic alloys. *J Biomed Mater Res A*. 2006 Aug;78(2):298-305.

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

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

Basalah A, Shanjani Y, Esmaeili S, Toyserkani E. Characterizations of additive manufactured porous titanium implants. *Biomed Mater Research B: Applied Biomater*. 2012 Oct; 100(7):1970-9.

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

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

*Baseado:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Sample References [internet]. Bethesda:US NLM; c2003 [disponibilidade 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em http://www.nlm.nih.gov/uniform_requirements.html

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

Bigi A, Fini M, Bracci B, Boanini E, Torricelli P, Giavaresi G, et al. The response of bone to nanocrystalline hydroxyapatite-coated Ti13Nb11Zr alloy in an animal model. *Biomaterials*. 2008 Apr;29(11):1730-6.

Blinova MI, Yudinzeva NM, Nikolaenko NS, Potokin IL, Raykhtsaum G, Pitkin MR, et al. Cell cultivation on porous titanium implants with various structures. *Cell Tissue Biol*. 2010; 4(6): 572–9.

Bobyn D, Engh CA, Pilliar RM. Histological comparison of biological fixation and bone modeling with canine and human porous coated hip prostheses. In: American Society For Testing Materials. ASTM953. Quantitative characterization and performance of porous implants for hard tissue applications. Philadelphia: ASTM; 1987: p.185-206.

Bottino MC, Coelho PG, Henriques VA, Higa OZ, Bressiani AH, Bressiani JC. Processing, characterization, and in vitro/in vivo evaluations of powder metallurgy processed Ti-13Nb-13Zr alloys. *J Biomed Mater Res*. 2009; Mar 1;88(3):689-96.

Bottino MC, Coelho PG, Yoshimoto M, König Jr B, Henriques VA, Bressiani AH, et al. Histomorphologic evaluation of Ti-13Nb-13Zr alloys processed via powder metallurgy. A study in rabbits. *Mat Sci Engin C*. 2008;28:223-7.

Boyer RR. Aerospace applications of beta titanium alloys. *JOM*. 1994 46(7):20-3.

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

Bracroft JD, Cook HC. Manual of histological techniques and their diagnostic application. Cidade: Longman Singapore Publishers Ltd; 1994.

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

Bram M, Stiller C, Buckremer HP, Stover D, Baur H. High-porosity titanium, stainless steel, and superalloy parts. *Adv Eng Mater*. 2000 Jan;2(4):196-9.

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

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

Callister WD. Propriedades mecânicas dos metais. In: *Ciência e Engenharia de Materiais: uma introdução*. 7 ed. Cidade: Rio de Janeiro Copyright © John Wiley & Sons; 2007. p. 131.

Chen YJ, Feng B, Zhu YP, Wenig J, Wang JX, Lu X. Fabrication of porous titanium implants with biomechanical compatibility. *Materials Letters*, 63 (2009), pp. 2659–61.

Colombo JS, Satoshi S, Okazaki J, Crean SJ, Sloan AJ, Waddington RJ. In vivo monitoring of the bone healing process around different titanium alloy implant surfaces placed into fresh extraction sockets. *J Dent*. 2012 Apr;40(4):338-46.

Consolaro A, Carvalho RA, Junior CEF, Consolaro MFMO, Francischone CE. Saucerização de implantes osseointegrados e o planejamento de casos clínicos ortodônticos simultâneos. *Dental Press J Orthod*. 2010 May-June;15(3):19-30.

Cortizo AM, Bruzzzone L, Molinuevo S, Etcheverry SB. A possible role of oxidative stress in the vanadium-induced cytotoxicity in the MC3T3E1 osteoblast and UMR106 osteosarcoma cell lines. *Toxicology*. 2000 Jun 8;147(2):89-99.

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

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

Davidson JA, Mishra AK, Kovacs P, Poggie RA. New surface hardened, low-modulus, corrosion-resistant Ti-13Nb-13Zr alloy for total hip arthroplasty. *Biomed Mater Eng*. 1994;4(3):231-43.

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

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

Deporter DA, Todescan R, Nardini K. Use of a tapered, porous-surfaced dental implant in combination with osteotomes to restore edentulism in the difficult maxilla. *Implant Dent*. 1999;8(3):233-40.

Deporter D, Pilliar RM, Todescan R, Watson P, Pharoah M. Managing the posterior mandible of partially edentulous patients with short, porous-surfaced dental implants: early data from a clinical trial. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2001 Sep-Oct;16(5):653-8.

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

Dewidar MM, Yoon HC, Lim JK. Mechanical properties of metals for biomedical applications using powder metallurgy process. *Metals Mater Int*. 2007 Apr;12:193-206.

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

Escada AL, Machado JP, Schneider SG, Rezende MC, Claro AP. Biomimetic calcium phosphate coating on Ti-7.5Mo alloy for dental application. *J Mater Sci Mater Med*. 2011 Nov;22(11):2457-65.

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

Farrell BJ, Prilutsky BI, Ritter JM, Kelley S, Popat K, Pitkin M. Effects of pore size, implantation time, and nano-surface properties on rat skin ingrowth into percutaneous porous titanium implants. *J Biomed Mater Res A*. 2013 May 23. doi: 10.1002/jbm.a.34807.

Ferguson R. Use of a porous-surfaced implant system. *Dental Implantol Update*. 1999 Jan;10(1):1-5.

Ferrandini LP, Cardoso FF, Souza SA, Afonso CR, Caram R. Aging response of the Ti-35Nb-7Zr-5Ta and Ti-35Nb-7Ta alloys. *Alloys Compounds*. 2007;433(1-2):207-10.

Fojt J, Joska L. Influence of porosity on corrosion behaviour of Ti-39Nb alloy for dental applications. *Biomed Mater Eng*. 2013;23(3):183-95.

Freese HL, Volas MG, Wood JR, Textor M. Titanium and its Alloys in Biomedical Engineering. *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*; 2001.

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

Froes FH, Eylon D. Production of titanium powder. In *ASM Handbook*, ASM International. USA; 2000.

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

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

Gagg G, Ghassemieh E, Wiria FE. Effects of sintering temperature on morphology and mechanical characteristics of 3D printed porous titanium used as dental implant. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013 Oct;33(7):3858-64.

Gan L, Wang J, Tache A, Valiquette N, Deporter D, Pilliar R. Calcium phosphate sol-gel-derived thin films on porous-surfaced implants for enhanced osteoconductivity Part II: short-term in vivo studies. *Biomaterials*. 2004;25(22):5313-21.

Geetha M, Singh AK, Asokamani R, Gogia AK. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – A review. *Progress in Materials Science*. 2009;54:397-425.

Goodman SB, Davidson JA, Fornasier LV, Mishra AK. Histological response to cylinders of low modulus titanium alloy (Ti-13Nb-13Zr) and a wear-resistant zirconium alloy (Zr-2.5Nb) implanted in the rabbit tibia. *J Appl Biomater*. 1993;(4):331-9.

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

Grandfield K, Palmquist A, Engqvist H. Three-dimensional structure of laser-modified Ti6Al4V and bone interface revealed with STEM tomography. *Ultramicroscopy*. 2013 Apr;127:48-52.

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

Guo Y, Chen D, Lu W, Jia Y, Wang L, Zhang X. Corrosion resistance and in vitro response of a novel Ti35Nb2Ta3Zr alloy with a low Young's modulus. *Biomed Mater*. 2013b Oct;8(5):055004. doi: 10.1088/1748-6041/8/5/055004

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

Hallab NJ, Jacobs JJ, Katz L. Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. *Application of Materials in Medicine, Biology, and Artificial Organs*. 2^o ed. San Diego: Elsevier; 2004. p.537-9.

Halldin A, Jimbo R, Johansson CB, Wennerberg A, Jacobsson M, Albrektsson T, et al. The effect of static bone strain on implant stability and bone remodeling. *Bone*. 2011 Oct;49(4):783-9.

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

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

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

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

Kim HM, Kokubo T, Fujibayashi S, Nishiguchi S, Nakamura T. Bioactive macroporous titanium surface layer on titanium substrate. *J Biomed Mater Res*. 2000 Dec 5;52(3):553-7.

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

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

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

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

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

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

Long M, Rack HJ. Titanium alloys in total joint replacement- a materials science perspective. *Biomaterials*. 1998 Sep19(18):1621-39.

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

Maya AE, Grana DR, Hazarabedian A, Kokubu GA, Luppó MI, Vigna G. Zr-Ti-Nb porous alloys for biomedical application. *Mater Sci Eng C*. 2012; 32:321-9.

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

Misch CE. *Implantes Dentários Contemporâneos*. 2ª ed. São Paulo: Santos; 2000.

Mishra AK, Davidson JA, Poggie RA, Kovacs P, Fitzgerald TJ. Mechanical and tribological properties and biocompatibility of diffusion hardened Ti-13Nb-13Zr- A new titanium alloy for surgical implants. In: S.A. Brown JE. Lemons. *Medical applications of titanium and its alloys : the material and biological issues*. STP 1272. West Conshohocken: ASTM; 1996 p. 96-116

Nag S, Banerjee R. Laser deposition and deformation behavior of Ti-Nb-Zr-Ta alloys for orthopedic implants. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2012 Dec;16:21-8.

Nie L, Zhan Y, Hu T, Chen X, Wang C. β -Type Zr-Nb-Ti biomedical materials with high plasticity and low modulus for hard tissue replacements. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2014 Jan;29:1-6.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Qazi JI, Rack HJ. Metastable Beta Titanium Alloy for Othopedic Applications. *Adv Engi Mater*. 2005;7(11) 993-8.

Ratner BD. *Biomaterials Science: an introduction to materials in medicine*. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. *A History of Biomaterials*. 2^o ed. San Diego: Elsevier; 2004a p.10.

Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. *Biomaterials Science: a multidisciplinary endeavor*. 2^o ed. San Diego: Elsevier; 2004b. p.1-9.

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

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

Santos DR. Obtenção da liga Ti-35Nb por metalurgia do pó para utilização em próteses ortopédicas [tese]. Guaratinguetá (SP): Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2006.

Santos DR, Pereira MS, Cairo CAA, Graça MLA, Henriques VAR. Isochrnal sintering of blended Elemental Ti-35alloy. *Mater Sci Engi A.* 2008 Apr;472:193-7.

Shim IK, Chung HJ, Jung MR, Nam SY, Lee SY, Lee H, et al. Biofunctional porous anodized titanium implants for enhanced bone regeneration. *J Biomed Mater Res A.* 2013 Nov 6. doi: 10.1002/jbm.a.35026.

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

Sumner DR, Galante JO. Determinants of stress shielding: design versus materials versus interface. *Clin Orthop Relat Res.* 1992 Jan;274:202-12.

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

Stephen SJ, Froes FH. Titanium metallurgy and applications. *Ligth Metal Age.* 1988;46(11):5-12.

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

Sverzut AT, Crippa GE, Morra M, de Oliveira PT, Beloti MM, Rosa AL. Effects of type I collagen coating on titanium osseointegration: histomorphometric, cellular and molecular analyses. *Biomed Mater.* 2012 Jun;7(3):035007. doi: 10.1088/1748-6041/7/3/035007

Taddei EB, Henriques VAR, Cairo CAA, Bottino MC. Ensaio de citotoxicidade e influência do tratamento de solubilização na microestrutura da liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta para uso em próteses ortopédicas. *Matéria (UFRJ)*. 2007;12:120-7.

Taddei EB, Henriques VAR, Silva CRM, Cairo CAA. Production of new titanium alloy for orthopedic implants. *Mater Sci Engi C*. 2004 Sep; (24):683-7.

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

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

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

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

Vasconcellos LMR, Nascimento FO, Leite DO, Vasconcellos LGO, Prado RF, Ramos CJ, et al. Novel production method of porous surface Ti samples for biomedical application. *J Mater Sci: Mater Med*. 2012;23:357–64.

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

von Wilmsky C, Moest T, Nkenke E, Stelzle F, Schlegel KA. Implants in bone: Part I. A current overview about tissue response, surface modifications and future perspectives. *Oral Maxillofac Surg*. 2013 Feb .

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

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

Wang X, Li Y, Hodgson PD, Wen C. Biomimetic modification of porous TiNbZr alloy scaffold for bone tissue engineering. *Tissue Eng Part A*. 2010 Jan;16(1):309-16.

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

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

Wen CE, Yamada Y, Shimojima K, Hosokawa H, Mabuchi M. Novel titanium foam for bone tissue engineering. *J Mater Res*. 2002;17: 2633-9.

Wu SH, Li Y, Zhang YQ, Li XK, Yuan CF, Hao YL, et al. Porous titanium-6 aluminum-4 vanadium cage has better osseointegration and less micromotion than a poly-ether-ether-ketone cage in sheep vertebral fusion. *Artif Organs*. 2013 Dec;37(12):E191-201.

Yang X, Wang D, Liang Y, Yin H, Zhang S, Jiang T, et al. A new implant with solid core and porous surface: The biocompatibility with bone. *J Biomed Mater Res A*. 2013 Aug 14.

Yu X, Ning C, Li J, Huang S, Guo Y, Deng F. In vivo evaluation of novel amine-terminated nanopore Ti surfaces. *J Biomed Mater Res A*. 2012 Dec;100(12):3428-35.

Xu J, Weng XJ, Wang X, Huang JZ, Zhang C, Muhammad H, et al. Potential use of porous titanium-niobium alloy in orthopedic implants: preparation and experimental study of its biocompatibility in vitro. *PLoS One*. 2013 Nov 19;8(11):e79289.

Zhang E, Zou C. Porous titanium and silicon-substituted hydroxyapatite biomodification prepared by a biomimetic process: Characterization and in vivo evaluation. *Acta Biomaterialia*. 2009;5:1732-41.

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

ANEXO - Certificado de Comitê de Ética em Pesquisa

  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
A - Eng. Francisco José Lourenço, TTE - Al. São Carlos
CEP 13200-970 - F. (12) 5945-9628 - 9611
Fax: (12) 5945-9610 - E: registo@fopg.unesp.br / coorden@fopg.unesp.br



CERTIFICADO Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **018/2010-PA/CEP**, sobre "Caracterização e estudo comparativo da biocompatibilidade de amostras de titânio, com superfície poroso, confeccionadas com diferentes ligas", sob responsabilidade de **LUANA MAROTTA REIS DE VASCONCELLOS**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal – **CONCEA** e Lei Arouca nº 11.794 de 08/10/2008) e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 20 de outubro de 2010

Profa. Titular YASMIN RODARTE CARVALHO
Coordenadora