

EFEITO DO ZINCO NA BIOCOMPATIBILIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO* DE
GRÂNULOS DE ZINCO-APATITA 5% EM COMPARAÇÃO COM A
HIDROXIAPATITA

Ingrid Russoni de Lima

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA COORDENAÇÃO DOS
PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS EM
ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MATERIAIS.

Aprovada por:

Prof. Glória de Almeida Soares, D.Sc.

Prof. José Mauro Granjeiro, D.Sc.

Prof. Ericksson Rocha e Almendra, D.Sc.

Dr. Alexandre Malta Rossi, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL
FEVEREIRO DE 2006

LIMA, INGRID RUSSONI

Efeito do zinco na biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* de grânulos zinco-apatita 5% em comparação com a hidroxiapatita [Rio de Janeiro] 2006

XVI, 93 p. 29,7 cm (COPPE/UFRJ, M.Sc., Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2006)

Dissertação - Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE

1. Zinco-apatita
2. Biocompatibilidade
3. Testes *in vitro*
4. Testes *in vivo*

I. COPPE/UFRJ II. Título (série)

Aos responsáveis pela minha vida: minha querida avó Severina, a avó Sebastiana e o avô Pedro. Aos meus amados pais Cida e Jerônimo.

AGRADECIMENTOS

À professora Glória por ter “aberto as portas” para o meu verdadeiro sonho: Entrar no Universo da Pesquisa. Agradeço pela liberdade de pensamento e pelo seu incentivo a novas idéias, nos fornecendo a segurança de que para todos os momentos podemos contar com o seu apoio. Obrigada também por me ajudar a organizar melhor as minhas idéias e a minha escrita, e a buscar sempre o melhor. Tenho certeza que durante esse período obtive um crescimento pessoal muito grande!!!!

Ao querido professor Granjeiro, primeiramente pela amizade e apoio. Por estar sempre me instigando a buscar novos horizontes, sempre pensando no novo e no desconhecido. Obrigada pelos inúmeros conselhos, não apenas referentes à dissertação, mas também para a vida. E obrigada também pela alegria de trabalharmos juntos e conseguirmos unir pessoas em prol de um bem comum. Tenho certeza de que conhecê-lo foi uma grande sorte e felicidade!!! Sempre me espelho no seu caráter, bondade, humildade e “transpiração de conhecimento”.

À minha família acima de tudo. Obrigada ao meu amado e querido pai por todo o apoio nesta nova busca de conhecimentos e incentivo, principalmente no momento de matar os bichinhos!!! Obrigada por toda minha vida e pelo amor incondicional!! À minha querida mãe pelas suas sempre doces palavras de incentivo e transmissão de calma nos momentos de angústia. Obrigada por entender até o meu silêncio!! À minha irmã pelo amor e pelas infinitas gargalhadas!! Tios, tias, primos e primas: Amo vocês!!!!

Ao Joel, pelo infinito amor e apoio em todos os momentos. Por estar sempre me incentivando nos estudos e por estar ao meu lado. Pelos “grandes diálogos”, e por me passar seu espírito científico. E principalmente por seu olhar sincero e confortante. Todo o momento de “stress” ficava apagado sempre que nos encontrávamos ao final de cada dia, podendo eu ter a certeza de que sempre valia a pena. Obrigada também à sua maravilhosa família pelo grande apoio principalmente no início. Te amo pithuco!!!

Aos queridos amigos que tive a alegria de conhecer aqui e que tenho certeza de que sempre estarão comigo: a começar pela Camila, Michele Vionet, Lídia e Andréa,

que foram as primeiras a me mostrar esta nova área. Ao querido amigo Euler por todos os debates e altos diálogos. E às amigas Melissa, por me ensinar a confeccionar os grânulos, e Fabíola, por me ajudar no teste de degradação.

À querida amiga Márcia pela ajuda em todos os momentos, além dos conselhos, palavras de apoio, discussões e da grande ajuda na tese. Obrigada pelas risadas, instigações e até mesmo divergências. Enfim por todo crescimento que me proporcionou e pelos momentos de choro e alegria.

À Esther, pela preciosa ajuda na análise de citotoxicidade e grande apoio principalmente nesta etapa final. Pelos conselhos, dicas de organização e minuciosidade. Tenho certeza de que uma nova amizade está sendo formada. Gostaria de agradecer aos Professores Radovan e Alex Balduino (UFRJ) por terem cedido o local e estrutura que tornou possível a realização do teste de citotoxicidade *in vitro*.

Ao professor Renato Cruz (UFF) pelo enorme conhecimento, humildade e pela amizade formada. Muito obrigada pela paciência com a qual me ensinou a fotografar e digitalizar as imagens. E à Rosana por toda a ajuda nas fotografias! Obrigada Carol, pela ajuda!!

A todos que me ajudaram no teste *in vivo*: Thaís Accorsi e seu namorado por terem me ensinado a cirurgia e pelo grande incentivo desde o início. Ao amigo Márcio Conz pela amizade, apoio e ajuda. Ao Fábio, pela amizade e ajuda. À minha querida amiga Eliane, pelas gargalhadas, descontrações e preciosa ajuda. Aos alunos de IC(UFF), em especial ao Filipe por não ter faltado nenhum dia, principalmente para matar os animais!!

Aos amigos do CBPF, por sempre me receberem com carinho!! Em especial à Beth pela valiosa ajuda na fase de caracterização do material.

À prof. Eliane Pedra (UFF) por me ceder todo o suporte de preparo das lâminas. Ao querido amigo Antônio Carlos pelas risadas e fundamental ajuda no preparo das lâminas. A todos da Histologia da UFF pelo caloroso convívio!! Obrigada, Celci, pelo grande incentivo!!

Aos amigos Emanuel (por toda a ajuda técnica), Aline e Dóris (dicas biológicas), Sinara, Helena, Alessandro, Renata, e todos que formam essa maravilhosa equipe de biomateriais.

À amiga Milena, Rogério e em especial à Cris, a quem admiro por sua determinação, inteligência e sinceridade. Tenho certeza que te ter conhecido foi um presente de Deus!!!! E sei que seremos amigas para sempre, irmãzinha!!!

E a todos que me ajudaram diretamente e indiretamente no meu trabalho!! Sei que sem vocês nada disso seria possível !!

Ao CETEM pelas análises de cálcio e zinco. Ao NUCAT pelas análises de DRX. Ao Instituto de Química pelas análises de FTIR.

A todos os amigos da COPPE e à CAPES pelo apoio financeiro.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

EFEITO DO ZINCO NA BIOCOMPATIBILIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO* DE
GRÂNULOS ZINCO-APATITA 5% EM COMPARAÇÃO COM A
HIDROXIAPATITA

Ingrid Russoni de Lima

Fevereiro/2006

Orientadores: Glória de Almeida Soares
José Mauro Granjeiro

Programa: Engenharia Metalúrgica e de Materiais

Este trabalho dá continuidade aos estudos de COSTA, 2004 que trabalhou com pós de ZnHA com diferentes concentrações de Zn. Desenvolveu-se de início um método de produção de grânulos de ZnHA a fim de testar sua biocompatibilidade. Para isso, houve a necessidade primeiramente de caracterizá-los físico-quimicamente, comparando sempre com a hidroxiapatita (HA) que funcionou como padrão. Além disso, testes de degradação, dissolução e desmineralização foram realizados a fim de estudar o comportamento *in vitro* desses materiais. Finalmente os grânulos foram enxertados em camundongos Balb/c com o objetivo de avaliar sua biocompatibilidade, utilizando análise histológica e histomorfométrica. Como resultado, foi possível identificar a biocompatibilidade dos grânulos de ZnHA *in vivo*, embora tenha sido citotóxico no teste *in vitro* em concentrações superiores a 25 mg/mL.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

EFFECT OF ZINC ON THE *IN VIVO* AND *IN VITRO* BIOCOMPATIBILITY
OF ZINC-APATITE 5% GRANULES IN COMPARISON WITH
HYDROXYAPATITE

Ingrid Russoni de Lima

February/2006

Advisors: Glória de Almeida Soares
José Mauro Granjeiro

Department: Metallurgical and Materials Engineering

This work follows the studies of COSTA, 2004, which used powders of zinc-apatite containing different concentrations of zinc. A method for the production of ZnHA granules to evaluate its biocompatibility is presented. A physic-chemical characterization of ZnHA containing 5% of zinc was made, comparing it with hydroxyapatite (HA). Besides that, tests of degradation, dissolution and demineralization were conducted to study the *in vitro* behavior of these granules. Finally, these granules were grafted in Balb/c mice to evaluate the biocompatibility by means of histologic and histomorphometric analysis. In conclusion, the biocompatibility of ZnHA granules was confirmed *in vivo*. However, granules with concentrations higher than 25 mg/mL were found to be cytotoxic.

SUMÁRIO

<u>LISTA DE FIGURAS</u>	<u>XI</u>
<u>LISTA DE TABELAS</u>	<u>XVI</u>
<u>1 INTRODUÇÃO</u>	<u>1</u>
<u>2 REVISÃO DA LITERATURA</u>	<u>4</u>
2.1 TECIDO CONJUNTIVO	4
2.1.1 TECIDO CONJUNTIVO PROPRIAMENTE DITO	6
2.1.2 TECIDO ÓSSEO	6
2.2 ENXERTOS ÓSSEOS	8
2.3 BIOMATERIAIS PARA ENXERTOS ÓSSEOS	9
2.3.1 CERÂMICAS A BASE DE FOSFATO DE CÁLCIO	10
2.3.2 GRÂNULOS E MATERIAIS POROSOS	15
2.4 MINERAIS ESSENCIAIS	16
2.4.1 O ZINCO	16
2.4.2 ASSOCIAÇÃO DO ZINCO COM A HIDROXIAPATITA	18
2.4.3 ZNTCP	19
2.5 INTERAÇÃO DAS CÉLULAS COM OS BIOMATERIAIS	20
2.6 AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE	21
2.6.1 AVALIAÇÃO IN VITRO	23
2.6.2 AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> DA BIOCOMPATIBILIDADE	26
<u>3 PROPOSIÇÃO</u>	<u>28</u>
<u>4 MATERIAL E MÉTODOS</u>	<u>29</u>
4.1 MATERIAIS	29
4.1.1 PRODUÇÃO DE PÓS DE HIDROXIAPATITA E ZINCO-APATITA	29
4.1.2 PRODUÇÃO DE GRÂNULOS DE HA E GRÂNULOS DE ZNHA 5%	29
4.2 MÉTODOS	32

4.2.1	TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO	32
4.2.2	TESTE DE CITOTOXICIDADE CELULAR <i>IN VITRO</i>	36
5	<u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	45
5.1	CARACTERIZAÇÃO POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X	45
5.2	CARACTERIZAÇÃO POR INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	48
5.3	ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	51
5.4	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	52
5.5	TESTE DE DEGRADAÇÃO	52
5.5.1	PERDA DE MASSA	52
5.5.2	ANÁLISE QUÍMICA DA SOLUÇÃO APÓS O TESTE DE DEGRADAÇÃO	54
5.6	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE CELULAR <i>IN VITRO</i>	55
5.7	AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i>	58
5.7.1	ANÁLISE RADIOGRÁFICA	58
5.7.2	ANÁLISE MICROSCÓPICA DESCRITIVA	59
5.7.3	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	73
6	<u>CONSIDERAÇÕES FINAIS</u>	83
7	<u>CONCLUSÃO</u>	84
8	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	85

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1 Mercado de Produtos Ortopédicos (Adaptado de Biomet, 2004). Pode-se observar que os aparelhos e dispositivos ortopédicos representam 40% do mercado. 2
- Figura 2.1 – Tecido ósseo secundário (University of Split Medical School, <http://www.vms.hr>, acesso em 08/02/2004) 8
- Figura 4.1 Rampas de temperatura para calcinação da mistura de pós de HA, com ou sem zinco, e ácido esteárico. As temperaturas (°C) de calcinação utilizadas estão indicadas na legenda..... 31
- Figura 4.2 - Cultivo de fibroblastos Balb/c 3T3 em DEMEN e 10% de SFB. As subculturas foram obtidas por tripsinização quando as células se mostraram subconfluentes, sendo cultivadas nas mesmas condições descritas em Métodos... 37
- Figura 4.3 Obtenção do extrato dos grânulos de HA e ZnHA em DEMEM. A) Suspensão dos grânulos em DEMEM após 24 horas de incubação a 37 °C; B) Adição do extrato em diferentes concentrações à placa de 24 poços à cultura de Balb/c 3T3. 38
- Figura 4.4 – Padrão de distribuição do extrato nas placas de 24 poços. Os experimentos foram realizados duas vezes em triplicata. O controle negativo do experimento consistiu na utilização de DMEM sem contato com os grânulos.de Multiwell..... 39
- Figura 4.5 Esquema representativo da distribuição dos camundongos (n=50) nos grupos e períodos experimentais. Os períodos de coleta do tecido de granulação são indicados..... 40
- Figura 4.6 Procedimentos Cirúrgicos: A) seringa de insulina com a ponta cortada para inserção do material; B) tricotomia e assepsia do dorso do animal; C) incisão crânio-caudal de 1 cm; D) implantação do material na loja cirúrgica obtida por divulsão do tecido subcutâneo; E) aspecto do material após a implantação; F) sutura; G) coleta do granuloma após os respectivos períodos experimentais; H) fixação da peça em formalina 10% tamponada. 43

Figura 5.1 Difratomogramas dos grânulos de HA sob diferentes condições.....	46
Figura 5.2 Difratomogramas de diferentes condições dos grânulos de ZnHA	47
Figura 5.3 Espectro de FTIR para a HA	49
Figura 5.4 Espectro de FTIR para a ZnHA	50
Figura 5.5 Micrografias eletrônicas de varredura: a) HA calcinada a 400°C; b) HA calcinada a 1200°C; c) ZnHA calcinada a 400°C; d) ZnHA calcinada a 1200°C...	51
Figura 5.6 Micrografias eletrônica de transmissão e padrões de difração (interno) das amostras de: A) HA; B) ZnHA 5%. Na figura B, a seta indica o padrão de difração do β -TCP na amostra de ZnHA (seta).....	52
Figura 5.7 Perda de Massa dos grânulo de HA e ZnHA (ISO 10993-9). As médias e desvios padrão das triplicatas foram submetidas à análise estatística (teste t , $p<0,05$), não sendo observado diferença significativa.	53
Figura 5.8 Avaliação da citotoxicidade da HA e ZnHA utilizando células Balb/c 3T3 de acordo com a norma ISO 10993-5. O número de células na ausência do extrato foi considerado como 100%. Os pontos experimentais correspondem à média de dois experimentos independentes em triplicata. As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95% da média. Barras que não se superpõem indicam diferença estatisticamente significativa.....	58
Figura 5.9 Fotomicrografias do período de 7 dias (HE). (A) HA, onde se observa a presença de fibroblastos (seta verde), macrófagos (seta vermelha) e célula gigante (seta azul); (B) ZnHA, com a presença de vasos sanguíneos (seta amarela), fibroblastos (seta marrom) e agranulócitos (seta preta). Aumento 40x (A e B).....	62
Figura 5.10 Fotomicrografias do período de 7 dias (Tricrômio de Gomori). (A) HA, detalhe de um grande vaso sanguíneo no tecido conjuntivo frouxo (seta amarela); (B) ZnHA, com vasos sanguíneos (seta amarela) sendo envolvidos por tecido conjuntivo frouxo (setas laranjas) com fibras pouco mais organizada, além de fibroblastos (setas verdes). Aumento de 40x (A e B).	63

- Figura 5.11 Fotomicrografias do período de 14 dias (HE). (A) HA, com a presença de fibroblastos (setas marrons), vaso sangüíneo (seta amarela), célula gigante (seta azul) em torno da região onde se localiza os grânulos, e macrófago (seta vermelha); (B) ZnHA, com a presença de células gigantes (seta azul) entre os grânulos (cruz preta) e vasos sangüíneos (seta amarela) sendo envolvidos por tecido conjuntivo frouxo (seta laranja). Aumento de 40x (A e B). 64
- Figura 5.12 Fotomicrografias do período de 14 dias (Tricrômio de Gomori). (A) HA, mostrando vasos sanguíneos (seta amarela), fibroblastos (seta marrom) em tecido conjuntivo mais organizado (reta preta) e células gigantes (seta azul); (B) ZnHA, com vasos sangüíneos (setas amarelas), uma artéria (seta lilás), além de proliferação dos fibroblastos (setas marrons). Aumento de 40x (A e B). 65
- Figura 5.13 Fotomicrografias do período de 21 dias (HE). (A) HA, com a presença de célula gigante (seta azul) e fibroblastos (setas marrons) na região ao redor dos grânulos (cruz preta); (B) ZnHA, mostrando vaso sangüíneo (seta amarela), fibroblastos dispostos de maneira mais organizada (setas marrons), além de um vaso com sua parede e túnica (traço preto). Aumento de 40x (A e B). 66
- Figura 5.14 Fotomicrografias do período de 21 dias (Tricrômio de Gomori). HA (A) mostra a presença de um tecido conjuntivo mais organizado entre os grânulos (reta preta), presença de vaso sangüíneo de maior calibre (seta amarela) e macrófagos (seta vermelha); (B) ZnHA, presença de vaso e fibroblasto. Aumento de 40x (A e B). 67
- Figura 5.15 Fotomicrografias do período de 28 dias (HE). (A) HA, presença de vasos sangüíneos (seta amarela), organização as fibras do tecido conjuntivo (reta preta), tecido conjuntivo mais organizado (reta vermelha), região onde se encontravam os grânulos (cruz preta) com aglomerados de células em torno desses grânulos compôs principalmente de agranulócitos, célula gigante (setas azuis).; (B) ZnHA, com tecido conjuntivo mais organizado (reta preta) e vaso (seta amarela). Aumento de 40x (A e B). 68
- Figura 5.16 Fotomicrografias do período de 28 dias (Tricrômio de Gomori). (A) HA, pode-se observar vasos sangüíneos (setas amarelas), tecido conjuntivo denso

- modelado (reta preta) e macrófagos (setas vermelhas).; (B) ZnHA, observa-se a presença de um vaso sanguíneo de grande calibre. Aumento de 40x (A e B)..... 69
- Figura 5.17 Fotomicrografias do período de 60 dias (HE). (A) HA, observam-se os vasos sanguíneos formados de grande calibre (seta amarela, os quais foram comuns a maior parte do campo; grande espessura e organização das fibras; (B) ZnHA, mostrando um enorme vaso sanguíneo (seta amarela), além de fibras organizadas entre os grânulos (cruz preta). Aumento de 40x (A e B). 70
- Figura 5.18 Fotomicrografias do período de 60 dias (Tricrômio de Gomori). (A) HA, grande vaso (seta amarela), abundância de tecido conjuntivo ; (B) ZnHA, tecido conjuntivo mais organizado (reta vermelha) apresentando-se celularizado e apresentando célula gigante entre os grânulos (seta azul), além da presença de um tecido conjuntivo mais organizado composto de fibras colágenas (reta preta). Aumento de 40x (A e B). 71
- Figura 5.19 Fotomicrografias mostrando arcabouços contendo contrócitos de (A) ZnHA do período de 7 dias; (B) HÁ do período de 60 dias..... 72
- Figura 5.20. Gráfico da razão entre o número de agranulócitos e células totais em função dos períodos experimentais em resposta à HA e ZnHA. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$). 78
- Figura 5.21. Gráfico da razão entre o número de granulócitos e células totais em função dos períodos experimentais em resposta à HA e ZnHA. As barras indicam diferença significativa entre os materiais nos períodos de 7 ($p < 0,01$) e 21 dias ($p < 0,05$). 79
- Figura 5.22. Gráfico da razão entre o número de células gigantes multinucleadas e células totais em função dos períodos experimentais em resposta à HA e ZnHA. A barra indica diferença significativa entre os materiais no período de 28 dias ($p < 0,001$). 80
- Figura 5.23. Gráfico da razão entre o número de fibroblastos e células totais em função dos períodos experimentais em resposta à HA e ZnHA. A barra indica diferença significativa entre os materiais no período de 14 dias ($p < 0,001$). 81

Figura 5.24. Gráfico da razão entre o número de vasos sanguíneos em função dos períodos experimentais em resposta à HA e ZnHA. A barra indica diferença significativa entre os materiais no período de 14 dias ($p < 0,05$). 82

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Distribuição e principais funções das células do sistema fagocitário mononuclear. Adaptado de JUNQUEIRA e CARNEIRO (2004).....	5
Tabela 2.2 Ocorrências de Fosfatos de Cálcio em sistemas biológicos. Adaptado de LE GEROS (1991) e KAWACHI et al. (2000).....	11
Tabela 2.3 Concentração de Zinco em tecidos, órgãos e em fosfatos. Adaptada de ITO et al., 2002	17
Tabela 2.4 Testes recomendados para Avaliação biológica de materiais. Adaptada de ESTRELA (2001).	22
Tabela 4.1 Correlação Grupo-Freqüência (cm^{-1}) dos principais grupos funcionais encontrados na HA.....	34
Tabela 5.1 Perda de massa das amostras de ZnHA e HA.	53
Tabela 5.2 Análises de absorção atômica para íons Ca e Zn e de UV para os íons P. ...	54
Tabela 5.3 Tempo necessário para a desmineralização dos grânulos de HA e ZnHA em EDTA, determinado por meio da análise radiográfica das peças	59
Tabela 5.4 Evolução temporal do número de Agranulócitos, Granulócitos e Células Gigantes em resposta à implantação de HA e ZnHA (média / desvio padrão)	76
Tabela 5.5 Evolução temporal do número de Fibroblastos e Vasos Sangüíneos em resposta à implantação de HA e ZnHA (média / desvio padrão).....	77

1 INTRODUÇÃO

O avanço do conhecimento humano em diversas áreas trouxe inúmeros benefícios para a qualidade de vida da população, especialmente nos aspectos relacionados à melhoria da saúde e do bem estar. Houve o desenvolvimento de uma área interdisciplinar que trata de materiais que podem ser aplicados a sistemas biológicos, podendo chegar até mesmo a substituí-los. Tal classe de materiais é a dos chamados biomateriais e seu estudo envolve diferentes áreas do conhecimento, como as ciências da saúde, a química e a engenharia de materiais, dentre outras.

A literatura se refere geralmente a três grupos principais de biomateriais: cerâmicas, metais e, mais recentemente, os polímeros e os compósitos. A grande variedade de aplicações dos biomateriais inclui preenchimento dental e ósseo, lentes de contato, lentes artificiais, córneas, articulações, próteses e linhas de sutura (REYES, 2000).

O mercado dos biomateriais vem apresentando grande expansão. De acordo com a *World Health Organization*, há mais de 150 doenças e síndromes relacionadas a problemas musculares e esqueléticos. Em 2004 o mercado mundial de produtos utilizados no tratamento destes problemas foi da ordem de 20 bilhões de dólares, com um crescimento anual de cerca de 14% somente nos Estados Unidos (BIOMET, 2004), como mostrado na Figura 1.1.

Na América Latina, o mercado de dispositivos ortopédicos é estimado em 200 milhões de dólares anuais, sendo liderado pelo Brasil, com 70 milhões de dólares anuais. Tal mercado inspira grandes expectativas de crescimento (MRG, 2004).

Considerando-se que a hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$) é um dos principais biomateriais cerâmicos utilizados para substituição óssea (HENCH, 1998), e dadas as condições favoráveis do mercado para tais produtos, identificou-se uma demanda para um melhor entendimento do comportamento desse material tanto do ponto de vista físico-químico como biológico.

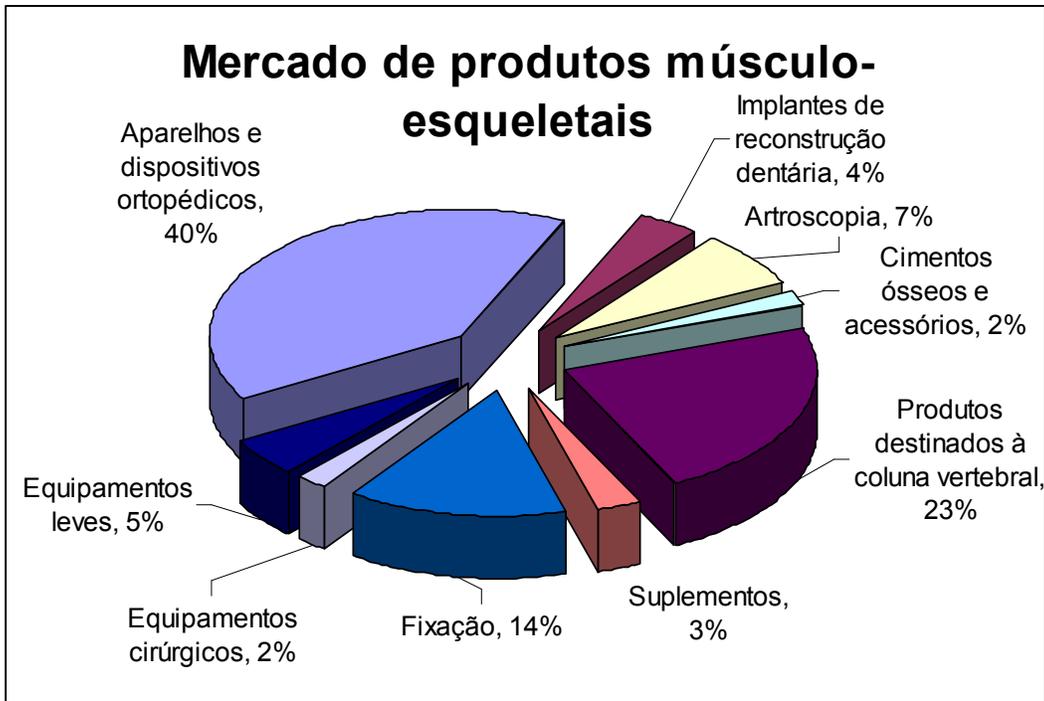


Figura 1.1 Mercado de Produtos Ortopédicos (Adaptado de Biomet, 2004). Pode-se observar que os aparelhos e dispositivos ortopédicos representam 40% do mercado.

A hidroxiapatita (HA) é amplamente citada na literatura por suas propriedades de osseointegração, apesar de ainda apresentar algumas limitações (LANGSTAFF et al., 2001) relacionadas a insatisfatória resistência mecânica (AOKI, 1994). Sabe-se que as hidroxiapatitas sintéticas podem funcionar como reservatório de minerais, favorecendo a formação óssea ou, de acordo com vários autores, funciona como biomaterial bioativo. Apresentam excelentes propriedades de biocompatibilidade, pois não causam resposta inflamatória exacerbada ou indesejada, não são antigênicas e nem carcinogênicas (NOVAES Jr et al., 2002). Entretanto, a mesma possui microestrutura e tamanho de cristal diferente do osso natural, podendo assim produzir resposta biológica indesejada (STEPHAN, 2003).

Uma forma de se alterar propriedades estruturais de biocompatibilidade da hidroxiapatita se dá pela da incorporação de cátions bivalentes (Mg^{2+} e Zn^{2+}) e trivalentes (La^{3+} , Y^{3+} , In^{3+} , e Bi^{3+}), os quais têm sido reportados (WEBSTER et al., 2004).

Dentre estes, o zinco é um elemento essencial para o bom funcionamento dos sistemas imunológico, digestivo e nervoso, além de exercer papel fundamental no

crescimento e no controle de doenças como o diabetes. Mais de 300 enzimas do corpo humano necessitam do zinco para o seu correto metabolismo (JESUS, 2001). Durante a síntese da HA é possível incorporar zinco em diferentes concentrações, resultando nas zinco-apatitas (ZnHA) (COSTA, 2004).

Estudos recentes demonstraram a citocompatibilidade da zinco-apatita no recobrimento de malhas de titânio (STORRIE e STUPP, 2005) e no estudo da interação de osteoblastos e compósitos de β -TCP e HA contendo Zn^{2+} (IKEUCHI et al., 2003; SOGO et al, 2002). Entretanto, a despeito dos estudos existentes, permanecem questões abertas a respeito do efeito da liberação de zinco a partir de zinco apatitas tanto *in vitro* como *in vivo*.

Estudos iniciais já foram realizados com o uso de pó de zinco apatita (COSTA, 2004), de forma que realizou-se uma continuação do estudo do mesmo material, agora utilizando grânulos (que é a forma mais utilizada clinicamente) de zinco apatita contendo 5% de zinco. Fez-se caracterização físico-química dos grânulos de zinco-apatita5% e hidroxiapatita, além de testes *in vitro* e *in vivo*.

Esse trabalho teve como objetivo após a caracterizar físico-quimicamente os grânulos de hidroxiapatita e zinco-apatita 5%, testar a citotoxicidade *in vitro* através de cultura de células e avaliar a biocompatibilidade *in vivo* pela implantação subcutânea dos grânulos dos dois materiais em camundongos Balb/3T3, utilizando métodos de estudos histológicos e de histomorfometria.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Tecido Conjuntivo

Os tecidos conjuntivos se originam do mesênquima (tecido embrionário) e são responsáveis pelo estabelecimento e manutenção da forma do corpo, além de inúmeras outras funções. Apresentam várias moléculas que se conectam ligando as células e órgãos, fornecendo dessa maneira suporte ao corpo. As células desse tecido estão separadas por abundante matriz extracelular. E além disso, os tecidos conjuntivos se caracterizam por serem ricamente inervados e vascularizados (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004, OMOTEYAMA, 2006).

A matriz extracelular é o principal constituinte do tecido conjuntivo, consistindo em diferentes combinações de proteínas fibrosas e de substâncias fundamentais, dessa maneira essas combinações podem ser divididas em: complexo viscoso, complexo hidrofílico, complexo de macromoléculas aniônicas multiadesivas o qual fornece força tênsil e rigidez à matriz (GRODZINSKY, 1983, WALTER, 2006).

Uma outra característica do tecido conjuntivo é que possui uma grande diversidade de células (de acordo com a Tabela 2.1), incluindo fibroblastos, macrófagos, mastócitos, plasmócitos, células adiposas e leucócitos. Algumas dessas células são produzidas localmente e permanecem no tecido conjuntivo. Outras, como os leucócitos, vêm de outras regiões e podem habitar temporariamente o tecido conjuntivo (OEMAR, 1997, OLA, 2006).

A síntese desse tecido depende da presença do fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF), o qual é um membro da família de proteínas CCN, e é expresso em vários tecidos, incluindo condrócitos hipertróficos. Possui a função de regular a proliferação e diferenciação de condrócitos e osteoblastos, além de estimular a angiogênese *in vivo* e promover a produção de matriz extracelular (OMOTEYAMA, 2006).

Os fibroblastos são o tipo de célula mais comum do tecido conjuntivo e possuem diversas funções, dentre elas a estrutural. Outros tipos de células também encontradas no tecido conjuntivo são a célula adiposa, com a função acúmulo de energia, e as células que constituem o sistema imunológico, cujo grau de presença varia, aumentando

quando há uma resposta inflamatória a algum agente estranho que porventura invada o tecido conjuntivo (GROTENDORST, 1997, BALESTRINI, 2006).

A Tabela 2.1 mostra as principais funções das células do tecido conjuntivo.

Tabela 2.1 Distribuição e principais funções das células do sistema fagocitário mononuclear. Adaptado de JUNQUEIRA e CARNEIRO (2004).

Tipo Celular	Localização	Principal Função
Monócito	Sangue	Precursor dos macrófagos
Macrófago	Tecido conjuntivo, órgãos linfóides, pulmão, medula óssea	Produção de citocinas, fatores quimiotáticos e várias outras moléculas que participam da inflamação (defesa), do processamento e da apresentação de antígenos
Célula de Kupffer	Fígado	Igual ao dos macrófagos
Micróglia	Sistema nervoso central e periférico	Igual ao dos macrófagos
Célula de Langerhans	Pele	Processamento e apresentação de antígenos
Célula Dendrítica	Linfonodo	Processamento e apresentação de antígenos
Osteoclasto	Osso (fusão de vários macrófagos)	Digestão do osso
Célula Gigante Multinucleada	Tecido conjuntivo (fusão de vários macrófagos)	Secreção e digestão de corpos estranhos

2.1.1 Tecido conjuntivo propriamente dito

Há diversos tipos de tecido conjuntivo, todos eles apresentando células e matriz extracelular. Um deles é o tecido conjuntivo propriamente dito, que se divide em dois tipos: frouxo e denso.

O tecido conjuntivo frouxo suporta estruturas normalmente sujeitas à pressão e pequenos atritos. É um tecido muito comum que preenche espaços entre grupos de células musculares, suporta células epiteliais e forma camadas em torno dos vasos sanguíneos. Encontra-se em diversas regiões do organismo, dentre elas as papilas da derme, na hipoderme, região denominada de subcutâneo (HOCHMAN, 2003). O subcutâneo é a região abaixo da derme (pele) e, as células mais numerosas são os fibroblastos e macrófagos, embora contenha todos os elementos estruturais típicos do tecido conjuntivo propriamente dito (GUYOT, 2006).

O tecido conjuntivo denso é adaptado para oferecer resistência e proteção aos demais tecidos. É formado pelos mesmos componentes encontrados no tecido conjuntivo frouxo. Entretanto, possui um menor número de células, e uma clara predominância de fibras colágenas. Pode ser dividido em denso não modelado (cujas fibras são organizadas em feixes sem uma orientação definida) e denso modelado, em que apresenta feixes de colágeno paralelos uns aos outros e alinhados com os fibroblastos (BATTEGAY, 1990, MOSSER, 2005).

2.1.2 Tecido ósseo

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo duro que forma os ossos. Funciona como depósito de fosfato e cálcio, armazenando-os ou liberando-os de maneira controlada para a manutenção da concentração desses importantes íons nos líquidos. É um dos tecidos mais rígidos e mais resistentes do corpo humano, sendo formado por componentes orgânicos (células) e inorgânicos (material intercelular calcificado). Essa interação entre esses componentes confere a sua rigidez. Suas principais funções estão relacionadas à proteção, à sustentação (estrutural), armazenamento de íons e participação no metabolismo do organismo humano (RUBIN, 2005).

Há dois tipos de tecido ósseo que constituem o esqueleto: o osso trabecular ou esponjoso e osso compacto ou cortical. O primeiro (trabecular) é encontrado nas extremidades de ossos longos dos vertebrados. É um dos tecidos dos mamíferos capazes

de regeneração, o que em grande parte se deve à habilidade dos fatores de crescimento em direcionar as células-tronco para as vias condrogênica e osteogênica, e ao papel das forças mecânicas estimulando a remodelação óssea (SICCA et al., 2000).

O osso compacto possui fibras colágenas organizadas em lamelas de 3 a 7 μm de espessura, que ou ficam paralelas umas as outras, ou se dispõem em camadas concêntricas em torno de canais com vasos, formando o sistema de Harvers ou ósteons. As lacunas, contendo osteócitos, estão em geral situadas entre as lamelas ósseas. Esses osteócitos são as células que ficaram “enclausuradas” por tecido calcificado e estão conectadas entre si por canaliculos (RUBIN, 2005) (Figura 2.1).

O principal componente mineral da parte inorgânica do tecido ósseo é a apatita biológica, similar à hidroxiapatita (FLEET, 2005). Contudo, há também bicarbonato, magnésio, sódio e citrato em pequenas quantidades. Nas micrografias eletrônicas, os cristais de apatita aparecem sob a forma de agulhas ou tabletes alongados que se arranjam ao longo das fibrilas colágenas. Tais estruturas são conhecidas por agulhas nanométricas de apatita (PRADO DA SILVA et al., 2002a e 2002b).

Existem classificações para o tecido ósseo baseadas nos seus aspectos morfológico e anatômico, dividindo-os em: chatos, longos, curtos, esponjosos, compactos e pneumáticos. Em relação ao aspecto histológico, há o tecido ósseo primário e o tecido ósseo secundário, também chamado de tecido ósseo harvesiano ou lacunar.

Na figura 2.1, pode-se observar uma lâmina com osso secundário, também chamado de lamelar ou harvesiano, que é formado pelos mesmos componentes do tecido ósseo primário. A sua diferença para o tecido ósseo primário é a organização das fibras colágenas em lamelas, que se orientam concentricamente ao redor de canais com vasos, formando os sistemas de Harvers (ósteons) que se comunicam entre si pelos canais de Volkmann.

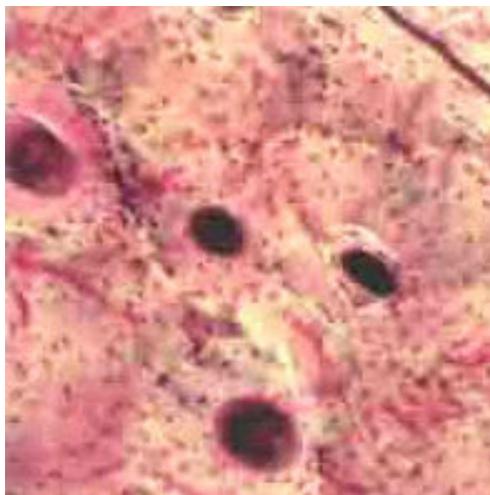


Figura 2.1 – Tecido ósseo secundário (University of Split Medical School, <http://www.vms.hr>, acesso em 08/02/2004)

2.2 Enxertos ósseos

Várias estratégias têm sido utilizadas na busca de desenvolver substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar a função de diversos tecidos. Isso envolve uma área interdisciplinar, como a Engenharia de tecidos e de biomateriais que estuda dentre outras coisas: reposição com material sintético, enxertos xenogênicos submetidos a ligação cruzada para estabilização, células presas em câmara de difusão, microcápsulas que crescem sobre substratos reabsorvíveis, substâncias capazes de induzir células ou tecidos (fatores de crescimento e morfogêneses) destinadas a implantação em local adequado (SICCA, 2000).

Existem diversos tipos de classificação de enxertos ou substitutos ósseos. Por exemplo, pode-se dividi-los em: enxertos autógenos, alógenos, xenógenos e aloplásticos.

Os enxertos autógenos são aqueles retirados do próprio paciente, de uma área chamada doadora, a fim de poder ser transferido a uma área receptora (local de implantação do enxerto). Pode ser de osso cortical, osso medular ou da associação de ambos. O mais eficiente seria o de osso medular que fornece uma maior quantidade de células associadas a fatores de crescimento, proteínas morfogenéticas que estariam junto ao enxerto (MICH, 1999).

Os enxertos alógenos são aqueles obtidos dos tecidos ósseos de indivíduos da mesma espécie do receptor; são processados em condições de esterilidade e armazenados com várias formas e tamanhos nos bancos de ossos humanos. Têm a grande vantagem de eliminar o sítio doador (GARG, 1999, CONZ, 2004).

Os enxertos xenógenos são obtidos de uma espécie diferente do qual o material será utilizado, sendo mais comumente obtidos de bovino e, eventualmente de suínos e caprinos (BAUER, 2000). São fabricados a partir da porção inorgânica do tecido ósseo, de origem animal, e classificados como osseocondutores, como por exemplo o osso bovino desmineralizado (MISH, 2004).

Os enxertos aloplásticos surgiram pela dificuldade ou impossibilidade de se utilizar o enxerto autógeno, e alguns fatores a ele associados como desconforto pós-operatório, morbidade do sítio doador, limitação da quantidade de enxerto e pela possibilidade de transmissão de doenças dos enxertos alógenos ou autógenos (YAMOTO, 1994, CONZ, 2004). Estão incluídos nesta classe os materiais sintéticos como as cerâmicas sintéticas.

2.3 Biomateriais para enxertos ósseos

No início da utilização de biomateriais, buscava-se principalmente características de resistência mecânica e durabilidade, e desejava-se que os mesmos fossem inertes. Com o passar dos anos, foi observada a importância de outro aspecto: a biocompatibilidade. O termo bioativo primeiramente foi usado para definir certas composições de vidros desenvolvidas nos anos 60 e 70, quando se descobriu que os mesmos produziam uma camada reativa na sua superfície, formando uma ligação com o tecido ósseo (HENCH et al., 1971). A definição mais aceita é dada por HENCH e WILSON (1993): Material bioativo é “Um material que retorna uma resposta específica na sua interface, resultando na formação de uma ligação entre os tecidos e o material”.

Atualmente, afirma-se que materiais que formam uma ligação com tecidos ósseos desenvolvem uma camada em sua superfície que é diferente daquela existente anteriormente ao implante. Tal superfície bioativa é formada por uma camada de fosfato de cálcio (HENCH, 1980, DAVIES e BALDAN, 1997), e está presente na superfície de todos os materiais cerâmicos bioativos.

Os materiais utilizados para preenchimento de defeitos ósseos devem apresentar propriedades físicas e biológicas compatíveis com os tecidos vivos hospedeiros para estimular uma resposta adequada dos mesmos (PRADO DA SILVA et al., 2002a). As propriedades topográficas de superfície devem ser consideradas ao fabricar esses biomateriais (MEYER et al., 2005), pois a forma tridimensional do material afeta a reação dos osteoblastos. Entretanto, a relação desses parâmetros no efeito na adsorção de proteínas é complexa e ainda não completamente entendida.

Esses biomateriais podem ser classificados como osteocondutores, osteogênicos, osteopromotores e osteoindutores, de acordo com a sua atuação no sistema biológico.

Os materiais osseocondutores possuem mecanismo de formação óssea inerentes ao enxerto sintético, que é caracterizado pelo crescimento na matriz do material de enxerto utilizado. Este atua como arcabouço para a regeneração do tecido ósseo perdido (CARVALHO et al., 2004). Na osteoindução, o emprego dos biomateriais associados a agentes indutores como as proteínas ósseas morfogenéticas (BMP) e determinados íons promove a formação de um novo tecido ósseo pela diferenciação local das células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos, sob a influência de um ou mais agentes indutores. Tanto os materiais osseocondutores quanto os osseoindutores são usados a fim de realizar a osteogênese no organismo (LINDHE et al., 2005).

A complexidade do tecido ósseo exige, dentro dos princípios da regeneração tecidual, características e propriedades específicas dos biomateriais que permitam a viabilidade do processo regenerativo, de modo a atender às exigências físicas transferidas ao sistema músculo-esquelético pelo conjunto de suas funções. Desta forma, os princípios básicos necessários, como estrutura de sustentação tri-dimensional com resistência mecânica, solubilização compatível, similaridade físico-química, meio de deposição e adesão de substâncias sinalizadoras e células com potencial de neoformação tecidual, precisam estar presentes possibilitando um processo angiogênico adequado preenchendo os requisitos de biocompatibilidade (GARRIDO et al., 2004).

2.3.1 Cerâmicas a base de fosfato de cálcio

Os biomateriais mais empregados como substitutos ósseos são as biocerâmicas à base de fosfatos de cálcio, em particular o β fosfato tricálcico $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ (β -TCP) e a hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ (PRADO DA SILVA et al., 2002a e 2002b), sendo

esta última similar ao principal constituinte da fase inorgânica do osso. Os fosfatos de cálcio são abundantes nos seres vivos, estando presentes em diferentes tipos de sistemas biológicos (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 Ocorrências de Fosfatos de Cálcio em sistemas biológicos. Adaptado de LE GEROS (1991) e KAWACHI et al. (2000).

Fosfato de cálcio	Fórmula química	Razão Ca/P	Ocorrências
Apatita	$(Ca,Z)_{10}(PO_4,Y)_6(OH,X)_2$ (Z=Mg ²⁺ , Sr ²⁺ , Ba ²⁺ , Y=HPO ₄ ²⁻ , CO ₃ ²⁻ ; X=Cl ⁻ , F ⁻)	Varia com Z e Y	Esmalte, dentina, osso, cálculo dentário, pedras, cálculo urinário, calcificação de tecido mole.
Fosfato octacálcico (OCP)	Ca ₈ H ₂ (PO ₄) ₆ .5H ₂ O	1,33	Cálculos dentário e urinário
Monohidrogeno fosfato de cálcio dihidratado (DCPD)	CaHPO ₄ .2H ₂ O	1,0	Cálculo dentário, ossos decompostos
Fosfato tricálcico (TCP)	Ca ₃ (PO ₄) ₂	1,5	Cálculos dentário e urinário, pedras salivares, cáries dentárias, calcificação de tecido mole
Pirofosfato de cálcio dihidratado (CPPD)	Ca ₂ P ₂ O ₇ .2H ₂ O	1,0	Depósitos de pseudo-gotas em fluidos

2.3.1.1 Hidroxiapatita (HA)

Sistemas biocerâmicos baseados em hidroxiapatita (HA) são considerados importantes na classe dos materiais bioativos, os quais podem promover a regeneração óssea (LIN e HON, 1989). A HA é o constituinte principal da fase mineral dos tecidos calcificados, representando entre 30% e 70% da massa dos ossos e dentes, respectivamente. Seu equivalente sintético possui propriedades de biocompatibilidade e de osseointegração, tornando esse material, um dos mais promissores substitutos do osso humano em implantes.

A fórmula da hidroxiapatita estequiométrica é Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂, com razão Ca/P igual a 1,67 (FERNANDEZ et al., 1999).

Dois tipos de hidroxiapatitas devem ser considerados: as sintetizadas em altas temperaturas, que apresentam boa cristalinidade e cristais grandes, e as hidroxiapatitas sintetizadas em baixas temperaturas, que apresentam baixa cristalinidade e cristais pequenos.

Quanto à estrutura, a hidroxiapatita cristaliza-se no sistema hexagonal, grupo espacial P_{63}/m , e possui dimensões de célula unitária $a=b=9,42 \text{ \AA}$ e $c=6,88 \text{ \AA}$ (ELLIOT, 1994).

A hidroxiapatita assim como toda estrutura cristalina possui uma célula unitária e nesse caso ela se caracteriza por ser hexagonal. A célula unitária hexagonal que contém 10 íons cálcio localizados em sítios não equivalentes, quatro no sítio I (Ca_I) e seis no sítio II (Ca_{II}). Os íons cálcio do sítio II estão em triângulos equiláteros perpendiculares à direção c da estrutura. Os cátions do sítio I estão coordenados a 6 átomos de oxigênio pertencentes a diferentes tetraedros de PO_4 e também a 3 outros átomos de oxigênio relativamente distantes. A existência de dois sítios de íons cálcio traz conseqüências importantes para as hidroxiapatitas que contém impurezas catiônicas, pois suas propriedades estruturais podem ser afetadas dependendo do sítio ocupado pelo cátion da impureza.

Deformações na rede causadas pelo deslocamento das hidroxilas tornam a estrutura monoclinica um arranjo mais fechado, com grupo espacial P_{21}/b . Exceto a posição do grupo OH, todas as outras posições atômicas na hidroxiapatita, são essencialmente iguais como as da fluorapatita [$Ca_{10}(PO_4)_6F_2$].

Em relação a forma da HA, a porosa é mais reabsorvível e mais osteocondutora quando comparada com a HA densa (CHANG et al., 2000) e em relação à topografia, a adesão de células e tecidos na superfície de biomateriais pode ser obtida por meio da modificação na superfície de biomateriais. Além disso estudos mostram que em testes de cultura de células a adesão celular é maior em superfície rugosa (TSUJI, 1998).

2.3.1.2 Apatita biológica

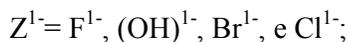
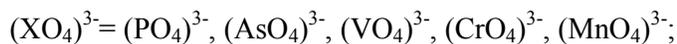
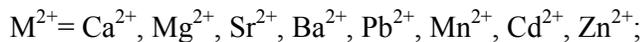
Apatitas biológicas são essencialmente hidroxiapatitas contendo carbonatos associados com outros elementos que constituem a fase inorgânica dos ossos e dentes, ou seja, uma OH-apatita (aproximadamente $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) modificada pela presença de outros íons. As OH^- (hidroxilas) e F^- (fluoretos) presentes nas apatitas são usualmente

substituídas por outros íons como por exemplo Cl^- por OH^- ; Sr^{2+} , Ba^{2+} por Ca^{2+} , CO_3^{2-} por PO_4^{3-}). (LEGEROS et al., 1980).

As apatitas biológicas diferenciam-se das apatitas sintéticas. As apatitas sintéticas são obtidas em laboratório sob condições controladas e têm origem na fórmula inicial da hidroxiapatita com o uso de substituintes, enquanto aquelas representam o mineral constituinte de tecidos duros e contém não apenas íons Ca^{2+} , $(\text{PO}_4)^{3-}$ e $(\text{OH})^-$, mas também pequenas quantidades de íons $(\text{CO}_3)^{2-}$, Mg^{2+} e Na^+ e traços de elementos tais como flúor e cloro. A razão Ca/P das apatitas biológicas difere do valor estequiométrico (VERCIK, 2003).

Um dos efeitos das variações estruturais das apatitas biológicas relaciona-se com o teor de CO_3 incorporado, já que quanto maior for este teor, maior será a atividade metabólica. Como exemplo, o teor de CO_3 do esmalte, um material praticamente inerte, é menor do que na dentina, um tecido de maior atividade (LE GEROS, 1995).

Esse grupo que compõem as apatitas é constituído por sólidos de fórmula geral $\text{M}^{2+}_{10}(\text{XO}_4)^{3-}_6\text{Z}^{1-}_2$, freqüentemente não-estequiométricos, já que um mol de apatita pode conter menos do que dez moles de íons metálicos nas posições M^{2+} e menos do que dois moles de ânions nas posições Z^{1-} . Entretanto, o número de moles na posição $(\text{XO}_4)^{3-}$ é sempre seis. Os íons podem ser:



Estruturas iônicas mais complexas podem ocorrer quando ânions divalentes como: O^{2-} , $(\text{O}_2)^{2-}$ e $(\text{CO}_3)^{2-}$, ocupam as posições Z, no lugar dos ânions monovalentes, preservando-se a neutralidade de cargas com o surgimento de uma posição aniônica vaga. Vacâncias podem ser formadas quando ocorrem substituições também nas posições M^{2+} , preservando-se a eletroneutralidade da estrutura cristalina por duas modificações que podem ocorrer simultaneamente: aparecimento de vacâncias na posição Z na HA não-estequiométrica $\text{Ca}_{9,7} \text{O}_{3,3} (\text{PO}_4)_6 (\text{OH})_{1,4} \text{O}_{0,6}$; e a outra forma são as mesmas vacâncias originadas junto com a substituição de algum íon $(\text{PO}_4)^{3-}$ por grupos divalentes como na apatita carbonatada $\text{Ca}_{8,2} (\text{PO}_4)_4 (\text{CO}_3)_{2,2}$. Os grupos $(\text{XO}_4)^{3-}$

podem ser substituídos por grupos tetravalentes, tais como $(\text{SiO}_4)^{4-}$ e $(\text{GeO}_4)^{4-}$, preservando-se a eletroneutralidade por substituição ou vacâncias nas posições M^{2+} e Z^{1-} (FIGUEIRAS, 1993).

2.3.1.3 Fosfato tricálcico (TCP)

O fosfato tricálcico (TCP) possui composição química $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, com razão atômica Ca/P igual a 1,5 e pode se apresentar em duas fases distintas: a fase β , com sistema romboédrico com simetria R-3c, ou a fase α , com sistema monocíclico com simetria $\text{P2}_1/\text{a}$ (ELLIOT, 1994, COSTA, 2004).

O fosfato tricálcico é geralmente solúvel na presença de fluidos biológicos, com solubilidade maior que a da hidroxiapatita (HENCH e WILSON, 1993), sendo um material biocompatível. Essa biocompatibilidade se deve em parte à sua estrutura cristalina e à velocidade de biodegradação que é maior que o da HA (JARCHO, 1981).

O TCP demonstra bioatividade caracterizada pela osteocondução, servindo como substrato para o crescimento vascular do novo osso. Apesar de boa parte do implante de TCP ser absorvida no primeiro mês, a parte restante permanece no sítio por longos períodos até que seja incorporada dentro da estrutura do osso formado. (SANTOS e GUERRA- LÓPEZ, 1992). EGGLI et al. (1988) observaram a aposição direta do osso no período de 3 a 6 semanas com aumento da formação óssea à medida que o implante de TCP era absorvido.

A fase β do fosfato tricálcico, conhecida como β TCP, é obtida por reação de estado sólido ou decomposição térmica (ELLIOT, 1994). Nesta última, são utilizados o fosfato de cálcio amorfo (ACP) e a hidroxiapatita deficiente, que é obtida sob condições neutras ou ácidas.

Devido à sua biocompatibilidade e bioreabsorção, o TCP é utilizado para o preenchimento de cavidades onde uma rápida reabsorção é desejada, levando em conta que um biomaterial ideal deveria induzir a reposição por estruturas ósseas do próprio organismo.

Cerâmicas bifásicas de HA e β -TCP têm sido consideradas como potenciais substitutos ósseos devido às propriedades de dissolução (HA- não reabsorvível e β -

TCP- reabsorvível), rápida formação óssea, comportamento próximo a fase inorgânica óssea (OLIVEIRA, 2003).

2.3.2 Grânulos e materiais porosos

Os materiais sintéticos são fabricados em várias texturas, tamanhos e formas. A preocupação com a forma e o tamanho do material têm sido uma preocupação constante. Entretanto, ainda é muito controverso o real papel do tamanho de partículas na resposta celular e tecidual aos enxertos ósseos (SICCA, 2000).

Em relação à classificação desses materiais sintéticos de acordo com sua porosidade, podem ser microporosos (denso) e macroporosos; em relação à sua cristalinidade; podem ser cristalinos ou amorfos; em relação a solubilidade em materiais absorvíveis e não absorvíveis; (GARG, 1999; CONZ, 2005) e quanto a forma podem os materiais particulados apresentar uma configuração esférica ou irregular de acordo com o método de fabricação. Dessa maneira pode-se considerar parâmetros como forma, porosidade, área de superfície e cristalinidade como propriedades físicas dos materiais, e em relação a composição química está a substituição iônica e as impurezas (MISCH, 2004).

Independente de serem macro ou microporosos, também são divididos em relação à faixa granulométrica quando empregados na clínica. Por exemplo, um dos biomateriais largamente empregado é o que se encontra na forma microgranular (250-1000 μ m) e macrogranular (1000-2000 μ m).

As aplicações clínicas desses biomateriais granulares podem se apresentar sob diversos tipos: enxerto alógeno mineralizado (FDBA), ou desmineralizado liofilizado (DFDBA), cerâmicas biocompatíveis como a de coral natural, fosfato de cálcio e hidroxiapatita sintética, vidros bioativos e polímeros.

O papel carreador dos fatores de indução óssea potencialmente podem ser desempenhados por materiais granulares, dentre ele está o osso cortical bovino ou medular nas formas macro ou microgranular, desproteinizado segundo demonstrado em estudo clínicos (SICCA, 2000).

Estudos mostraram que grânulos de hidroxiapatita utilizados para preenchimento de falhas ósseas foram biocompatíveis e que a restauração de falhas ósseas ocorreram

mais rapidamente naquelas preenchidas com material microgranular (OLIVEIRA, 1993). Em outro estudo mostrou ainda que essa granulometria precisa ter um diâmetro mínimo, pois ao se utilizar grânulos com dimensões entre 10 e 50 μm , estes poderiam ser fagocitados por células como macrófagos e fibroblastos, devido suas dimensões reduzidas (SHAPOFF, 1980).

2.4 Minerais Essenciais

2.4.1 O zinco

O zinco é um metal considerado um dos elementos traços essenciais ao organismo. Possui número atômico 30, massa atômica 65,39, raio atômico 133,2 pm e massa específica de 7,133 g/cm^3 , estando envolvido no metabolismo ósseo. Sabe-se que o organismo humano necessita dos chamados minerais essenciais para que possa exercer suas funções fisiológicas básicas. Um desses elementos importante é o zinco que estimula a formação óssea em humanos e em alguns animais (ISHIKAWA, 2002).

Nos sistemas biológicos, o zinco é encontrado no núcleo das células, nos cromossomos, ribossomos e grânulos secretados (COSTA, 2004). A deficiência desse elemento provoca a inibição do crescimento, pois o mesmo também participa de diversas formas na proliferação celular, na regulação da síntese de DNA, além de influenciar a regulação hormonal da divisão celular (MACDONALD, 2000).

O zinco exerce uma influência direta em diversas enzimas, e aumenta a atividade do aminoacil-tRNA, que é uma enzima envolvida na primeira etapa da biossíntese das proteínas, incluindo a osteocalcina, IGF-1 e TGF- β nas células osteoblásticas. O zinco aumenta a atividade da enzima fosfatase alcalina ao ser incluído em pastilhas de compósito cerâmicos de $\beta\text{ZnTCP/HA}$. ITO et al (2005) observaram que um conteúdo de zinco de 1,26% em peso aumentou em três a quatro vezes o nível de fosfatase alcalina em relação as cerâmicas sem zinco. Além disso, sabe-se que o zinco também inibe a atividade dos osteoclastos, responsáveis pela reabsorção óssea (MOONGA e DEMPSTER, 1995).

Vários estudos relataram os benefícios do zinco. YAMAGUCHI et al. (1995) estudaram o comportamento do zinco avaliando o comportamento *in vitro* e *in vivo* desse elemento. Esses autores concluíram que o zinco aumenta a quantidade de

proteínas ósseas, o conteúdo de cálcio e a atividade da fosfatase alcalina. Utilizando uma concentração de Zn de 100 μ M aumentou a quantidade de proteínas ósseas, nível de fosfatase alcalina e conteúdo de cálcio.(BETTGER, W.J; 1993; YAMAGUCHI, M; 1988). Além disso, foi possível identificar que uma baixa dose de zinco administrado em calvária de ratos resultou no aumento da atividade da fosfatase alcalina e do conteúdo de DNA nos tecidos ósseos.

O zinco está presente na maior parte do organismo humano. Entretanto, em determinados locais do organismo sua presença se torna mais abundante. Sabe-se que o conteúdo de zinco no osso humano varia de 0,0126 a 0,0217% em peso e que este percentual é relativamente mais alto comparando com outros tecidos e plasma sanguíneo – 12 à 17 μ M de Zn (ITO et al. 2002). A tabela 2.3 abaixo mostra os níveis de concentração de zinco em diferentes locais do organismo e em diferentes tecidos e órgãos, além de mostrar que a solubilidade do zinco é maior na fase de β -TCP em relação as outras formas de fosfatos de cálcio.

Tabela 2.3 Concentração de Zinco em tecidos, órgãos e em fosfatos. Adaptada de ITO et al., 2002

Órgãos e tecidos humanos	Concentração
Todo o corpo	28 - 33 ppm
Epiderme	70,5 ppm
Derme	12,6 ppm
Músculo	38 - 57 ppm
Osso	125 - 250 ppm
Plasma sanguíneo (Homem)	0,72 - 1,21 ppm
Plasma sanguíneo (Mulher)	0,69 – 1,15 ppm
Próstata	102 ppm
Rim	52 – 75 ppm
Fosfatos de Cálcio	
β -tricálcio	0 – 6,17%
α -tricálcio	0 – 1,26% (1450 °C)
Hidroxiapatita sinterizada	0 – 0,13% (1150 °C)
Apatita pobremente cristalizada	0 – 1,1% (temp. ambiente)

2.4.2 Associação do zinco com a hidroxiapatita

A hidroxiapatita permite a substituição de Ca^{+2} , $(\text{PO}_4)^{-2}$ e grupos de $(\text{OH})^-$ por íons, o que promove mudanças nas propriedades estruturais, cristalinidade e morfologia, além de mudanças nos parâmetros de rede como o eixo *a* e *c*, onde neste caso os estudos do efeito da substituição do Zn^{+2} pelo Ca^{+2} ainda são controversos. Embora tenha sido descrito que a substituição do íon *Ca* pelo zinco aumenta ambos os eixos *a* e *c*, isto parece não ser natural considerando o raio iônico do *Zn* (0,074nm) que é menor que o do *Ca* (0,099 nm) (MIYAJI, 2005). De acordo com a regra de Vegard, as mudanças nos parâmetros de rede provocadas pela substituição de determinados íons depende do tamanho e da quantidade dos substituintes. Entretanto, muitas vezes essa regra não se aplica, provavelmente pela própria morfologia desses cátions substituintes. Em relação aos parâmetros de rede, a presença de zinco nas zinco-apatitas obtidas de soluções mostrou expansão do eixo *a* e contração do eixo *c* (LE GEROS, 1980).

COSTA (2004) também mostrou em seus estudos utilizando o programa CELREF que ao estabelecer valores dos parâmetros de rede da HA e ZnHA havia uma redução linear do parâmetro de rede na direção do eixo *a*, na medida em que se aumentava a porcentagem de *Zn* presente nas ZnHA.

O conteúdo máximo de zinco na HA depende da cristalinidade. Por exemplo, apatitas pouco cristalinas ou precipitadas a partir de soluções supersaturadas podem conter mais zinco se comparadas com a HA bastante cristalina (ITO et al., 2005).

A presença do zinco inibe fortemente a cristalização das hidroxiapatitas, que podem ser sintetizadas com uma única fase cristalina com uma concentração de zinco que não ultrapassa cerca de 25% de átomos. Este efeito do zinco em inibir a cristalização da HA e sua preferência em estar mais presente na fase de β -TCP assemelha-se ao comportamento observado para o magnésio. A presença de zinco provoca uma redução da razão molar *Ca/P* e uma redução gradativa no tamanho dos cristais à medida em que se aumenta a concentração de Zinco (BIGI et al., 1995). COSTA (2004) verificou que o tamanho do cristal de HA ao longo da direção 002 e 300 que respectivamente passa de 123 Å na HA para 112 na ZnHA 5% (direção 002) e 78 a

76Å (direção 300). A autora também confirmou a tendência do zinco a decompor a HA em TCP durante o aquecimento.

ISHIKAWA (2002), ao estudar a fase ZnTCP formada durante a calcinação das zinco-apatitas, concluiu que essa fase possui um grande potencial ligado à osteocondutividade, e que a sua presença afeta quase que inexpressivamente as propriedades de resistência mecânica quando comparado à estrutura da apatita sem o zinco. O potencial de uso do ZnTCP e seu sucesso está ligado à quantidade de Zn^{+2} nas zinco-apatitas. Assim, uma dose excessiva desse poderia resultar em citotoxicidade. Além disso, ITO et al. (2005) preparou β -tricálcio fosfato dopado com zinco e observou o efeito do ZnTCP na indução da proliferação de células MC₃T₃-E₁.

BIGI (2005) notou que a diminuição dos parâmetros de rede dos β -TCP com o aumento da concentração de zinco na fase sólida indica que o Zinco re-posiciona o cálcio na estrutura da HA.

Um estudo histológico e histomorfométrico, utilizando fêmur de coelhos, mostrou o efeito da estimulação da cerâmica bifásica de ZnTCP/HA na formação óssea. Observou-se um aumento de 51% na formação de um novo osso quando implantado um conteúdo de 0,316% em peso de zinco, em comparação com TCP/HA sem Zinco (KAWAMURA et al., 2000, ITO et al., 2002).

A zinco-apatita (ZnHA) apresenta geralmente relação molar de (Ca+Zn)/P de 1,67 podendo ocorrer variações. SOGO et al. (2005) observaram um aumento da proliferação de osteoblastos em testes *in vitro* da ZnHAP. Testes *in vivo* também indicaram melhoras no crescimento ósseo em fêmur de coelho (SOGO et al., 2005) com a utilização de ZnHA, comparado com a HA pura.

2.4.3 ZnTCP

A fase de tricálcio fosfato que contém zinco é denominada ZnTCP, sendo a mais comum a fase de β ZnTCP que é a principal fase carreadora de Zinco. Além disso é nessa fase de β -TCP que podemos encontrar a maior parte do Zinco presente na estrutura do material (ITO et al., 2005).

Para a obtenção de ZnTCP é necessário utilizar um processo similar àquele usado para obter pós de HA e β -TCP. Utilizando soluções de nitrato de zinco e ácido fosfórico

acrescidos numa suspensão de hidróxido de cálcio em temperatura ambiente, e após a obtenção do precipitado é necessário elevar a temperatura em torno de 800⁰C, obtendo desse modo ZnTCP bem cristalino. (ITO et al., 2005).

Sabe-se que o tricálcio fosfato contendo zinco (ZnTCP) é biocompatível e bioativo e que permite um conteúdo máximo de 12mol% de Zinco, carreando-o efetivamente. ITO et al. (2005) mostraram que um material de ZnTCP/HA liberou zinco numa razão de 0,9% em peso continuamente por mais de 50 dias, utilizando solução de cloreto de sódio, e um conteúdo de zinco de 1,2% em peso aumentou significativamente a proliferação de células MC₃T₃-E1, e também aumentou a atividade da enzima fosfatase alcalina, ambos participantes da proliferação de osteoblastos.

2.5 Interação das células com os biomateriais

Ao se enxertar um biomaterial no organismo humano, espera-se promover um processo longo de interação da interface entre o biomaterial e o organismo, levando à formação de ligações da superfície do material com as biomoléculas presentes no fluido corpóreo (RODENAS e PALACIOS, 2005).

A primeira fase de interação é a adsorção, que ocorre assim que a superfície do material entra em contato com o fluido corpóreo, e é regida pelos seguintes fatores presentes entre a superfície do biomaterial e o meio biológico: pH, composição iônica, a temperatura, os grupos funcionais das proteínas presentes no meio e o tipo de substrato (VROMAN, 1987).

A seguir, inicia-se a fase de adesão, que promove a ligação de células ao substrato (biomaterial) e se dá por meio de proteínas com alta afinidade a superfície (MEYER, 2005) e moléculas de adesão divididas em famílias: integrinas, superfamília da imunoglobulina, selectinas, além de fatores de crescimento, citocinas, ação hormonal, dentre outros. (LORENZI, 2006).

No tecido ósseo especificamente, algumas proteínas possuem quimiotaxia ou propriedades de adesão por conter uma seqüência RGD Arg-Gly-Asp, que é específica para a fixação de receptores de integrinas de membrana celular e essa adesão depende da distância célula-substrato (MEYER, 1998).

Outros eventos que ocorrem, como proliferação celular e migração; estão diretamente ligados à interface presente entre a superfície do material e a célula (ANSELME, 2000) que muitas vezes permite que haja certos efeitos como síntese de proteínas de adesão, crescimento celular e diferenciação celular (BÜCHTER, 2005).

Outros mecanismos que alteram a interface são os mecanismos biofísicos ligados a resposta celular em reação a superfície como efeitos mecânicos como diretos e indiretos (FROST, 2000), efeitos eletromecânicos, mecanismos de transporte molecular (PIENKOWSKI, 1983). Esses eventos podem ocorrer devido a transferência de carregamento da superfície do material para células, provocando alguns efeitos, dentre eles a estimulação dessas células (MEYER, 2005).

2.6 Avaliação da Biocompatibilidade

Segundo ESTRELA (2001), biocompatibilidade é a capacidade de um material exercer funções específicas quando aplicado em contato com tecidos vivos de determinado hospedeiro, sem contudo causar danos ou prejuízo ao mesmo.

Para avaliar a biocompatibilidade dos biomateriais utilizados nos seres humanos, os mesmos devem ser testados utilizando diferentes procedimentos. Diversas organizações vêm propondo uma série de testes a serem realizados. Esses testes, que consistem em uma série de protocolos de pesquisa, descritos e regulamentados em diversos países, têm como objetivo a correta utilização dos materiais experimentais, avaliando assim a sua segurança para aplicação clínica em seres humanos.

Há décadas, instituições como a ISO/FDI, a ADA, a COMIET, a ANVISA e o INMETRO, além de outras organizações governamentais ou não, têm procurado regularizar e padronizar as diversas metodologias de pesquisa recomendadas para se avaliar a biocompatibilidade dos biomateriais. Assim, uma série de testes foram agrupados em: testes iniciais, testes secundários e testes de aplicação (pré-clínico e clínico) ESTRELA, 2001.

Os resultados dos testes realizados em cultura de células (teste *in vitro*) e realizados em animais (secundários ou de aplicação) não podem ser de imediato extrapolados para as condições clínicas em seres humanos, mas devem ser reavaliados e monitorados antes da utilização em procedimentos clínicos de rotina. Os métodos

experimentais devem ser sempre revistos, assim como os materiais e as possíveis reações provocadas por esses no organismo.

Os testes iniciais são aqueles que avaliam de maneira preliminar um determinado biomaterial, caracterizando seu perfil de toxicidade em um sistema biológico específico. Sendo o teste mais comumente selecionado para essa etapa inicial de seqüência de protocolos o teste de citotoxicidade em cultura de células, seguido por testes in vivo em cobaias, que permitem a avaliação da reação do tecido vivo ao biomaterial, entretanto sem demonstrar o mecanismo que existe por trás da resposta tecidual.

Já os testes secundários, bem como os de aplicação, devem ser obrigatoriamente desenvolvidos seguindo protocolos de pesquisa específicos. Conforme mostra a Tabela 2.4, pode-se citar alguns tipos de testes realizados para avaliação de materiais com possibilidade de aplicação clínica. Dentre os testes secundários atualmente recomendados, o teste de implantação do biomaterial em subcutâneo de animais é o mais amplamente empregado (ESTRELA, 2001).

Tabela 2.4 Testes recomendados para Avaliação biológica de materiais. Adaptada de ESTRELA (2001).

Teste Inicial	Teste secundário	Teste de Aplicação (pré-clínico)
Citotoxicidade	Irritacao da membrana mucosa	Implante dental, implantes ortopédicos
Hemólise	Toxicidade Dérmica por exposição repetida	
Teste de Ames	Implantação subcutânea	
Teste de Styls	Implantacao em tecido ósseo (defeito crítico)	
Dose letal	Sensibilização	
Toxicidade Aguda LD ₅₀ Oral e IP-LD ₅₀ Inalação Aguda		

2.6.1 Avaliação *in vitro*

O desenvolvimento e a padronização de testes *in vitro* que possam detectar a toxicidade de produtos para uso em seres humanos são fundamentais devido à grande necessidade de se conhecer um biomaterial anteriormente à sua aplicação em seres humanos, além da diminuição do uso de animais em laboratório.

Apesar dos testes *in vitro* serem dinâmicos, os mesmos não reproduzem a situação real que ocorre quando um biomaterial é enxertado *in vivo*. Entretanto, fornecem informações valiosas a respeito da morfologia celular, proliferação celular, comportamento das células durante o período de sobrevivência das culturas. (LORENZI, 2006).

2.6.1.1 Teste de degradação

Muita atenção tem sido voltada para o estudo dos mecanismos de dissolução, precipitação, adsorção e outras características de superfície da interface HA-fluido-água como o comportamento de degradação (RODENAS e PALACIOS, 2005).

A degradação é causada por dissolução físico-química, desintegração química de pequenas partículas, fatores biológicos como fagocitose, causando diminuição na concentração de H^+ (GROOT et al., 1998, LEGEROS et al., 1995).

O objetivo do teste de degradação é o de identificar e quantificar o potencial de degradação do produto testado em soluções fisiológicas. Para isso, é necessário o conhecimento prévio das propriedades químicas, físicas e a morfologia da superfície do material (ISO 10993-5).

Em testes de degradação utilizando solução tampão, observou-se muitas vezes que materiais com alta solubilidade contribuem para o processo de neoformação óssea, concordando com os resultados obtidos por outros autores (DUCHEYNE e QIU, 1999).

A zinco-apatita na forma de pó foi testada por COSTA (2004), por de experimentos de dissolução. Pode-se citar um deles onde em tampão TRIS ocorreu perda de íons carbonatos, sugerindo um processo de precipitação na superfície do material e a concentração de cálcio dissolvida foi maior que na de HA. Em tampão HEPES a liberação de zinco nas amostras apresentou um comportamento similar a do cálcio, com liberação maior nas primeiras 72 horas e diminuição a partir desse tempo.

Nos testes de dissolução foi possível detectar que a presença do Zinco na estrutura da HA leva a um aumento de sua dissolução.

O teste de degradação identifica a existência ou não de uma degradação fora do ideal, que poderia comprometer a aplicação *in vivo* dos grânulos, fazendo com que os mesmos se comportem como pós, ou seja, sendo absorvidos pelo organismo.

2.6.1.2 Avaliação *in vitro* da citotoxicidade

O desenvolvimento dos testes de citotoxicidade *in vitro* e seu reconhecimento pelos órgãos internacionais como o FDA em 1993 e a OECD em 1987 têm favorecido a substituição ou diminuição dos ensaios que utilizam animais de laboratório. Muitos autores acreditam que testes *in vivo* reproduzem melhor o comportamento dos biomateriais em humanos, entretanto os testes *in vitro* são mais facilmente controlados e apresentam melhor reprodutibilidade (FRESHNEY, 2000).

De acordo com o Órgão Internacional de Padronização- ISO 10993, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para se avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos, e somente após comprovada a sua não toxicidade é que o estudo da biocompatibilidade do produto pode ser continuado.

O cultivo de células *in vitro* constitui-se uma valiosa ferramenta para se conhecer os mecanismos pelos quais os biomateriais podem produzir reações adversas em nível celular (WENNBORG, 1988). Assim, a citólise e as mudanças no crescimento e na permeabilidade da membrana celular podem ser verificadas *in vitro* (LYGRE et al., 1995). Além desse teste fornecer informações a respeito da segurança do material estudado (TANG et al, 1995), pode indicar se um material deve ser descartado ou ser objeto dos outros níveis de avaliação em estudos posteriores *in vivo* (TORABINEJAD e PITTFORD, 1996).

A cultura de células consiste na retirada de células de um determinado tecido de um organismo vivo (cultura primária) e transferidas a um meio de cultura dando origem a uma suspensão celular. A partir desse momento dá-se início ao cultivo celular. As culturas primárias são normalmente heterogêneas, com pequena quantidade de células proliferativas as quais vão aumentando até atingir a confluência, a partir daí o

crescimento é reduzido e a cultura precisa ser dividida e novas subculturas são preparadas (SANTIAGO, 2004).

Há diferentes linhagens de células com as quais se pode trabalhar, como: Linhagem celular de osteossarcoma (séries MG-63, UMR e ROS), linhagem celular intencionalmente imortalizada (MC3T3E1), linhagem celular de clones não transformados e culturas primárias (BURGER, 2005).

Existem vários meios de se avaliar a citotoxicidade, como, por exemplo, pelo grau de injúria da morfologia celular, pela avaliação do crescimento celular ou pela avaliação de aspectos específicos do metabolismo celular, entre outros (ISO 10993 parte 5).

Em relação à utilização desses testes com os biomateriais, os mesmos são feitos na fase de desenvolvimento do produto, quando se deseja estabelecer a melhor proporção entre os componentes de um biomaterial (RAMIRES, 2001). Nesses testes deve-se sempre considerar que o processo de interação entre células e biomateriais é altamente dinâmico e depende de vários parâmetros que influenciam a resposta celular (ANSELME, 2000).

Os testes *in vitro* se dividem em três categorias, segundo a ISO10993: testes com extrato, testes com contato direto e com contato indireto. De acordo com a escolha a ser seguida, haverá diferenças no modo de preparo das amostras, na cultura de células (tipo de célula a ser usado), e no modo no qual essas células serão expostas. Antes do início do experimento deve-se definir o tipo de teste a ser conduzido, considerando-se todos os parâmetros envolvidos.

Alguns cuidados devem ser tomados, como: as células a serem usadas devem ser obtidas de acordo com a linha preferencial a ser trabalhada, considerando sempre se o banco de células é reconhecido, e se são capazes de fazer com que se obtenha a partir delas a melhor reprodutibilidade e acurácia de resposta.

Muitos parâmetros que influenciam a expressão do fenótipo dos osteoblastos na cultura de células devem ser avaliados, como: meio de cultura, tempo de cultura, e a presença de compostos como ácido ascórbico, β -glicerofosfato e dexametazona que influenciam o comportamento celular *in vitro*.

Vários métodos *in vitro* que utilizam culturas celulares têm sido padronizados para avaliação da toxicidade de biomateriais, tais como: método de difusão em ágar, método de extração, método de inibição metabólica, além dos métodos enzimáticos. Sendo que, o parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade é a viabilidade celular pela contagem de células, que pode ser evidenciada com auxílio de corantes vitais como o Vermelho Neutro e o Azul de Tripán.

2.6.2 Avaliação *in vivo* da biocompatibilidade

É sabido que pequenas mudanças na estrutura química de um material para implante podem afetar a resposta do tecido *in vivo* (RATNER, 1993).

Várias normas devem ser seguidas a fim de se obter uma válida proposta científica para um teste *in vivo* (ISO 10993, Parte 2). Alguns cuidados devem ser levados em consideração, como por exemplo: O animal deve ser sacrificado com o mínimo sofrimento físico e mental; Durante o ato cirúrgico, todas as condições pré e pós-operatórias devem ser seguidas criteriosamente. Além disso, todo protocolo do experimento tem que ser submetido a comissões de ética, e deve ser justificado o número de animais necessários.

Numa avaliação *in vivo* pode-se investigar diferentes aspectos utilizando diferentes técnicas, entretanto a tendência atual é seguir protocolos já estabelecidos.

O objetivo de se utilizar a metodologia do enxerto em subcutâneo a fim de avaliar a biocompatibilidade é que essa técnica permite avaliar a segurança sistêmica de novos biomateriais, permite avaliar: o grau de toxicidade, possíveis malformações de estrutura, degeneração do tecido. Além disso, permite identificar as fibras imaturas as quais penetram entre enxertos de materiais granulares, sinais de inflamação e grau de encapsulamento do enxerto. Dessa forma é capaz de concluir o grau de toxicidade do material utilizado como enxerto (PITIC, 2003).

Outros estudos consideram como parâmetros que avaliam compatibilidade no emprego dessa técnica o aumento do calibre dos vasos, neovascularização e indução de angiogênese (PEATTIE, 2006), além de mínima resposta inflamatória com o passar do tempo (STITZEL, 2006).

WANG (2005) avaliou a biocompatibilidade e a biodegradação de uma prótese arterial revestida por material sintético biodegradável em subcutâneo de ratos. O grau de inflamação foi medido por contagem de células inflamatórias, e como resultado, verificou que no primeiro período (7 dias) foi encontrado exsudado rico em polimorfonucleares e linfócitos em poucos ratos, sendo que aos 14 dias já nenhum exsudado foi encontrado em torno do implante e este já se encontrava envolto de tecido conjuntivo. O infiltrado inflamatório crônico começou depois de 1 mês identificado por aumento de fibroblasto. Concluiu-se com esse estudo que o material induziu um mínimo de resposta inflamatória, sendo considerado biocompatível.

3 PROPOSIÇÃO

Em relação às propriedades da hidroxiapatita e da zinco-apatita, propôs-se neste trabalho produzir e avaliar as propriedades físico-química e biológicas de grânulos desses materiais, bem como determinar sua compatibilidade *in vitro* e *in vivo*. Especificamente pretendemos:

1- Produzir e caracterizar grânulos de HA e ZnHA a partir de pastilhas obtidas por prensagem uniaxial e calcinadas. A caracterização físico-química foi obtida por: DRX (Difração de raios X), FTIR (Infravermelho com transformada de Fourier), MEV (Microscopia eletrônica de varredura) e MET (Microscopia eletrônica de transmissão), teste de degradação e dissolução.

2- Avaliar a citocompatibilidade dos materiais utilizando a norma ISO 10993-5 e células Balb/c 3T3 e contagem do número de células sobreviventes.

3- Avaliar a biocompatibilidade dos grânulos em tecido subcutâneo de camundongos Balb/c 3T3 descrevendo os aspectos microscópicos do tecido reacional e a histomorfometria de células inflamatórias e vasos sanguíneos. Além de avaliar o grau de desmineralização do material usando solução de EDTA.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais

A forma granular da hidroxiapatita é adequada para se avaliar a biocompatibilidade de biomateriais, em função da sua maior área de superfície. Relatos clínicos descreveram que o uso de enxertos de biomateriais em pó pode resultar em reabsorção mais rápida pelo organismo, ou induzir um processo inflamatório mais intenso, levando ao fracasso do enxerto. As formas granulares mais utilizadas comercialmente possuem dimensões da ordem de 250-1000 μm (microgranular) e 1000-2000 μm (macrogranular), como descrito na literatura (CONZ et al., 2005).

4.1.1 Produção de pós de Hidroxiapatita e Zinco-apatita

Os pós de HA e a ZnHA foram produzidos seguindo a metodologia desenvolvida por COSTA (2004), que produziu os pós pelo método de precipitação. Para a obtenção de HA, foram usados nitrato de cálcio e fosfato de amônio, enquanto que para a produção de ZnHA, utilizou-se como precursores nitrato de cálcio, nitrato de zinco e fosfato de amônio. Esses pós utilizados foram sintetizados no CBPF (Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas), e foram cedidos para este trabalho.

A porcentagem de 5% de zinco dos reagentes foi tomada por da razão molar do conteúdo de $\text{Ca} + \text{Zn} / \text{P}$ dos reagentes, a fim de obter um produto em forma de pó seguindo a mesma proporção dos reagentes iniciais. Sabe-se que na hidroxiapatita estequiométrica a razão molar entre o conteúdo de Ca e P é de $10\text{Ca}/6\text{P}$ e para a obtenção das zinco-apatitas 5% essa razão passa a ser de $9,5\text{Ca} + 0,5\text{Zn} / 6\text{P}$ (COSTA, 2004).

Entretanto, é importante ressaltar que ao calcular a porcentagens dos reagentes, não significa que obrigatoriamente os produtos seguirão exatamente o mesmo conteúdo dos reagentes.

4.1.2 Produção de grânulos de HA e grânulos de ZnHA 5%

Para a obtenção dos grânulos, os pós de HA ou de ZnHA 5% foram misturados ao agente porogênico (neste caso, o ácido esteárico) na proporção de 60% de pó para 40% de ácido esteárico (em peso), e armazenadas em recipientes de vidro. A faixa

granulométrica do ácido esteárico utilizada na mistura variou entre 0,5 e 1,5 mm de diâmetro.

As misturas dos pós foram levadas a uma matriz de aço de 15mm de diâmetro, lubrificada com ácido oléico, e foram então submetidas a uma prensagem uniaxial, com carga de 27,8 MPa durante 15 minutos, para a obtenção de pastilhas. Os parâmetros de determinação da quantidade de ácido esteárico, da carga, tempo de prensagem e calcinação utilizados na produção dessas pastilhas foram obtidos com base no trabalho de OLIVEIRA (2003) e CONZ (2004).

As pastilhas foram calcinadas sob 2 condições de temperatura, 400⁰C e 1200⁰C, utilizando as rampas de temperatura descritas na Figura 4.1. O agente porogênico (ácido esteárico) se volatiliza formando poros nas pastilhas ao final do processo. As pastilhas foram imersas em nitrogênio líquido por 5 minutos, sendo então trituradas mecanicamente em gral de ágata e submetidas a tamises, a fim de se obter grânulos na faixa de 250 μ m a 1000 μ m.

Os grânulos foram armazenados em recipientes de vidro para as análises físico-químicas (MEV, DRX e FTIR), e em seringas plásticas de insulina modificadas para a aplicação no teste *in vivo*. Os mesmos foram esterilizados com radiação gama (25 KGy), conforme a norma ISO 11137 (MILLER, 2002).

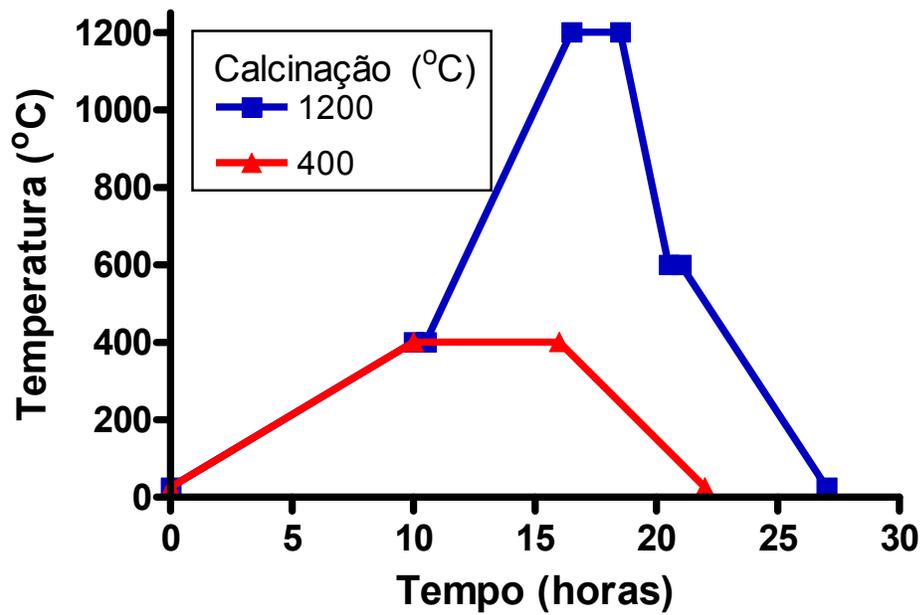


Figura 4.1 Rampas de temperatura para calcinação da mistura de pós de HA, com ou sem zinco, e ácido esteárico. As temperaturas (°C) de calcinação utilizadas estão indicadas na legenda.

4.2 Métodos

4.2.1 Técnicas de caracterização

4.2.1.1 Difração de Raios-X

O fenômeno de difração ocorre devido ao fato de a radiação de Raios-X possuir um comprimento de onda da mesma ordem de grandeza das distâncias interplanares existentes nas células unitárias dos cristais. Dessa forma, a radiação atravessa os retículos cristalinos e produz uma figura de difração que, dependendo do tipo de célula unitária e da dimensão desta célula, existirá uma determinada disposição de picos (pontos de Máximo) no difratograma obtido do material (SMART e MOORE, 1995).

Essa técnica é empregada para identificar a quantidade de fases presentes e pureza do material, além da presença de fases simples ou múltiplas, grau de cristalinidade dessas fases, dentre outros objetivos aliados ao uso de métodos matemáticos (LE GEROS et al., 1995).

Nesse trabalho buscou-se analisar os difratogramas obtidos fazendo comparações com padrões difratométricos de fases individuais disponíveis no JCPDS – *Joint Committe of Powder Diffraction Standards* para os vários fosfatos de cálcio. As análises foram realizadas na COPPE/NUCAT.

O objetivo de se empregar esta técnica neste trabalho foi o de caracterizar os grânulos de HA e ZnHA 5%, pela investigação das possíveis fases presentes e da cristalinidade. Para executar a caracterização foram usados grânulos calcinados nas duas condições de temperatura, 400°C e 1200°C, comparados em relação aos pós de partida dos grânulos não calcinados. As amostras foram preparadas por trituração dos grânulos e posterior peneiramento, obtendo uma granulometria menor ou igual a 150µm. Um equipamento RIGAKU MINIFLEX operando a 30KV, 15mA com uma radiação de CuKa foi utilizado.

4.2.1.2 Infravermelho

O princípio de uso dessa técnica se deve ao fato de que as posições relativas dos átomos nas moléculas não são fixas, mas variam continuamente como consequência de uma grande quantidade de diferentes tipos de vibração (modo vibracional da molécula).

Quando essas moléculas são sujeitas à radiação com energia semelhante à correspondente a essas vibrações (radiação infravermelha), as moléculas podem alterar o seu estado de vibração (excitação), e ocorre a absorção da radiação correspondente à diferença de energia entre o estado inicial e o estado excitado. Para a análise de apatitas utiliza-se a região que se estende de 4000 a 400cm^{-1} ($2,5$ a $25\mu\text{m}$), correspondente à radiação infravermelha intermediária, utilizando neste caso a transformada de Fourier.

A importância de se aplicar esta técnica em materiais como HA e ZnHA deve-se à possibilidade de identificação de grupos funcionais pela comparação do modo vibracional de um material padrão. Além disso, permite identificar algumas substituições importantes ou alterações na composição da hidroxiapatita. Pode-se diferenciar a substituição dos grupos OH^- e $(\text{PO}_4)^{3-}$ pelos grupos $(\text{CO}_3)^{2-}$ por meio da presença das bandas de absorção característica. (ELLIOT, 1994). A tabela 4.1 exibe os principais grupos funcionais encontrados na HA, e seus respectivos comprimentos de onda no espectro de infravermelho.

Neste trabalho, foram investigadas as possíveis alterações provocadas pelo zinco na estrutura da hidroxiapatita. As amostras foram preparadas utilizando grânulos calcinados nas duas condições de temperatura, 400°C e 1200°C , e comparadas com os pós de partida não calcinados, preparados triturando-se os grânulos e misturando-os com KBr para preparação de pastilhas.

Tabela 4.1 Correlação Grupo-Frequência (cm^{-1}) dos principais grupos funcionais encontrados na HA

Grupos Funcionais	Comprimento de Onda (cm^{-1})
OH estrutural	3571
H ₂ O, N-H (Amida A)	3360
H ₂ O, C=O (Amida I)	1653
CO ₃ ⁻² ν_3 , Anel pirrolidínico	1452
CO ₃ ⁻² ν_3	1425
PO ₄ ⁻³	1172
PO ₄ ⁻³ ν_3	1088
PO ₄ ⁻³ ν_3	1025
PO ₄ ⁻³ ν_1	963
CO ₃ ⁻² ν_2 , HPO ₄ ⁻²	873
PO ₄ ⁻³ ν_4	*
PO ₄ ⁻³ ν_4	*
PO ₄ ⁻³ ν_2	*

*Região com ruído intenso

4.2.1.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O objetivo de se utilizar essa técnica foi o de obter uma imagem mais detalhada dos grânulos. Foram utilizados aumentos de 100x para visualização dos grânulos, e as amostras foram preparadas colando-se os mesmos sobre uma fita de carbono. As imagens resultaram de elétrons secundários e de observação sob condições de baixo vácuo.

O equipamento usado foi o ZEISS DSM 940 e parâmetros como concavidades e nível de porosidade, além da topografia, foram avaliados.

4.2.1.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A análise foi feita pela observação direta em um equipamento JEOL 2000FX dos grânulos calcinados a 1200°C e triturados. As amostras foram preparadas por imersão do pó de HA e ZnHA 5% em etanol e submetidos à vibração ultra-sônica. Foram retiradas alíquotas da fase líquida da mistura pó-etanol dos dois tipos de material, as quais foram colocadas em grades pequenas de cobre com um revestimento de filme de carbono para aquisição das imagens.

4.2.1.5 Teste de degradação

Os testes de degradação e dissolução dos biomateriais foram realizados com base na norma ISO-10993-9. As seis réplicas sugeridas pela norma foram divididas em duas amostras triplicatas (uma para a HA e uma para ZnHA), e a faixa granulométrica utilizada ficou fora daquela sugerida pela ISO, para que se pudesse incluir tamanhos de grânulos utilizados comercialmente.

Os grânulos foram pesados em uma balança analítica e separados em porções de $1\pm 0,0005$ g. Cada porção foi colocada em tubos de FALCON e imersa em 20ml de solução TRIS-HCl (13,25g/L, pH 7,4, de acordo com a ISO 3696, grau 2). As amostras foram submetidas a agitação lenta longitudinal em banho isotérmico a uma temperatura de $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ por 120 horas.

Os tubos foram então resfriados à temperatura ambiente, e iniciou-se a etapa de filtração com membrana (MILLIPORE de 4,7mm de diâmetro e porosidade de $0,2\mu\text{m}$) para a separação dos grânulos da solução. Para a filtração da solução, foi utilizado um funil de Becker acoplado a uma bomba a vácuo. Após a filtração, os filtrados foram

separados e os grânulos retidos na membrana foram levados imediatamente a uma estufa, a uma temperatura de $(100^{\circ} \pm 2)^{\circ}\text{C}$ durante 12 horas. A cada 2 horas novas pesagens eram realizadas, até se obter uma estabilidade do peso das amostras. A diferença do peso antes do teste em relação ao obtido após o teste foi anotada a fim de se verificar o grau de dissolução dos materiais.

As diferenças de médias e desvios-padrão das massas de HA e ZnHA, antes e depois foram analisadas estatisticamente utilizando o teste *t* considerando significativas diferenças se $p < 0,05$.

A concentração de íons fósforo nos filtrados de cada material foi determinada utilizando a espectrofotometria na região do UV, bem como por absorção atômica para os íons fosfato e zinco.

Para a análise de dissolução, os filtrados foram retornados aos tubos de FALCON, e a concentração de íons fósforo nos filtrados da solução de cada material foi determinada utilizando e a análise de espectrometria de UV (ultra-violeta), bem como por absorção atômica para os íons fosfato e zinco.

4.2.2 Teste de citotoxicidade celular *in vitro*

4.2.2.1 Cultura de células

Fibroblastos de camundongos da linhagem Balb/c 3T3 (provenientes da ATTC), foram cultivados em garrafas de 25 cm² (Figura 4.2) contendo meio de cultura (Meio Dulbecco MEM/ Nutriente HAMF-12-DMEM) suplementado com NaHCO₃ (1,2 g/L), ampicilina (0,025 g/L), streptomina (0,1 g/L) e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) a 37°C em atmosfera úmida, com composição de 95% de ar e 5% de CO₂. Diariamente, o meio foi trocado e as células foram monitoradas com auxílio de microscópio óptico.

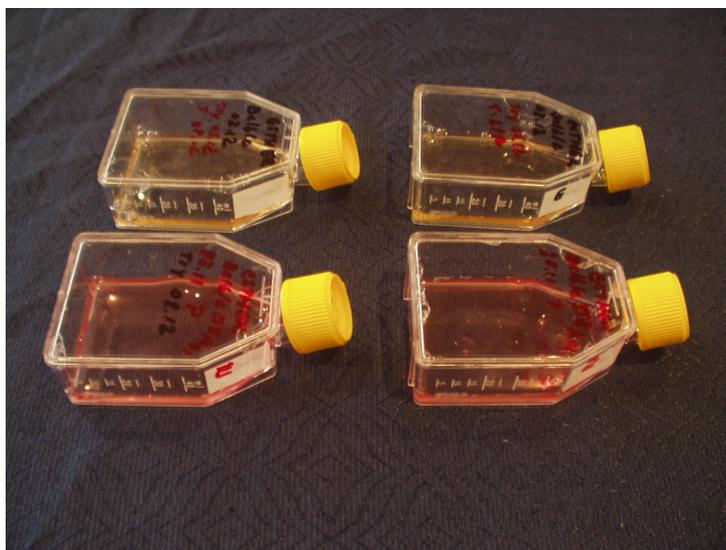


Figura 4.2 - Cultivo de fibroblastos Balb/c 3T3 em DEMEN e 10% de SFB. As subculturas foram obtidas por tripsinização quando as células se mostraram subconfluentes.

4.2.2.2 Teste de citotoxicidade

A citotoxicidade dos materiais foi determinada utilizando a norma ISO 10.993-3, como descrito por TAKAMORI (2004), que realizou o experimento numa densidade celular mínima da ordem de 10^4 células/cm², com o objetivo de utilizar as culturas semeadas em placas de mutiwel de 24 poços.

O teste teve início com o plaqueamento das células, levando a suspensão em 4 placas de 24 poços cada com meio suplementado com soro. Para cada tipo de grânulo foram utilizadas 2 placas. Para cada poço foram utilizados 3×10^4 células. Incubou-se as 4 placas em estufa em atmosfera de 95% de ar e 5% de CO₂ por 24 horas.

As células, juntamente com diferentes diluições do extrato dos grânulos e o meio de cultura, foram dispostas em placas contendo 24 poços. O teste foi realizado em duplicada, onde 2 amostras de cada grânulo do mesmo lote foram testadas em placas diferentes com um total de 4 placas. A cada poço foi adicionado 150µl do meio contendo células.

Para a obtenção do extrato de cada grânulo (método indireto), tomou-se 1 grama de cada material em tubos de FALCON contendo meio de cultura DMEM (Figura 4.3).

A seguir, as amostras foram submetidas a pequena agitação e armazenadas por 24 horas em estufa a 37°C.

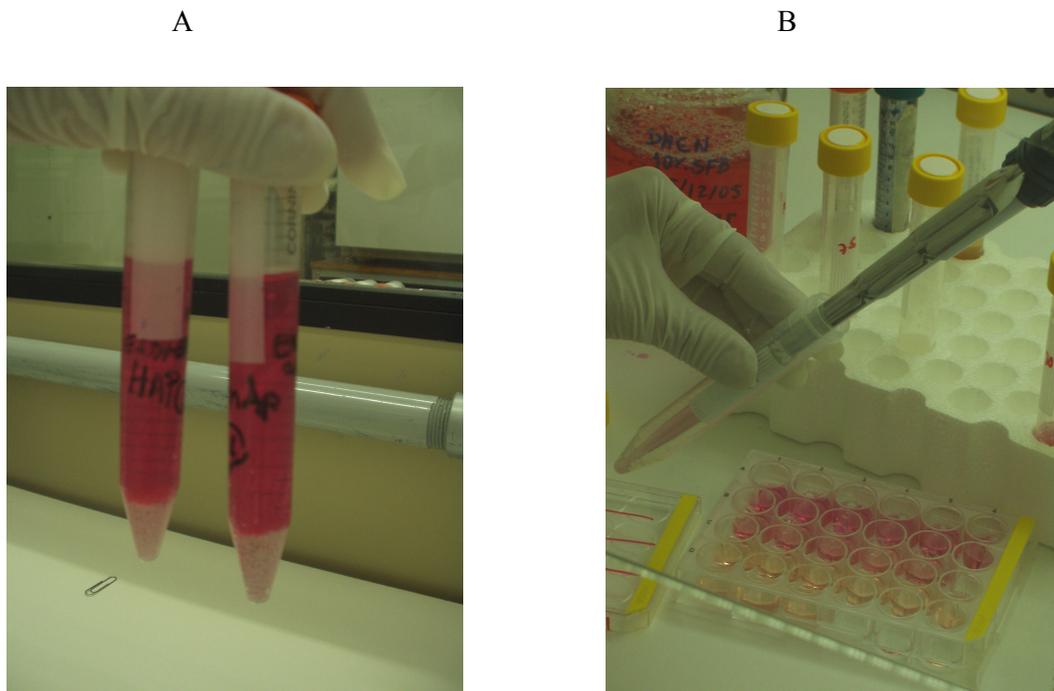


Figura 4.3 Obtenção do extrato dos grânulos de HA e ZnHA em DEMEM. A) Suspensão dos grânulos em DEMEM após 24 horas de incubação a 37 °C; B) Adição do extrato em diferentes concentrações à placa de 24 poços à cultura de Balb/c 3T3.

O teste foi realizado utilizando-se diferentes concentrações do extrato: extrato puro, concentrações de 4%, 20%, 25%, 50%, 75%, e controle (sem o extrato), sendo feito em triplicatas. Dessa forma o teste foi elaborado em placas de multiwell sendo dividido conforme a figura 4.4.

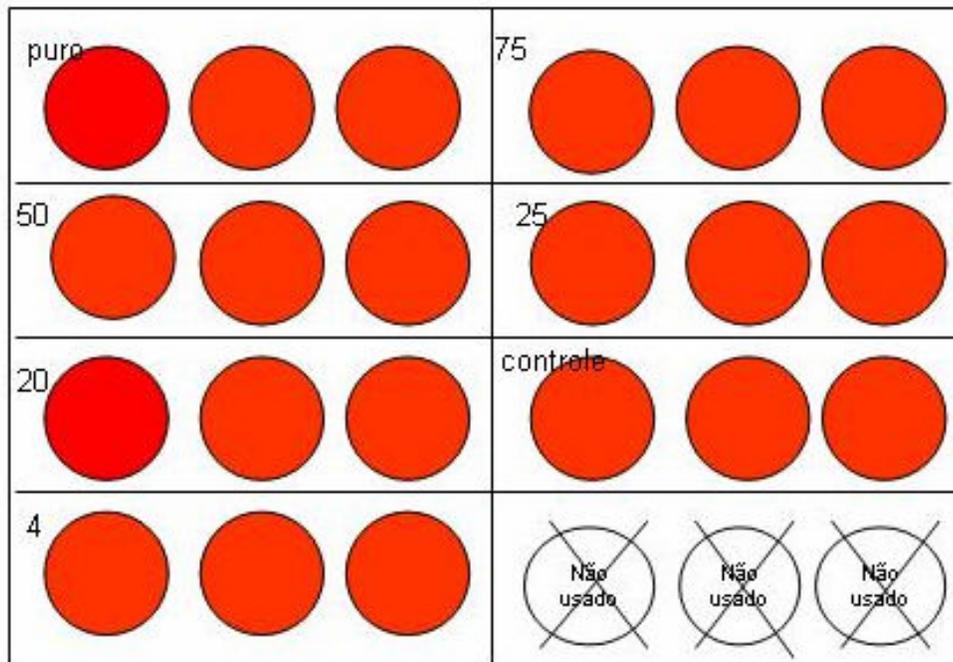


Figura 4.4 – Padrão de distribuição do extrato nas placas de 24 poços. Os experimentos foram realizados duas vezes em triplicata. O controle negativo do experimento consistiu na utilização de DMEM sem contato com os grânulos.

A fim de se quantificar o resultado, houve a necessidade da contagem do número de células sobreviventes. Para isso foi necessário preparar as amostras utilizando formal deído juntamente com uma solução contendo tripsina.

As amostras preparadas foram recolhidas com auxílio de uma pipeta e armazenadas em *ependorfs* estéreis. Para a quantificação, cada amostra foi colocada em uma câmara de Neubaer em duplicata. As imagens foram analisadas em microscópio óptico e a quantidade de células presentes foi obtida com auxílio de um contador.

4.2.2.3 Avaliação da biocompatibilidade *in vivo*

A fim de se avaliar a biocompatibilidade *in vivo* dos grânulos, analisou-se a resposta inflamatória ao biomaterial enxertado, além de identificar as células e estruturas presentes. Para isso, os grânulos foram enxertados em tecido conjuntivo

subcutâneo de camundongos Bal/c, os quais foram posteriormente sacrificados para permitir a análise histológica do tecido de granulação na região de implantação.

O experimento foi realizado no Núcleo de Experimentação Animal (NAL) da Universidade Federal Fluminense (UFF), em conformidade com os princípios do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Os animais foram mantidos durante o período experimental sob boas condições de alimentação, com ração e água *ad libitum*, temperatura ambiente e ciclo claro escuro de 12 horas, em gaiolas individuais forradas com maravalha.

4.2.2.4 Grupos experimentais

Foram utilizados 50 camundongos fêmeas em idade de crescimento (cerca de 2 meses de idade), divididos aleatoriamente em 2 grupos (Grupo HA e Grupo ZnHA, Figura 4.5). Os grupos foram sacrificados após 7, 14, 21, 28 e 60 dias, respectivamente, cada dia tendo um grupo de HA e um de ZnHA sacrificado.

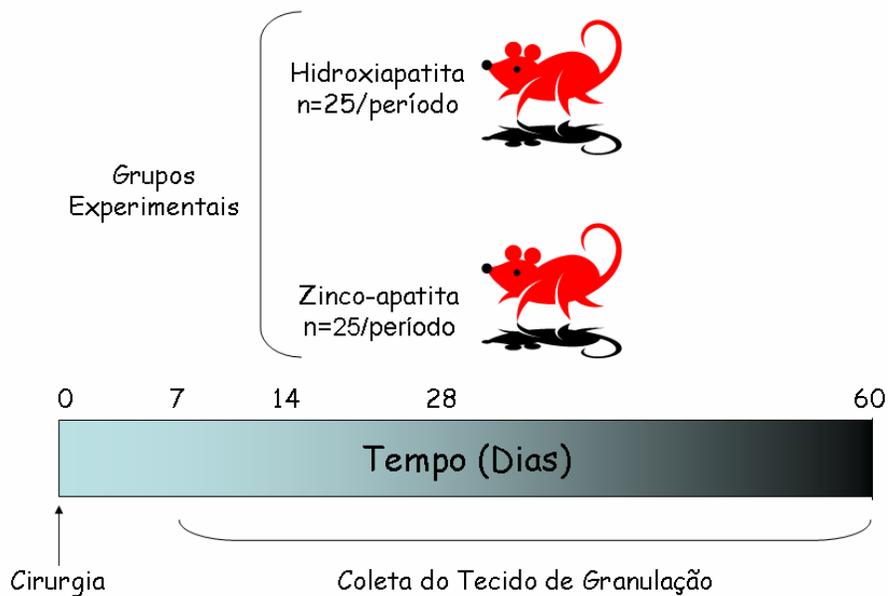


Figura 4.5 Esquema representativo da distribuição dos camundongos (n=50) nos grupos e períodos experimentais. Os períodos de coleta do tecido de granulação são indicados.

4.2.2.5 Preparo dos animais e procedimentos de implantação

A cirurgia foi realizada seguindo normas de biossegurança (incluindo esterilização e anti-sepsia). As etapas cirúrgicas (Figura 4.6 A-F) com o objetivo de implantação dos materiais no subcutâneo da região do dorso dos camundongos foram as seguintes:

1. Tricotomia (remoção do pêlo) no dorso dos animais - realizada um dia antes da cirurgia, a fim de evitar reação inflamatória local durante a cirurgia. A região se estendeu de 2 a 3 cm no dorso e foi feita com auxílio de uma lâmina de barbear.

2. Assepsia – essa etapa consiste em evitar a presença de microorganismos que não são próprios do organismo dos camundongos, que porventura pudessem causar uma infecção secundária ou interferissem na resposta normal do organismo. Essa assepsia foi realizada com auxílio de um chumaço de gaze embebida em álcool iodado.

3. Anestesia – Obtida pela injeção intramuscular na pata (região de coxa) traseira direita, com auxílio de uma seringa de insulina. A dose de anestésico consistiu em 0,02ml de uma solução de Anasedan (cloridrato de xilazina, Vetbrands) com Dopalen injetável (cloridrato de Quetamina, Vetbrands), na proporção de 1:1.

4. Incisão – Realizada com auxílio de bisturi número 15 na região da pele no dorso do animal. A incisão utilizada foi retilínea com aproximadamente 2 cm de extensão. Logo após essa incisão houve a necessidade de deslocar a pele da fáscia muscular com auxílio do próprio bisturi e da tesoura de metzembaum, expondo, assim, a região subcutânea.

5. Inserção do material – Utilizando uma seringa de insulina modificada (ponta cortada), o material foi implantado na região subcutânea, sem agredir outras estruturas no perímetro de inserção, distante lateralmente cerca de 1,5 cm da linha de incisão a fim de evitar o comprometimento da sutura e estabelecimento de uma solução de continuidade entre o meio externo e interno.

6. Sutura - Após a inserção dos materiais, as bordas do tecido foram aproximadas e suturadas com fio de nylon (Seda Ethicon® 3.0), e, em seguida, realizou-se a anti-sepsia com gaze e álcool iodado.

4.2.2.6 Coleta das peças

O ambiente e preparo dos animais previamente à coleta do tecido de granulação (Figura 4.6 G) seguiram normas de biossegurança pelo controle rigoroso de esterilização, antissepsia e uso de campos cirúrgicos estéreis.

Inicialmente, os camundongos foram mortos por deslocamento crânio-cervical, de acordo com as normas do COBEA, seguindo-se a tricotomia no dorso dos animais, incisão e coleta do tecido de granulação localizado por apalpação. Foi assegurado que uma região de pele sem o material também estivesse incluída, resultando em uma borda de cerca de 0,5 cm.

4.2.2.7 Procedimento histotécnico

As peças retiradas foram fixadas durante 48 horas em formol 10% tamponado (tampão fosfato, pH 7,4) em recipiente plástico com tampa (Figura 4.6 H). Após lavagem em água corrente por 6 horas, as peças foram desmineralizadas sem agitação em EDTA (ácido etileno diamino tetracético) a temperatura ambiente. A desmineralização do material foi monitorada radiograficamente, acompanhando as mudanças das imagens radiográficas de radiopacas a radiolúcidas. As radiografias foram obtidas utilizando filmes periapicais convencionais, posicionados a 20 cm de distância do cone do aparelho de raios X, operado a 25 KV e tempo de exposição de 5 segundos. As radiografias foram reveladas pela técnica tempo-temperatura. Após a desmineralização da peças, estas foram desidratadas em solução crescente de etanol (70, 80, 90 e 100%), diafanizadas em xilol, infiltradas e incluídas em parafina. Corte semi-finos (6 μ m) foram obtidos com navalha de aço descartável em um micrótomo histológico e corados em hematoxilina e eosina (HE) e Tricrômio de Gomori.

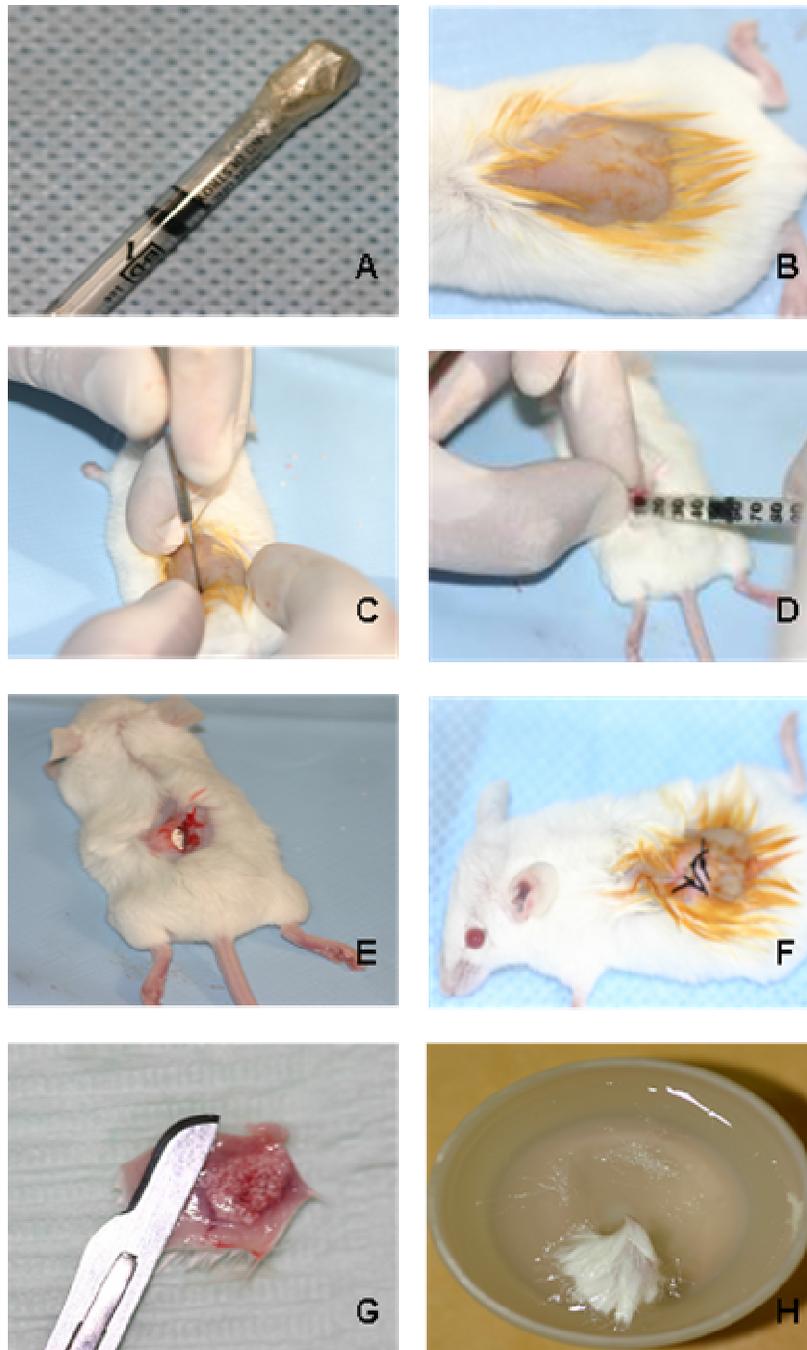


Figura 4.6 Procedimentos Cirúrgicos: A) seringa de insulina com a ponta cortada para inserção do material; B) tricotomia e assepsia do dorso do animal; C) incisão crânio-caudal de 1 cm; D) implantação do material na loja cirúrgica obtida por divulsão do tecido subcutâneo; E) aspecto do material após a implantação; F) sutura; G) coleta do granuloma após os respectivos períodos experimentais; H) fixação da peça em formalina 10% tamponada.

4.2.2.8 Análise microscópica descritiva e histomorfométrica

As lâminas foram observadas em um microscópio óptico de campo claro (Jenaval Universal, Carl Zeiss-Jena), utilizando um filtro 80A (para correção da temperatura de cor), equipado com objetivas plano-apocromáticas (40x, N.A. 0,65). As imagens selecionadas foram capturadas por uma câmera digital (Sony, Cybershot DSC-P93; 5.1 megapixels). A câmera foi ajustada para modo manual, sendo as imagens adquiridas no formato TIFF com a resolução de 1280 x 960 pixels.

A análise subjetiva dos eventos celulares presentes na resposta tecidual aos biomateriais foram avaliados e descritos em função do tipo de infiltrado inflamatório, presença de células gigantes, fibrosamento do tecido, degradação do material, angiogênese e presença de áreas de necrose.

A partir de cada lâmina foram obtidas imagens de 15 campos aleatórios cobrindo toda a região do granuloma. Com o objetivo de realçar a coloração (HE) e diminuir o *background*, usando a rotina *Gamma Correction* do programa Image-Pro Plus® 4.5. A dimensão da imagem digital, nos eixos x e y, foi calibrada utilizando uma lâmina (Carl Zeiss-Jena) com escala de um milímetro de comprimento com subdivisões de 10 µm.

As imagens obtidas foram utilizadas, em modo manual, para quantificar o número total de células, o número de granulócitos, agranulócitos, fibroblastos, células gigantes e células não identificadas, bem como o número de vasos em todos os 15 campos aleatórios tomadas de todas as lâminas coradas por Hematoxilina-eosina (HE). As médias e desvios padrão do número de células identificadas foram utilizadas para a análise estatística (com o auxílio do programa InsTat®, Graph Pad Software Inc) paramétrica pelo método de Análise de Variância a um critério e teste de Bonferroni (se a diferença entre os desvios padrão das amostras fossem não significantes) ou não paramétrico pelo método de Kruskal-Wallis e teste de múltiplas comparações de Dunn, considerando diferença significativa se $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização por Difração de Raios X

Na técnica de difração de raios X (DRX), obteve-se os difratogramas das diferentes amostras a partir dos grânulos triturados de HA e ZnHA nas seguintes condições: material não calcinado (pó de partida), material calcinado a 400°C e material calcinado a 1200°C. As Figuras 5.1 e 5.2 a seguir mostram os difratogramas das amostras de HA e ZnHA, respectivamente.

O espectro de difração da HA não calcinada (Figura 5.1) mostra somente os picos referentes à hidroxiapatita, com elevada cristalinidade. As temperaturas de 400 e 1200°C não induziram o aparecimento de outra fase cristalina, apesar de haver um pequeno aumento da cristalinidade na amostra calcinada a 1200°C, indicado pelo estreitamento dos picos. Tal fato pode sugerir a estequiometria do material próxima a (Ca/P = 1,67).

Os grânulos de ZnHA 5% foram analisados nas mesmas condições de temperatura que os de HA. Houve, assim como nos grânulos de HA, um aumento da cristalinidade e estreitamento dos picos ao se elevar a temperatura de 400°C para 1200°C (sendo que a essa análise foi obtida após o resfriamento das amostras). Observou-se que na temperatura de 400°C não houve o aparecimento de outras fases nos dois grânulos, enquanto que na temperatura de 1200°C uma fase identificada como ZnTCP apareceu no material contendo zinco. A presença dessa fase de ZnTCP sugere que a presença do zinco afeta a estabilidade da hidroxiapatita, com o zinco substituindo provavelmente o cálcio provavelmente na fase de TCP. Sabe-se que a fase de ZnTCP é similar a fase β -TCP, com pequeno deslocamento dos picos em relação a β -TCP.

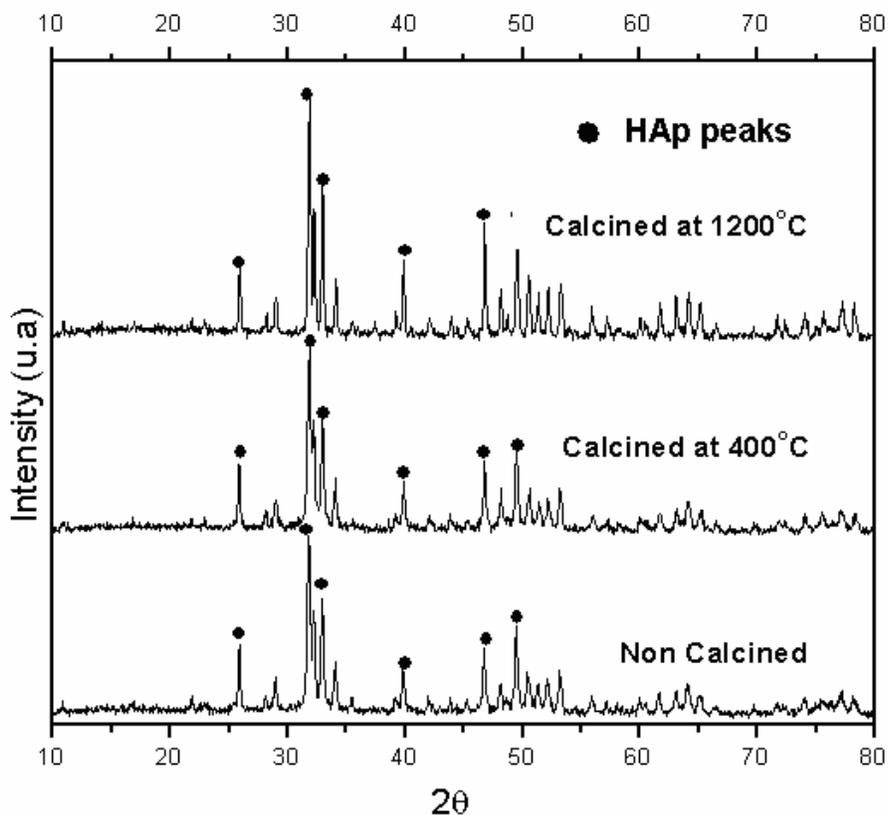


Figura 5.1 Difratomogramas dos grânulos de HA sob diferentes condições

Comparada com a HA, a ZnHA (Figura 5.2) apresentou menor cristalinidade, o que pode ser atribuído à desordem provocada pela entrada do zinco na rede da HA e/ou pela diminuição do tamanho de cristal da HA, confirmando os achados de COSTA (2004), que verificou uma redução linear do parâmetro de rede na direção do eixo c à medida em que aumentou a concentração do Zn na rede das ZnHA, em comparação com a HA. Esse resultado sugere uma contração da rede da HA ao se introduzir Zn na estrutura da hidroxiapatita. Tal fato também concorda com os resultados obtidos por BIGI et al. (1995), que encontraram uma variação nos valores de parâmetro ao longo da direção c similares aos de COSTA.

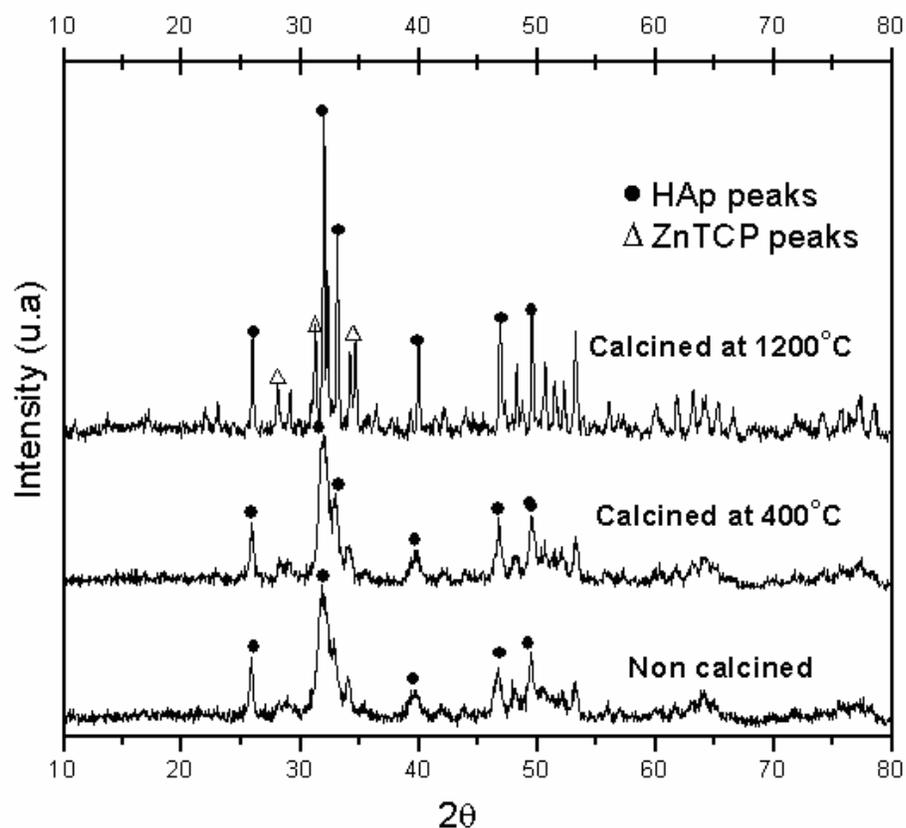


Figura 5.2 Difratomogramas de diferentes condições dos grânulos de ZnHA

No mesmo estudo realizado por COSTA (2004), também foi observada uma diminuição da cristalinidade do material devida à presença do zinco, a medida em que se aumentavam os teores de zinco de 1 a 20% (ZnHA1%, 5%, 10% e 20%). Além disso, as amostras de ZnHA apresentaram uma disposição de pico similar à da HA, principalmente nos difratogramas obtidos de pós não calcinados, indicando a formação de uma única fase cristalina. A partir de 5%, inclusive, foi observada uma decomposição parcial, com formação do ZnTCP, cuja concentração aumenta com o aumento de zinco na apatita.

MIYAJI et al. (2005), pelas análises de DRX, também concluíram que a cristalinidade das apatitas diminui significativamente com o aumento da porcentagem de Zinco nas zinco-apatitas, e que a substituição do Ca pelo Zn provoca a formação de uma apatita Ca(Zn) deficiente. Isso se daria pela dificuldade de cátions divalentes como Zn, Mg e Cu serem substituídos pelo cálcio nas estruturas de apatita, explicando a tendência à decomposição em temperaturas acima de 1000°C.

A baixa resistência mecânica ao manuseio dos grânulos obtidos pela calcinação a 400°C de ambos materiais indicou a seleção dos grânulos calcinados a 1200°C para a realização deste trabalho, pois em temperaturas mais elevadas, o material é mais cristalino, apresentando maior resistência mecânica ao manuseio. Ainda, para a ZnHA 5%, calcinada a 1200°C os difratogramas demonstraram a presença da fase de ZnTCP, sugerindo que o zinco poderia tornar esses grânulos mais solúveis, favorecendo a liberação desse cátion no meio devido à maior solubilidade desta fase. Os grânulos calcinados a 1200°C, para ambos os materiais, mantiveram-se íntegros durante sua manipulação.

5.2 Caracterização por Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As Figuras 5.3 e 5.4 mostram os espectros de FTIR obtidos para as amostras de HA e ZnHA. Não foram verificadas diferenças significativas nos espectros de IR dos grânulos de ZnHA 5% e HA em todas as condições analisadas. Os grânulos de ZnHA 5% (Figura 5.3) apresentaram grupamentos químicos semelhantes aos de HA.

Em ambos os materiais foi possível identificar bandas de absorção de OH⁻, característico da hidroxiapatita (3570-estiramento ν_s e 633 cm^{-1} -vibração de torção, ν_t). As bandas de absorção de 1093, 1034 (estiramento assimétrico ν_3), 960 (estiramento simétrico ν_1), 602, 565 e 475 cm^{-1} (deformação angular assimétrica, ν_4) mostram a presença do grupo PO_4^{3-} , enquanto que as bandas de absorção na faixa de 1453 a 1425 correspondem ao C-O do grupo CO_3^{2-} , sugerindo a presença de uma apatita carbonatada em ambos os grânulos. O processo de precipitação por via úmida tendeu a incorporar carbonato na apatita que se mantém quando calcinada a baixas temperaturas. Por outro lado, a diminuição das bandas de carbonato geralmente está relacionada com o aumento do tamanho dos cristais (COSTA, 2004). Entretanto, a 1200°C, essa região não foi identificada nos grânulos de HA, o que sugere que nessa temperatura a amostra se torna mais cristalina com conseqüente aumento dos cristais da HA.

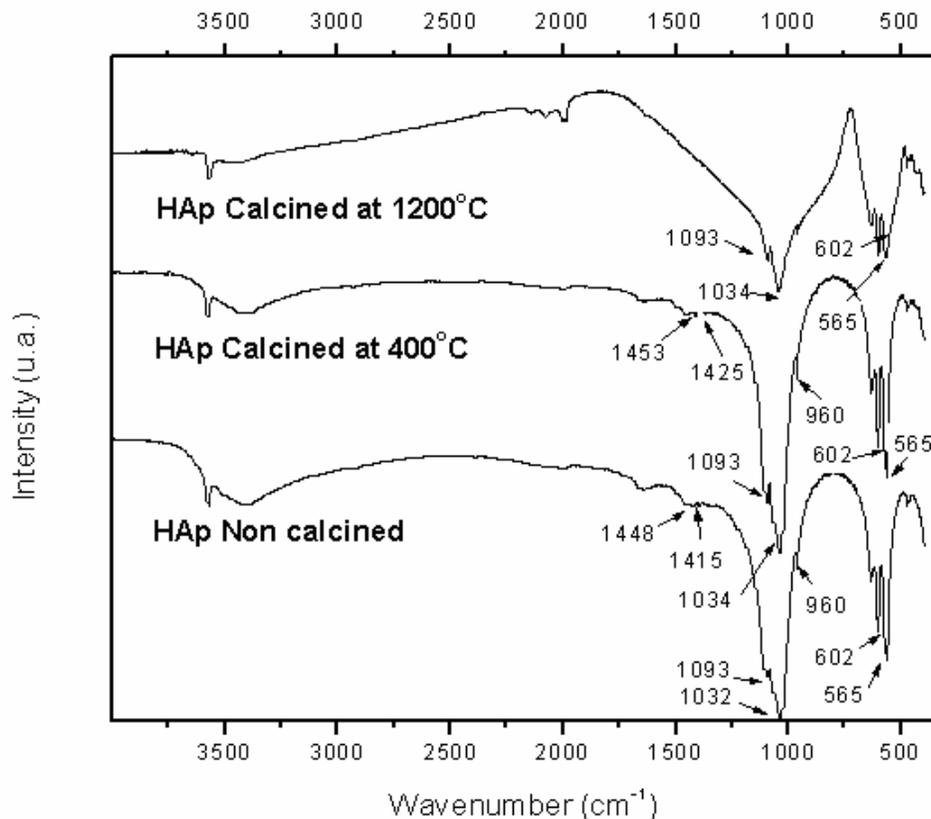


Figura 5.3 Espectro de FTIR para a HA

Os grânulos de ZnHA 5% (Figura 5.4) apresentaram grupamentos químicos semelhantes aos de HA. Dessa maneira, sugere-se que o ZnHA tenha um comportamento parecido ao dos grânulos de HA.

Nas amostras calcinadas a 1200°C (Figuras 5.3 e 5.4) há uma diferença de intensidade na região de PO_4^{-3} sugestiva da presença de fase TCP (PENÃ et al., 2003, COSTA, 2004), embora por DRX não tenha sido identificada decomposição da HA sem Zn calcinada a 1200°C.

Os espectros de ZnHA 5% em relação aos de HA indicaram uma diminuição de intensidade na região de hidroxila (OH) nas condições não calcinadas e calcinadas a 1200°C. COSTA (2004) também verificou que esse fato ocorria com o aumento do teor de zinco. Isso poderia ser devido à diminuição do número de hidroxilas ao longo do eixo c da HA, com a introdução de átomos de maior valência que o cálcio na rede da

HA causando a diminuição da intensidade da banda de OH. Uma outra hipótese seria um aumento da desordem no eixo de maior simetria da HA devido à redução do tamanho dos cristais, levando a um defeito da estrutura que provocaria um alargamento na banda de OH.

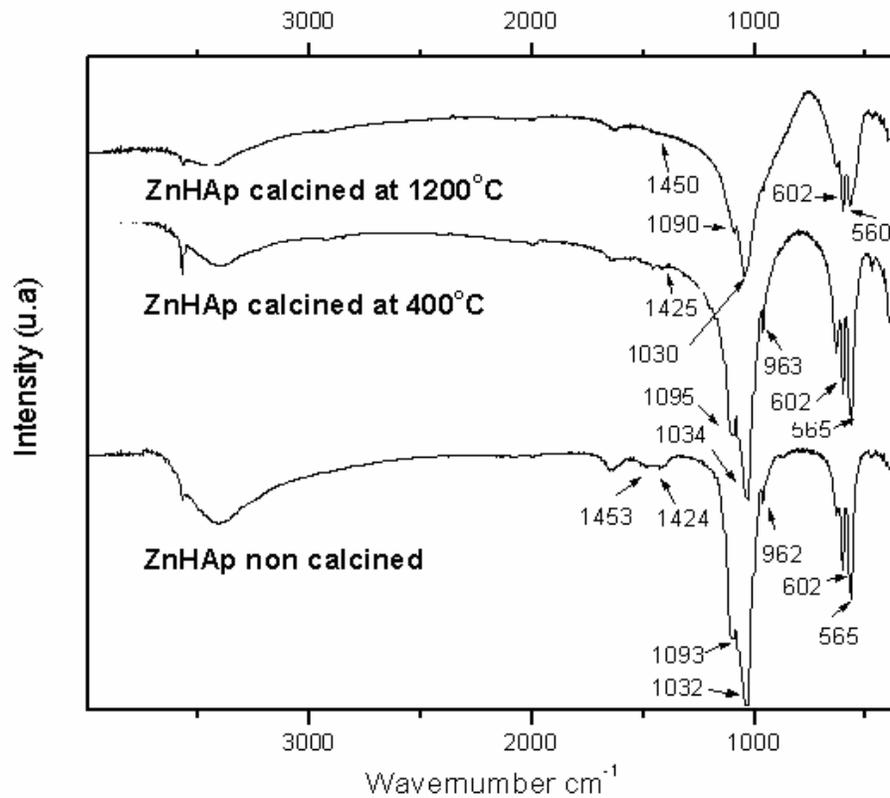


Figura 5.4 Espectro de FTIR para a ZnHA

5.3 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Figura 5.5 mostra as micrografias obtidas com o uso do MEV, utilizando um aumento de 100x, para os grânulos de HA e ZnHA 5% calcinados nas temperaturas de 400°C e 1200°C.

A presença de concavidades superficiais provocadas pelo agente porogênico (ácido esteárico) foi observada. Rugosidades superficiais também foram observadas em ambos os materiais, nas duas condições de temperatura empregadas. Não houve diferenças evidentes nas imagens obtidas por essa técnica dos dois materiais.

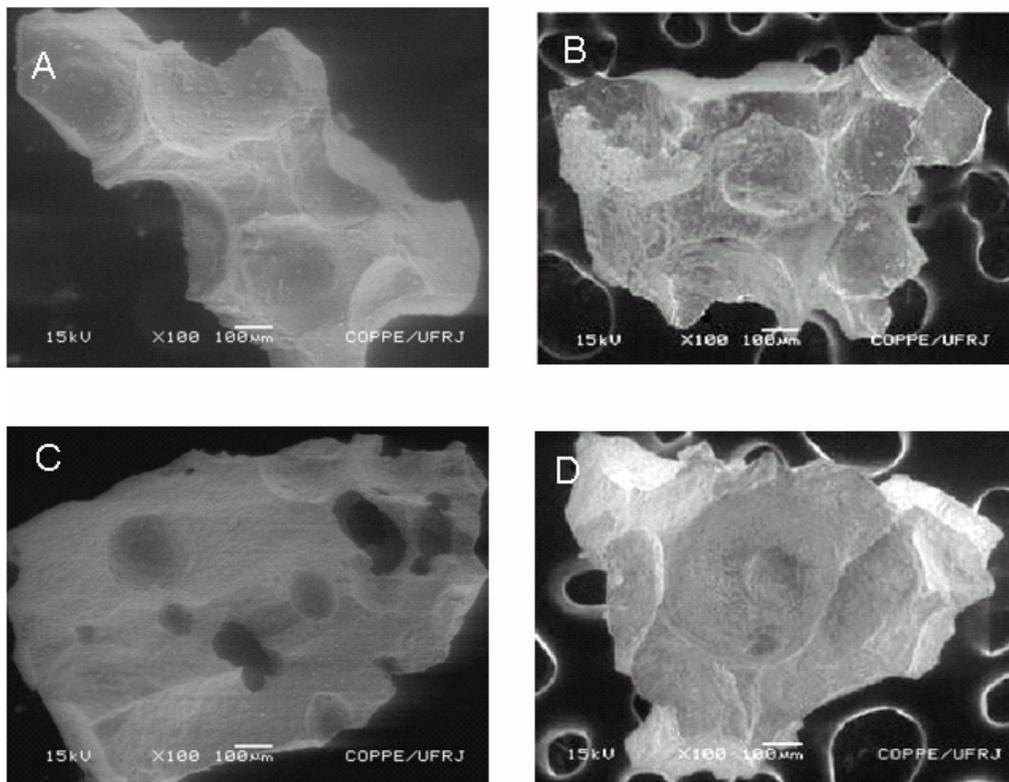


Figura 5.5 Micrografias eletrônicas de varredura: a) HA calcinada a 400°C; b) HA calcinada a 1200°C; c) ZnHA calcinada a 400°C; d) ZnHA calcinada a 1200°C.

5.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A Figura 5.6 mostra as fotomicrografias da análise de MET das amostras de HA e ZnHA calcinadas a 1200°C. Na amostra de ZnHA 5% (Figura 5.6b) pode-se observar partículas nanométricas sugestivas de TCP, cujo tamanho são significativamente maiores que os cristais da HA (Figura 5.6a).

Morfologias similares foram obtidas por outros autores (MAVROPOULOS, 2003 OLIVEIRA, 2003 CONZ, 2004). Identificação por EDS em pós de ZnHA calcinada revelou um teor de zinco de 5,9% mol/mol(Ca+Zn) (COSTA, 2004).

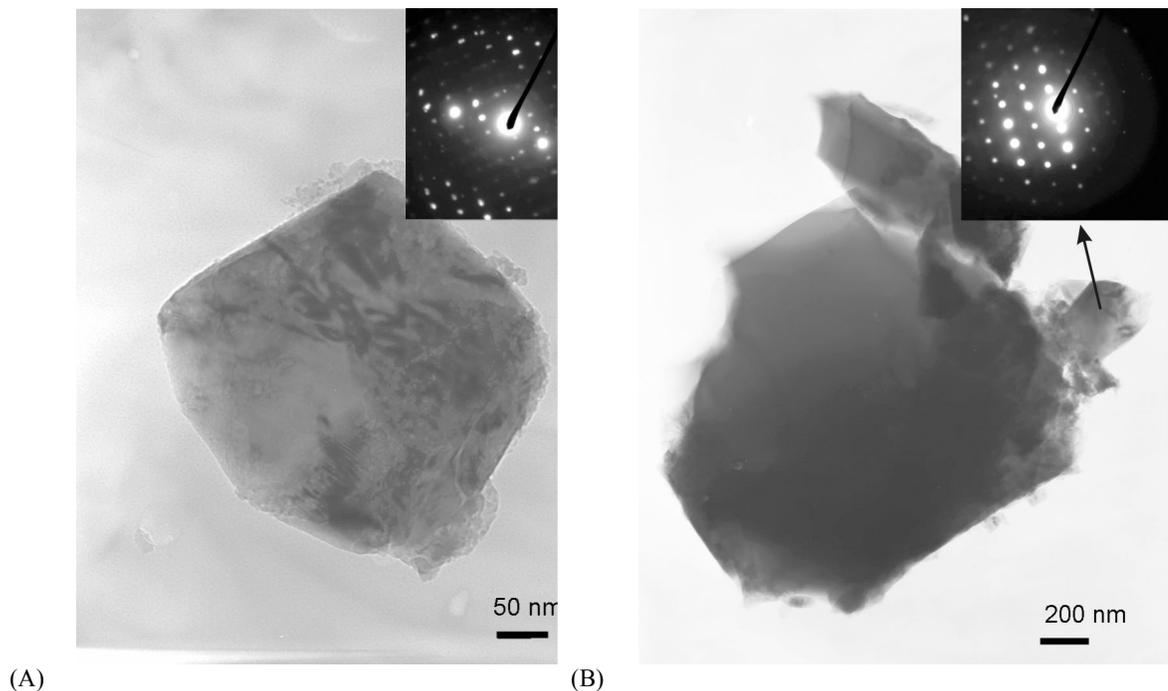


Figura 5.6 Micrografias eletrônica de transmissão e padrões de difração (interno) das amostras de: A) HA; B) ZnHA 5%. Na figura B, a seta indica o padrão de difração do β -TCP na amostra de ZnHA (seta).

5.5 Teste de Degradação

5.5.1 Perda de massa

A Tabela 5.1 e a Figura 5.7 mostram os resultados da análise de perda de massa para as amostras de HA e ZnHA submetidas ao teste de degradação com base na norma ISO 10993. As medições foram feitas antes e após o teste de degradação.

O resultado de perda de massa indicou que a HA se dissolveu mais que a ZnHA, ao contrário do que mais se encontra na literatura, que relata uma perda maior para a ZnHA (ITO, 2002).

Tabela 5.1 Perda de massa das amostras de ZnHA e HA.

Grânulos	Amostra	Massa anterior ao teste (g)	Medição final 4 horas após a primeira (g)	Perda total de massa (g)
HA	1	1±0.0005	0.9633	0.0367
	2	1±0.0005	0.9775	0.0225
	3	1±0.0005	0.9840	0.0160
ZnHA	1	1±0.0005	0.9881	0.0119
	2	1±0.0005	0.9736	0.0264
	3	1±0.0005	0.9904	0.0096

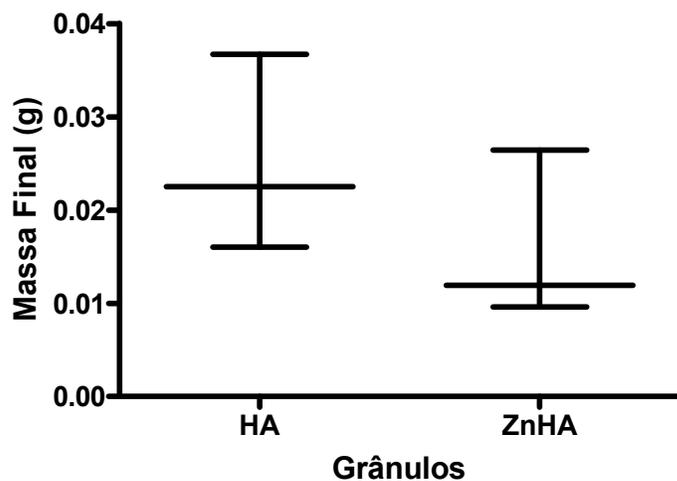


Figura 5.7 Perda de Massa dos grânulos de HA e ZnHA (ISO 10993-9). As médias e desvios padrão das triplicatas foram submetidas à análise estatística (teste *t*, $p < 0,05$), não sendo observado diferença significativa.

Foi realizada uma análise de variância, conduzida para se avaliar a diferença de perda de massa entre a HA e a ZnHA. Nessa análise, adotou-se como hipótese nula a igualdade dos valores de perda de massa, para o cálculo do valor *p* (WILD, 2000). O valor *p* obtido de 0,344, com um nível de significância de 95%, indicou falta de evidências contra a hipótese nula, ou seja, que estatisticamente não há diferença

significante entre as perdas de massa da HA e da ZnHA, considerando a dispersão dos valores obtidos, para se considerar que há diferença entre as amostras analisadas. Entretanto, é válido ressaltar que o experimento foi realizado utilizando triplicatas das amostras quando, segundo a norma ISO, seriam necessárias sextuplicatas, o que poderia interferir com o resultado da análise estatística por afetar a variância das medidas.

5.5.2 Análise química da solução após o teste de degradação

Os resultados da análise de absorção atômica e de UV são mostrados na Tabela 5.2. Os resultados mostrados nessa tabela reforçam a tese de que a HA apresentou perda de massa maior do que a ZnHA.

Com os dados obtidos, foi possível observar que os valores de dissolução em meio TRIS-HCl para os íons Ca nos dois grânulos foram relativamente próximos. COSTA (2004) verificou que a HA calcinada a 1150°C dissolvia mais em meio TRIS-HCl que a ZnHA, mas após 5 dias esses valores se invertiam.

Nos experimentos em tampão Hepar, porém, a mesma autora encontrou uma dissolução maior das ZnHA em relação à HA em períodos inferiores e superiores a 5 dias. Uma explicação para esse fato é que a dissolução de íons varia de acordo com o grau de saturação da solução e com o meio em que está sendo testado o material, além de outros fatores como tamanho das partículas e condições do teste. Deve-se também considerar que um teste de dissolução *in vitro* é um sistema termodinâmico fechado, onde as condições podem ser controladas, o que se não ocorre em testes *in vivo*.

Tabela 5.2 Análises de absorção atômica para íons Ca e Zn e de UV para os íons P.

Solução filtrada após banho isotérmico	Amostra	[Ca] (ppm)	[Zn] (ppm)	[P] (ppm)
ZnHA	1	11.4	48.7	4.99
	2	13.2	36.9	4.06
	3	13.4	34.6	7.48
HA	1	16.5	-	50.99
	2	17.3	-	28.46
	3	17.6	-	12.92

Em relação à dissolução dos íons fosfato, verificou-se que na HA, esta foi muito maior que na ZnHA, e a dissolução de P na HA foi muito maior que a de Ca. Esse resultado se diferencia dos encontrados por outros autores como FULMER et al. (2002) que ao medirem a dissolução de TRIS-HCL de diferentes HA, encontraram uma dissolução de Ca maior que a do P, com taxa de liberação maior até 4 horas após o teste, se aproximando de uma condição mais estável após 120 horas do teste.

Nas análises de ZnHA, foi possível verificar que houve dissolução de Zn no meio TRIS-HCL, e que os valores foram próximos entre as amostras. ITO et al. (2002), utilizando testes de dissolução com cerâmicas de ZnTCP e ZnTCP/HA em soluções pseudo-fisiológicas, mostraram que a liberação de Zinco se deu por mais de 20 dias, de forma lenta e contínua, mas após 30 dias houve a tendência de estabilização o que indica que essa solubilidade varia em função do tempo transcorrido do experimento em que é avaliado. Essa solubilidade diminuiu na medida em que se aumentava o conteúdo de Zinco na amostra.

Os mesmos autores sugeriram o uso de solução simuladora de fluidos biológicos (SBF), pois a dissolução de Zinco estaria relacionada com a concentração de Ca e P presentes na solução, demonstrando a boa propriedade do ZnTCP de ser um “material inteligente”, com regulação da sua dissolução como resposta aos parâmetros dinâmicos presentes na solução. Além disso, encontraram uma liberação de Ca maior que de P, que por sua vez foi maior que a do Zn em períodos que variaram entre 6 a 60 dias em solução pseudo-fisiológica, o que sugere que a liberação de íons está inteiramente relacionada ao meio utilizado como teste.

5.6 Avaliação da citotoxicidade celular *in vitro*

A observação em microscopia ótica das células expostas às soluções de extratos mostrou resultados diferentes entre as amostras dos grânulos de HA e ZnHA.

A exposição das células aos extratos oriundos da HA não provocou morte celular em qualquer das diluições de extrato (Figura 5.8). Enquanto que nas amostras de ZnHA foi observada citotoxicidade para o extrato puro (100mg/mL), com uma taxa de sobrevivência menor que 5% das células ($p < 0,05$) e nas concentrações de 75 e 50 mg/mL, onde se observa a sobrevivência de 13 e 45% das células, respectivamente. Cabe ressaltar que o resultado do teste obtido sob condições *in vitro* não deve ser

extrapolado diretamente para condições *in vivo*, pois nos sistemas *in vitro* as condições são estáticas e controladas, medindo variáveis filtradas, enquanto no sistema biológico os tampões celulares e a homeostase do sangue ajuda a dissipar possíveis elementos tóxicos.

Na Figura 5.8, as barras de erro representam o intervalo de confiança para $p < 0,05$. Assim, quando as barras de erro para os dois materiais em determinado ponto experimental se superpõem. Assim, podemos verificar que, de fato, a toxicidade da ZnHA começa a se manifestar em concentrações superiores a 25 mg/mL, sendo estatisticamente diferente da HA ($p < 0,05$).

As concentrações do extrato dos grânulos de HA utilizadas não promoveram diferença significativa no número de células sobreviventes, restando em todos os pontos experimentais, cerca de 100% das células.

A preparação de biomateriais envolve, em algum nível, a geração de resíduos que podem ser citotóxicos. Dessa forma, durante o desenvolvimento de materiais para uso médico-odontológico, a determinação do grau de citotoxicidade e biocompatibilidade é um passo obrigatório (WATAHA, 2001). Esses resíduos podem ser devidos à formação de fases indesejada no material ou à degradação de algum de seus componentes.

A análise dos resultados de citotoxicidade de materiais em desenvolvimento normalmente é feita pela comparação com materiais similares já em uso clínico ou a padrões positivos ou negativos reconhecidos (SCHMALZ, 1994, KEISER et al., 2000; IMAZATO et al., 2000). No presente estudo, foi notável o efeito dose-resposta da ZnHA na morte celular. A diluição seriada do extrato puro minimizou os efeitos deletérios sobre as células Balb/c 3T3, apontando para a existência de partículas dissolvidas do biomaterial que provocaram a morte celular.

Recentemente, observou-se *in vitro* o aumento da proliferação de osteoblastos sobre ZnHA, indicando maior crescimento ósseo em fêmur de coelho com a utilização de ZnHA em relação à HA (SOGO et al., 2005). Esses resultados conflitantes com os achados descritos no presente trabalho. Durante a preparação da amostra, as pastilhas de HA e ZnHA foram calcinadas a 1200°C. Como a ZnHA se decompõem a temperaturas ao redor de 800°C, pode ter ocorrido a formação de ZnTCP, corroborado pela análise de DRX. Ainda, não se pode descartar a formação de fosfato de zinco. Ambas as fases

apresentam maior solubilidade que a ZnHA e a HA, favorecendo a rápida e intensa liberação de Zn no meio, o qual pode ter sido o responsável pela toxicidade celular.

A esse respeito, convém salientar que a citotoxicidade apresentada por algumas vitro-cerâmicas, utilizadas como materiais substitutos ósseos, foi associada à liberação de componentes do material para o extrato (IGNATIUS et al., 2001). Duas diferentes blends de amido de milho, amido/álcool vinil etileno (SEVA-C) e amido/acetato de celulose (SCA) e seus respectivos compósitos com HA foram avaliados quanto a citotoxicidade e adesão celular. As diferenças observadas foram atribuídas aos distintos processamentos a que foram submetidos os materiais, uma vez que o aquecimento e ciclos de extrusão realizados durante a preparação de polímeros promovem a formação de fragmentos de fácil liberação para o meio durante a obtenção do extrato, o que aumenta, portanto, a citotoxicidade do material em relação àqueles que não sofrem tal fragmentação (MARQUES et al., 2002).

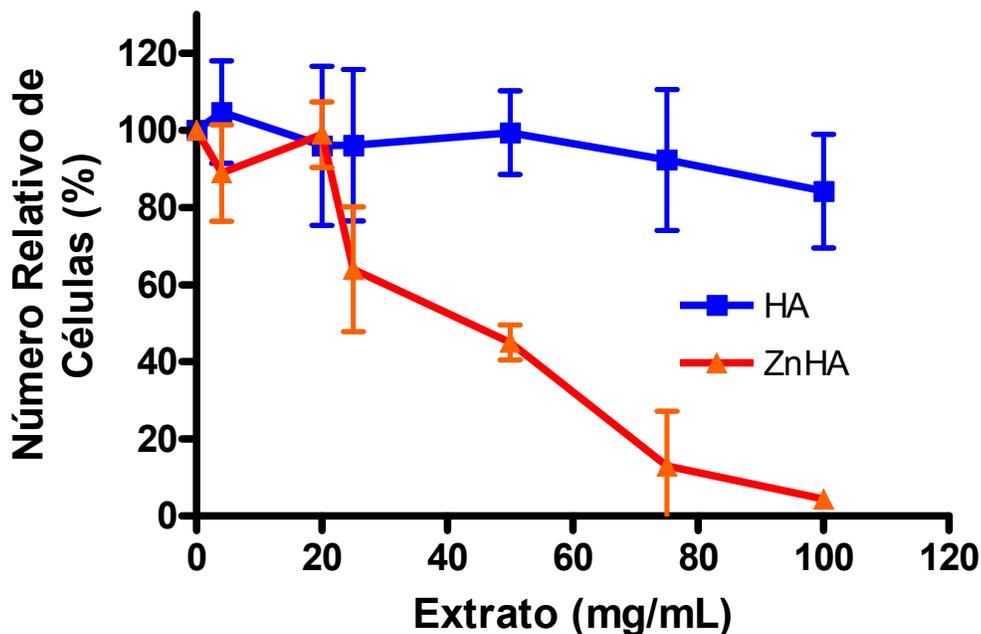


Figura 5.8 Avaliação da citotoxicidade da HA e ZnHA utilizando células Balb/c 3T3 de acordo com a norma ISO 10993-5. O número de células na ausência do extrato foi considerado como 100%. Os pontos experimentais correspondem à média de dois experimentos independentes em triplicata. As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95% da média. Barras que não se superpõem indicam diferença estatisticamente significativa.

5.7 Avaliação *in vivo*

5.7.1 Análise radiográfica

A análise radiográfica foi utilizada para acompanhar o processo de desmineralização dos granulomas obtidos. A análise subjetiva do processo de desmineralização se caracterizou pela identificação do período de tempo necessário para a perda de radiopacidade do material. Observando a Tabela 5.3, é evidente que a desmineralização dos grânulos de ZnHA 5% ocorreu mais rapidamente do que os de HA. Em média, a desmineralização da ZnHA tomou 22,2 dias, enquanto para a HA foram necessários 65 dias, cerca de 3 vezes mais tempo.

Quando da avaliação do grau de dissolução em Tris-HCl dos materiais, não se observou diferença estatisticamente significativa. Isso indica que a desmineralização em condições mais drásticas (EDTA) pode ter favorecido a dissolução da ZnHA. Isso reforça o conceito de que a dissolução do material é dependente do meio, e que suas propriedades podem sofrer modificações após terem sido implantadas *in vivo*.

Tabela 5.3 Tempo necessário para a desmineralização dos grânulos de HA e ZnHA em EDTA, determinado por meio da análise radiográfica das peças

Grupo	Períodos Experimentais				
	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	60 dias
HA	68 dias	69 dias	61 dias	71 dias	56 dias
ZnHA	15 dias	14 dias	20 dias	27 dias	35 dias

5.7.2 Análise Microscópica Descritiva

5.7.2.1 Período de 7 dias

Observaram-se tanto no grupo de ZnHA quanto no de HA áreas focais com presença abundante de células. Algumas células, como macrófagos contendo vacúolos digestivos em seu citoplasma, foram observadas, além de um intenso infiltrado inflamatório crônico rico em agranulócitos e células gigantes multinucleadas inflamatórias que, em muitas regiões, circunscreviam os grânulos implantados. Raros granulócitos foram observados, em particular para a HA. O processo inflamatório encontrava-se organizado como um granuloma tipo corpo estranho, circunscrito perifericamente por um discreto fibrosamento tecidual (tecido conjuntivo frouxo), mais espesso no grupo da HA. É interessante destacar a intensa presença de fibrócitos e a proliferação de vasos, que se mostravam mais congestionados no grupo ZnHA, sugerindo uma atividade metabólica do granuloma.

5.7.2.2 Período de 14 dias

Observou-se no grupo de ZnHA intenso infiltrado rico em agranulócitos principalmente células gigantes, presença de angiogênese e presença de vaso sanguíneo

de maior calibre o que sugere uma maior atividade metabólica do granuloma e intensa proliferação fibroblástica com uma organização maior das fibras comparadas ao período de 7 dias. A presença de fibroblastos era marcante, sendo mais evidente no grupo HA. Também se observou algumas regiões apresentando tecido conjuntivo denso não modelado. O granuloma encontra-se circunscrito por uma cápsula fibrosa mais espessa que do período anterior. A resposta inflamatória mostrou predomínio de agranulócitos em relação aos granulócitos, os quais eram praticamente inexistentes no grupo HA.

5.7.2.3 Período de 21 dias

O predomínio de fibroblastos se mantém nesse período, dispostos de modo mais organizado com algumas áreas apresentando tecido conjuntivo denso modelado, sem diferenças evidentes entre os grupos experimentais. O infiltrado inflamatório era rico em agranulócitos e sua intensidade manteve-se semelhante ao período anterior. Notou-se a intensa presença de vasos sanguíneos, principalmente entre os grânulos, sendo alguns de maior calibre e apresentando túnicas mais espessas no grupo de ZnHA. Células gigantes multinucleadas eram evidentes. Era notável a presença de cápsula fibrosa ao redor do granuloma.

5.7.2.4 Período de 28 dias

Nesse período, poucas modificações foram observadas em relação aos períodos anteriores. Destaca-se o espessamento da cápsula fibrosa e o aumento no número de células gigantes no grupo HA em relação à ZnHA. Permaneceram intensos a proliferação fibroblástica e angioblástica, presença de vasos sanguíneos congestos de maior calibre entre os grânulos e agranulócitos. O granuloma apresentou cápsula mais espessa que nos períodos anteriores e fibroblastos com disposição mais organizada. Foi notada uma grande área ocupada por fibras colágenas.

5.7.2.5 Período de 60 dias

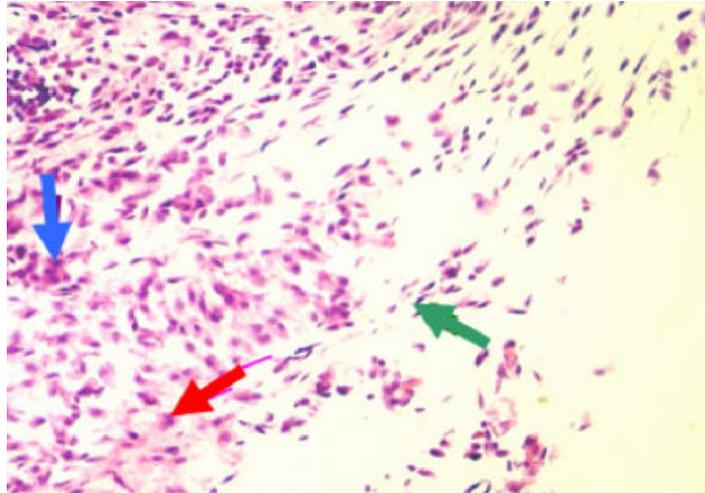
Observou-se nas lâminas dos dois materiais relativas a esse período a presença de tecido conjuntivo denso não modelado, com regiões de tecido conjuntivo frouxo, e também fibras colágenas. Além disso, vale destacar a presença de vasos sanguíneos congestos e de grande calibre. Nos espaços entre os grânulos houve um predomínio de fibroblastos em relação aos períodos anteriores, o que indicou a cicatrização da região ao redor dos grânulos, sugerindo haver a biocompatibilidade de ambos os materiais no

mais longo período de tempo. Verificou-se que os contornos dos grânulos da HA se mostraram mais definidos que os de ZnHA.

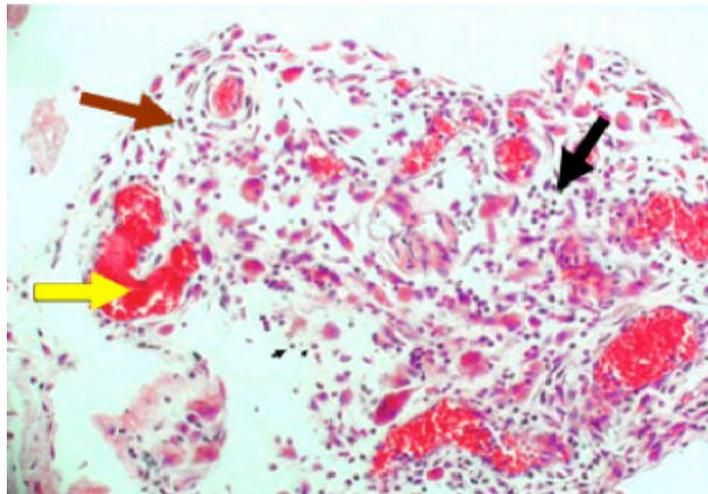
5.7.2.6 Fotomicrografias

As figuras 5.9 a 5.18 mostram as fotomicrografias obtidas dos grupos de cada período, para as lâminas produzidas com coloração de Hematoxilina-eosina (melhor coloração de células e núcleos) e de Tricrômio de Gomori (melhor coloração de fibras de tecido conjuntivo), tanto para os grânulos de HA quanto para os de ZnHA.

Período de 7 dias – HE



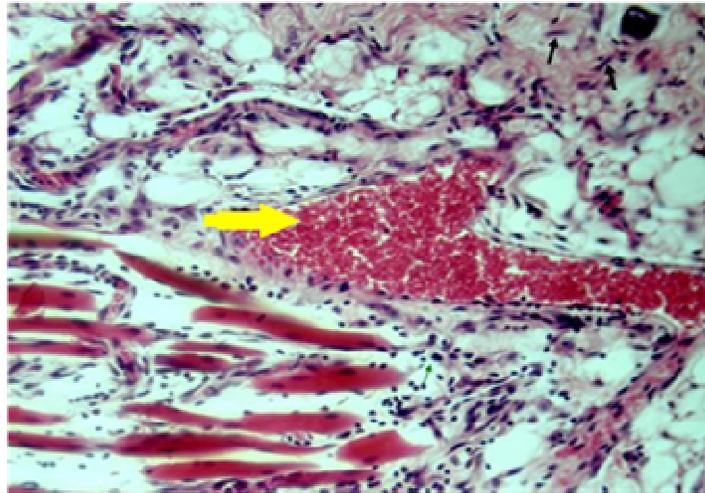
A



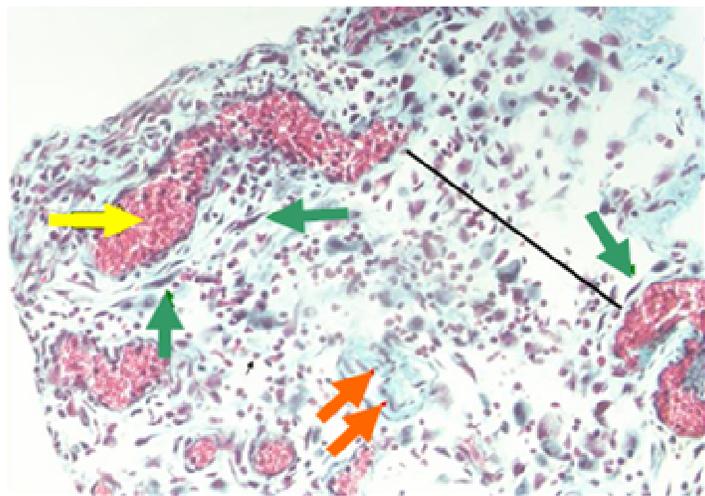
B

Figura 5.9 Fotomicrografias do período de 7 dias (HE). (A) HA, onde se observa a presença de fibroblastos (seta verde), macrófagos (seta vermelha) e célula gigante (seta azul); (B) ZnHA, com a presença de vasos sanguíneos (seta amarela), fibroblastos (seta marrom) e agranulócitos (seta preta). Aumento 40x (A e B).

Período de 7 dias – Gomori



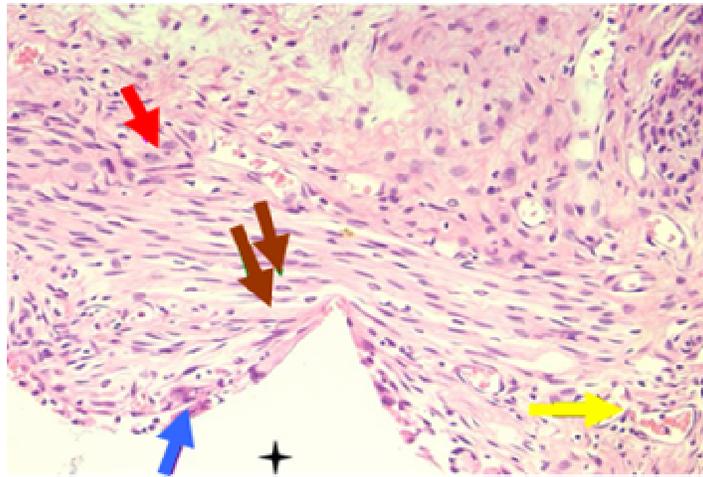
A



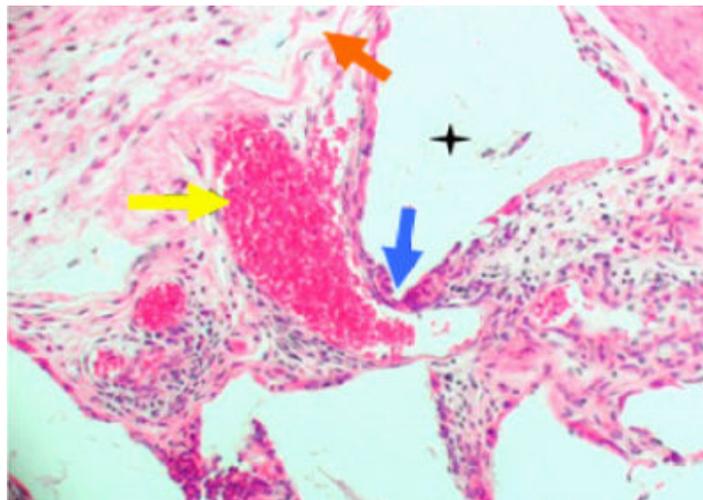
B

Figura 5.10 Fotomicrografias do período de 7 dias (Tricrômio de Gomori). (A) HA, detalhe de um grande vaso sanguíneo no tecido conjuntivo frouxo (seta amarela); (B) ZnHA, com vasos sanguíneos (seta amarela) sendo envolvidos por tecido conjuntivo frouxo (setas laranjas) com fibras pouco mais organizada, além de fibroblastos (setas verdes). Aumento de 40x (A e B).

Período de 14 dias – HE



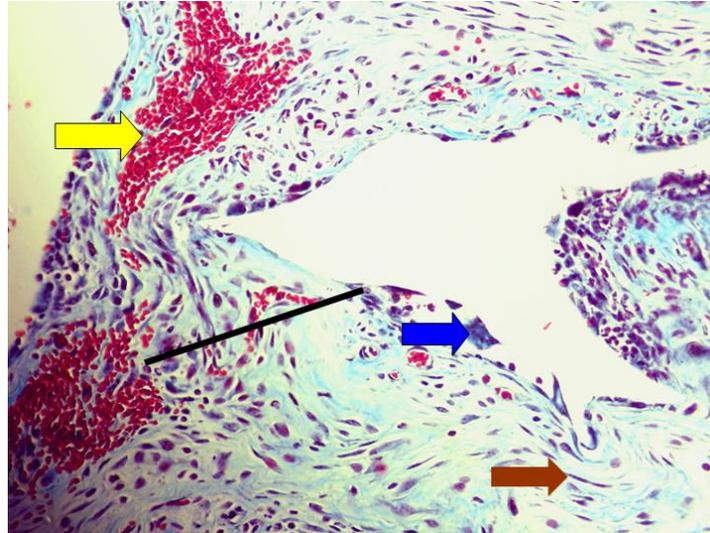
A



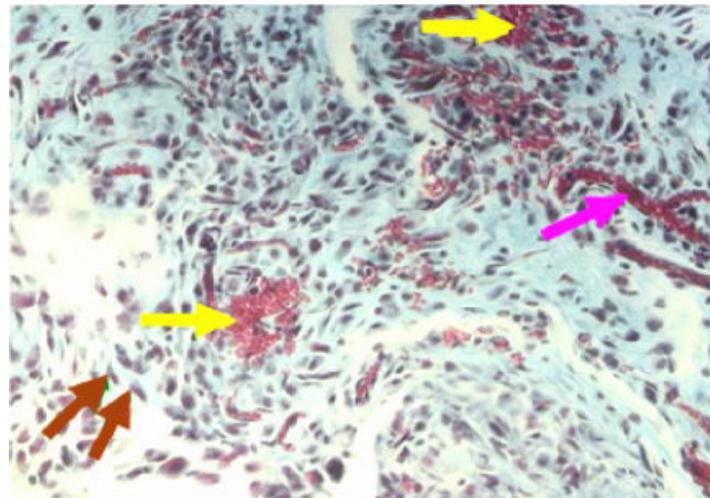
B

Figura 5.11 Fotomicrografias do período de 14 dias (HE). (A) HA, com a presença de fibroblastos (setas marrons), vaso sanguíneo (seta amarela), célula gigante (seta azul) em torno da região onde se localiza os grânulos, e macrófago (seta vermelha); (B) ZnHA, com a presença de células gigantes (seta azul) entre os grânulos (cruz preta) e vasos sanguíneos (seta amarela) sendo envolvidos por tecido conjuntivo frouxo (seta laranja). Aumento de 40x (A e B).

Período de 14 dias - Gomori



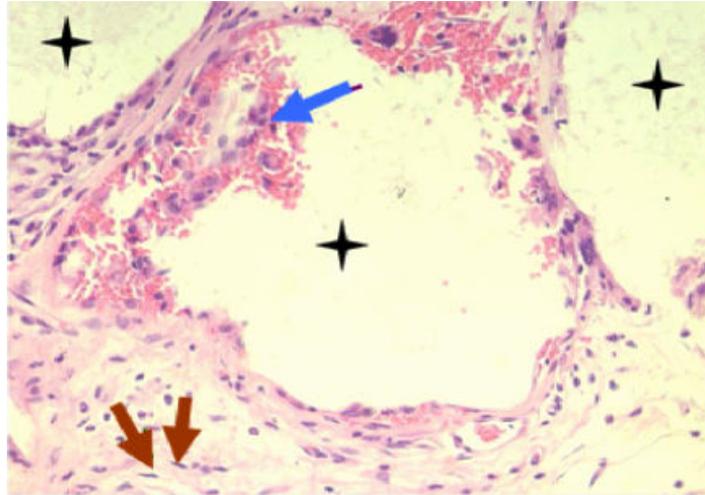
A



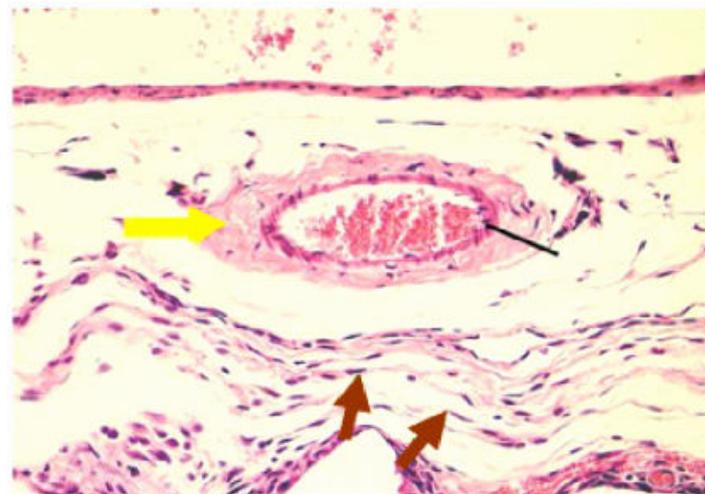
B

Figura 5.12 Fotomicrografias do período de 14 dias (Tricrômio de Gomori). (A) HA, mostrando vasos sanguíneos (seta amarela), fibroblastos (seta marrom) em tecido conjuntivo mais organizado (reta preta) e células gigantes (seta azul); (B) ZnHA, com vasos sanguíneos (setas amarelas), uma artéria (seta lilás), além de proliferação dos fibroblastos (setas marrons). Aumento de 40x (A e B).

Período de 21 dias – HE



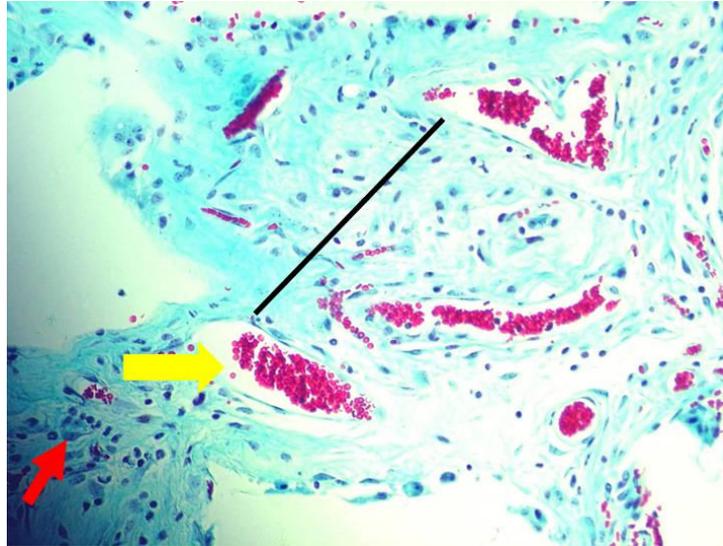
A



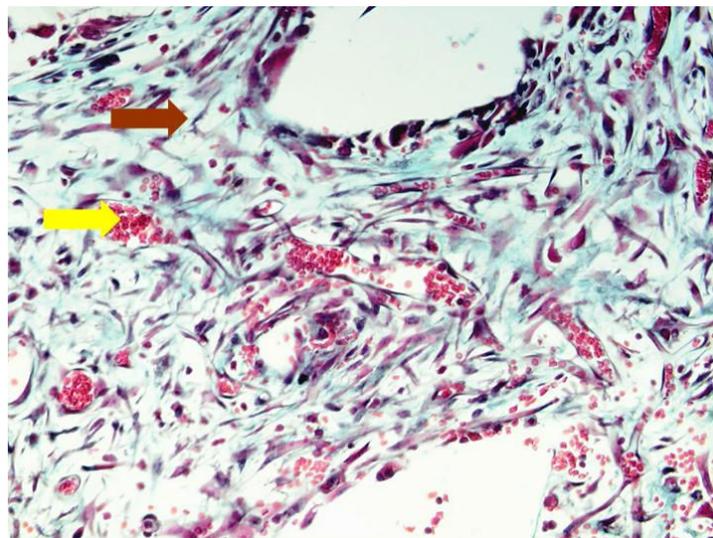
B

Figura 5.13 Fotomicrografias do período de 21 dias (HE). (A) HA, com a presença de célula gigante (seta azul) e fibroblastos (setas marrons) na região ao redor dos grânulos (cruz preta); (B) ZnHA, mostrando vaso sanguíneo (seta amarela), fibroblastos dispostos de maneira mais organizada (setas marrons), além de um vaso com sua parede e túnica (traço preto). Aumento de 40x (A e B).

Período de 21 dias - Gomori



A

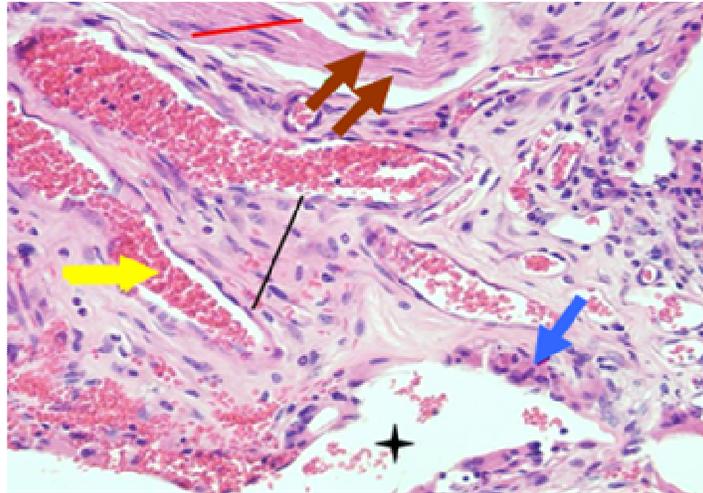


B

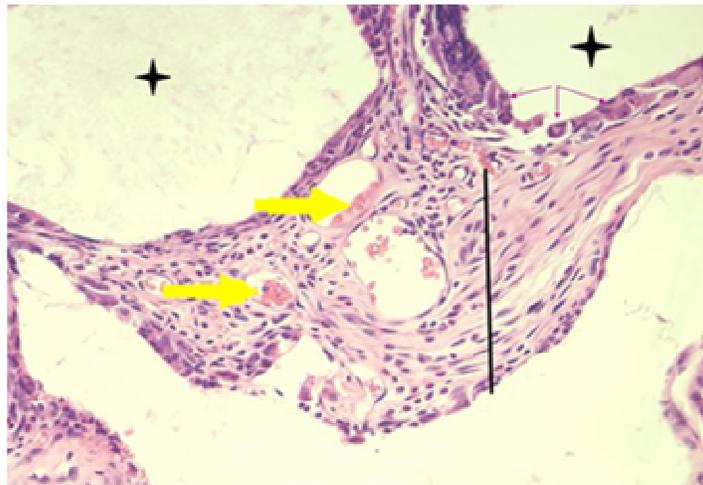
Figura 5.14 Fotomicrografias do período de 21 dias (Tricrômio de Gomori). HA (A) mostra a presença de um tecido conjuntivo mais organizado entre os grânulos (reta preta), presença de vaso sanguíneo de maior calibre (seta amarela) e macrófagos (seta vermelha); (B) ZnHA, presença de vaso (seta amarela) e fibroblasto (seta marrom).

Aumento de 40x (A e B).

Período de 28 dias – HE



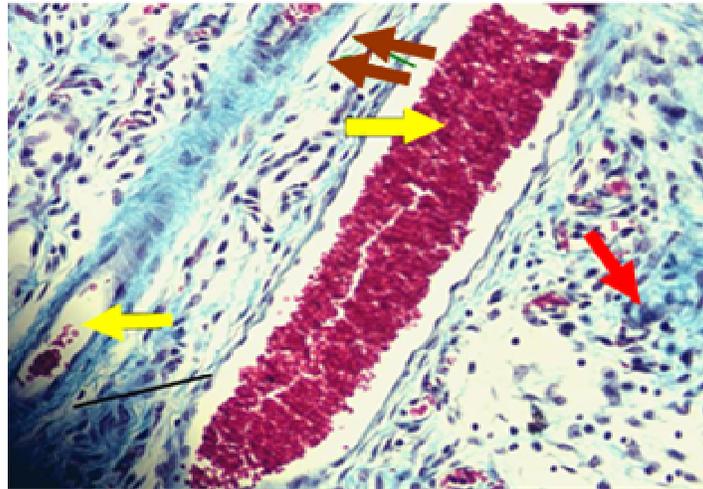
A



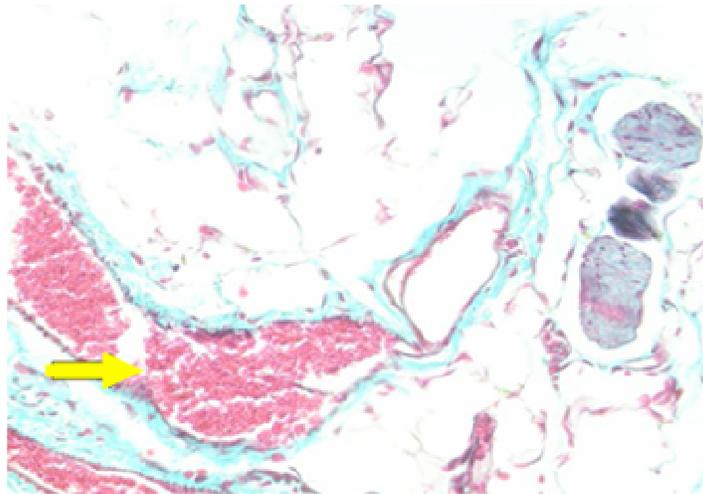
B

Figura 5.15 Fotomicrografias do período de 28 dias (HE). (A) HA, presença de vasos sangüíneos (seta amarela), organização as fibras do tecido conjuntivo (reta preta), tecido conjuntivo mais organizado (reta vermelha), região onde se encontravam os grânulos (cruz preta) com aglomerados de células em torno desses grânulos compôs principalmente de agranulócitos, célula gigante (setas azuis).; (B) ZnHA, com tecido conjuntivo mais organizado (reta preta) e vaso (seta amarela). Aumento de 40x (A e B).

Período de 28 dias – Gomori



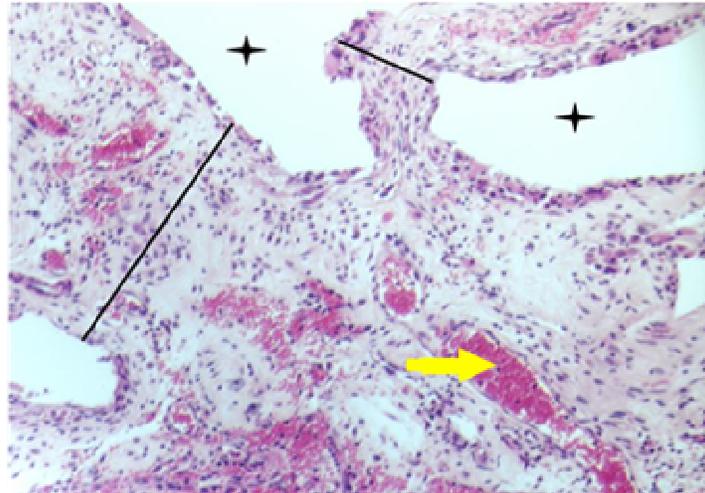
A



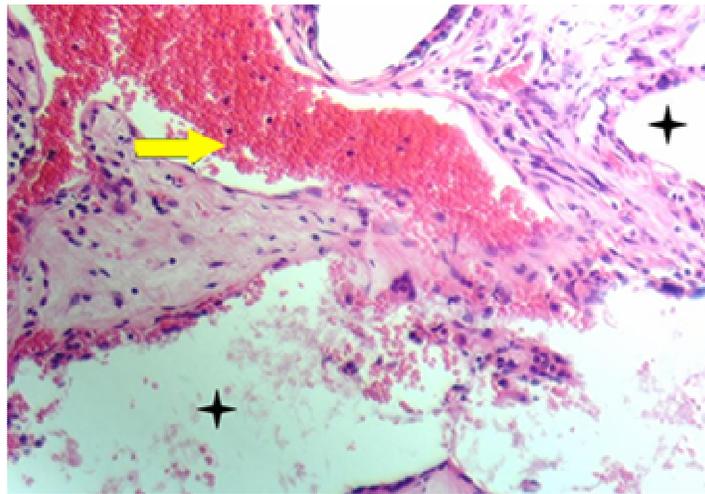
B

Figura 5.16 Fotomicrografias do período de 28 dias (Tricrômio de Gomori). (A) HA, pode-se observar vasos sanguíneos (setas amarelas), tecido conjuntivo denso modelado (reta preta) e macrófagos (setas vermelhas).; (B) ZnHA, observa-se a presença de um vaso sanguíneo de grande calibre. Aumento de 40x (A e B).

Período de 60 dias - HE



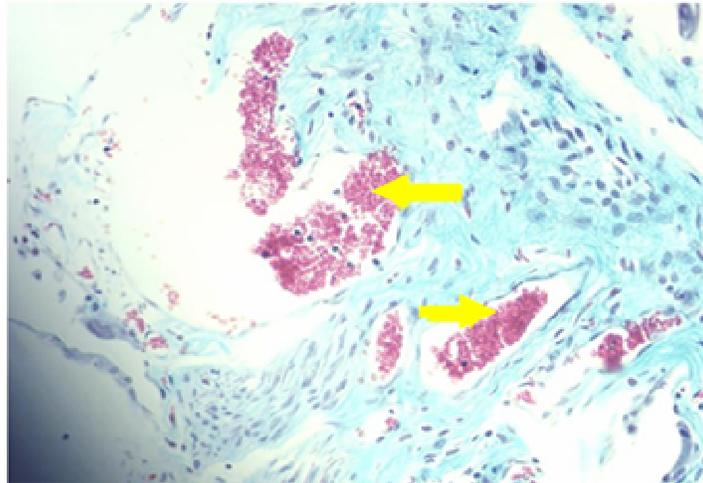
A



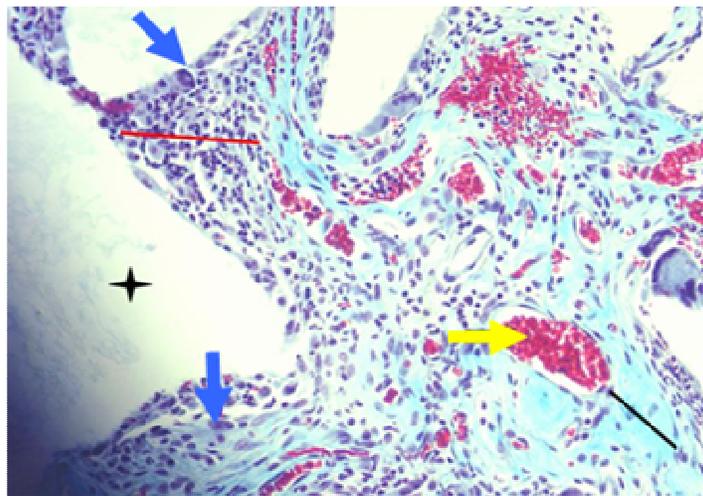
B

Figura 5.17 Fotomicrografias do período de 60 dias (HE). (A) HA, observam-se os vasos sanguíneos formados de grande calibre (seta amarela), os quais foram comuns a maior parte dos campos; grande espessura e organização das fibras (reta preta); (B) ZnHA, mostrando um enorme vaso sanguíneo (seta amarela), além de fibras organizadas entre os grânulos (cruz preta). Aumento de 40x (A e B).

Período de 60 dias – Gomori



A



B

Figura 5.18 Fotomicrografias do período de 60 dias (Tricrômio de Gomori). (A) HA, grande vaso (seta amarela), abundância de tecido conjuntivo ; (B) ZnHA, tecido conjuntivo mais organizado (reta vermelha) apresentando-se celularizado e apresentando célula gigante entre os grânulos (seta azul), além da presença de um tecido conjuntivo mais organizado composto de fibras colágenas (reta preta). Aumento de 40x (A e B).

Além das estruturas descritas anteriormente, cabe ressaltar que foi observada a presença de condrócitos nas lâminas ZnHA (Período de 7 dias) e HA (Período de 60 dias). Esse fato sugere a ocorrência de uma indução da mineralização pela presença dos materiais no tecido conjuntivo.

A figura 5.19 mostra a presença de arcabouços cartilagosos contendo condrócitos hipertróficos, que são células de fundamental importância para o crescimento longitudinal dos ossos (CARVALHO, 2005).

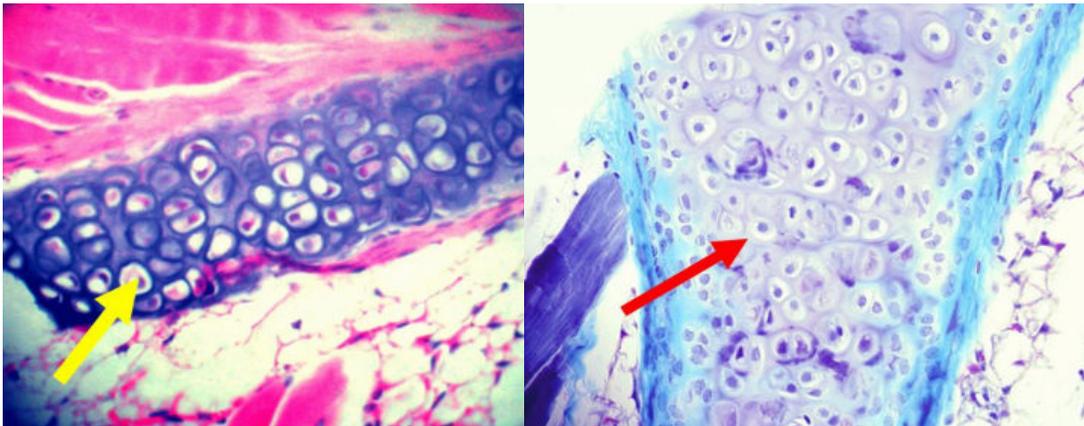


Figura 5.19 Fotomicrografias mostrando arcabouços contendo contrócitos de (A) ZnHA do período de 7 dias; (B) HÁ do período de 60 dias.

5.7.3 Análise Histomorfométrica

A análise histomorfométrica realizada neste estudo objetivou a quantificação de fibroblastos, granulócitos e agranulócitos, células gigantes e vasos sanguíneos. Os resultados globais estão resumidos nas Tabelas 5.4 e 5.5.

Considerando-se o efeito do tempo nos parâmetros avaliados em resposta aos biomateriais, podemos constatar que:

- 1) O número de agranulócitos em resposta à HA e ZnHA foi significativamente maior no período de 7 dias ($p < 0,001$, Análise de variância a um critério e teste de Bonferroni), mantendo-se constante nos períodos subsequentes; no confronto entre 7 x 28 dias (ZnHA), o valor de $p < 0,01$;
- 2) O número de granulócitos foi extremamente baixo (0,1%) no grupo HA, não havendo diferença significativa entre os períodos experimentais. No grupo ZnHA, o número de granulócitos nos períodos de 7 a 21 dias não são estatisticamente diferentes, porém, diminuem significativamente aos 28 dias ($p < 0,05$) e 60 dias ($p < 0,001$) em relação ao período inicial; como a diferença entre os desvios padrões foram significativas, foram utilizados o teste de Kruskal-Wallis e Múltiplas Comparações de Dunn.
- 3) A variação no número de células gigantes multinucleadas (CGM) no grupo HA, em relação ao período inicial, somente foi significativa em comparação ao período de 28 dias ($p < 0,001$); a diferença entre os SD foram significativas, portanto foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e Múltiplas Comparações de Dunn; para o grupo ZnHA, somente observou-se diferença significativa entre os períodos de 7 e 14 dias ($p < 0,05$, Análise de Variância e teste de Bonferroni).

Também foi possível avaliar o efeito do material (HA ou ZnHA) nos parâmetros escolhidos, descritos acima. A Figura 5.20, mostra que o tipo de material não afetou o recrutamento de agranulócitos, que correspondiam, ao longo dos períodos experimentais a cerca de 35 a 45% do total de células no tecido. É interessante destacar que a mobilização de granulócitos foi marginal (Figura 5.21), sendo menor que 0,1% do total de células no grupo tratado com HA. Esses dados em conjunto demonstram que o

processo inflamatório foi eminentemente crônico, com rara participação de neutrófilos (granulócitos) a partir de 7 dias. A intensa mobilização de monócitos e macrófagos (agranulócitos) é corroborada pelo grande número de células gigantes (Figura 5.22), caracterizando, então um processo inflamatório tipo corpo estranho, possivelmente estabelecido na tentativa de fagocitar as partículas.

Ao longo do processo, observamos que a integridade das partículas parece ser pouco afetada, exceto pela degradação mais evidente da ZnHA. Em consequência, estabelece-se de maneira clara e inequívoca um processo de fibrosamento do tecido conjuntivo frouxo que inicialmente envolvia as partículas e, também, e a formação de uma cápsula fibrosa ao redor dos materiais. Esse processo é coincidente com a intensa proliferação fibroblástica, mais notadamente no período de 14 dias, mantendo-se constante até o final do experimento (Figura 5.23). A intensa atividade metabólica é mantida por um intrincado sistema de vasos sanguíneos que tem sua máxima formação observada também aos 14 dias e mantendo-se até o final do estudo (Figura 5.24). É importante destacar que em praticamente em todas as amostras analisadas observou-se um grande número de vasos congestionados, com células mononucleares em franco processo de diapedese, em resposta ao estímulo dos materiais.

A natureza das células gigantes mononucleares recrutadas nos enxertos subcutâneos de partículas mineralizadas é ainda motivo de controvérsia na literatura. KELLY e SCHNEIDER, 1991 implantaram matriz desmineralizada, mineralizada e a combinação de ambas, na região subcutânea dorsal de ratos adultos jovens. Eles verificaram nos implantes mineralizados a presença de células gigantes mononucleares que não possuíam atividade fosfatase tartarato resistente (TRAP) nem morfologia similar a osteoclastos. No implante de matriz desmineralizada, a maioria das células gigantes mononucleares demonstraram uma expressão significativa da TRAP e morfologia similar a osteoclastos, enquanto que a implantação combinada dos materiais proporcionou a presença desses dois tipos de células gigantes mononucleares.

Acredita-se hoje que existam dois tipos de células multinucleadas ao redor do implante de partículas minerais de osso desvitalizado, um tipo com aspecto microscópico e estrutural típico de células gigantes mononucleares com evidência de degradação óssea, e um outro tipo, em menor quantidade, e com aparência microscópica de osteoclastos, mas sem a borda em escova característica. Para esses autores a

reabsorção pode ocorrer tanto por células gigantes mononucleares como por osteoclastos. No presente estudo, utilizando microscopia óptica, não notamos borda em escova nas células gigante mononucleares em volta dos materiais implantados, em qualquer período experimental. A ausência de lacunas de Howship e a aparente regularidade de contorno das partículas sugerem que as células gigante mononucleares observadas não são do tipo osteoclasto. Resultados semelhantes foram obtidos quando da implantação de xenoinxertos em subcutâneo de ratos, resultando na formação de granuloma tipo corpo estranho (IGNATIUS, 2001). Saliente-se, no entanto, que a presença destas células ocorre numa tentativa do organismo de reabsorver o material e não implica, necessariamente, na falta de biocompatibilidade do material.

Tabela 5.4 Evolução temporal do número de Agranulócitos, Granulócitos e Células Gigantes em resposta à implantação de HA e ZnHA (média / desvio padrão)

Parâmetros Avaliados																
Períodos (Dias)	Agranulócito						Granulócito						CGM [†]			
	HA		ZnHA		HA		ZnHA		HA		ZnHA		HA		ZnHA	
	Média	(SD)	Média	(SD)	Média	(SD)	Média	(SD)	Média	(SD)	Média	(SD)	Média	(SD)	Média	(SD)
7	0,602	0,106	0,609	0,079	0,000	0,000	0,036	0,003	0,017	0,016	0,069	0,059				
14	0,369	0,055	0,353	0,055	0,001	0,001	0,019	0,019	0,159	0,088	0,181	0,072				
21	0,369	0,055	0,387	0,074	0,000	0,000	0,012	0,007	0,157	0,017	0,136	0,051				
28	0,324	0,038	0,399	0,096	0,000	0,000	0,004	0,005	0,252	0,041	0,094	0,045				
60	0,351	0,084	0,316	0,021	0,000	0,000	0,000	0,000	0,079	0,072	0,166	0,019				

Tabela 5.5 Evolução temporal do número de Fibroblastos e Vasos Sangüíneos em resposta à implantação de HA e ZnHA (média / desvio padrão)

Períodos (Dias)	Parâmetros Avaliados							
	Fibroblasto				Vaso Sangüíneo			
	HA		ZnHA		HA		ZnHA	
	Média	(SD)	Média	(SD)	Média	(SD)	Média	(SD)
7	0,165	0,074	0,088	0,026	2,837	1,799	3,347	2,209
14	0,286	0,069	0,147	0,039	4,179	1,501	8,920	4,057
21	0,283	0,033	0,235	0,062	6,680	1,811	8,760	2,367
28	0,250	0,025	0,295	0,082	6,760	2,905	5,493	2,153
60	0,320	0,062	0,314	0,035	7,562	3,355	8,547	2,254

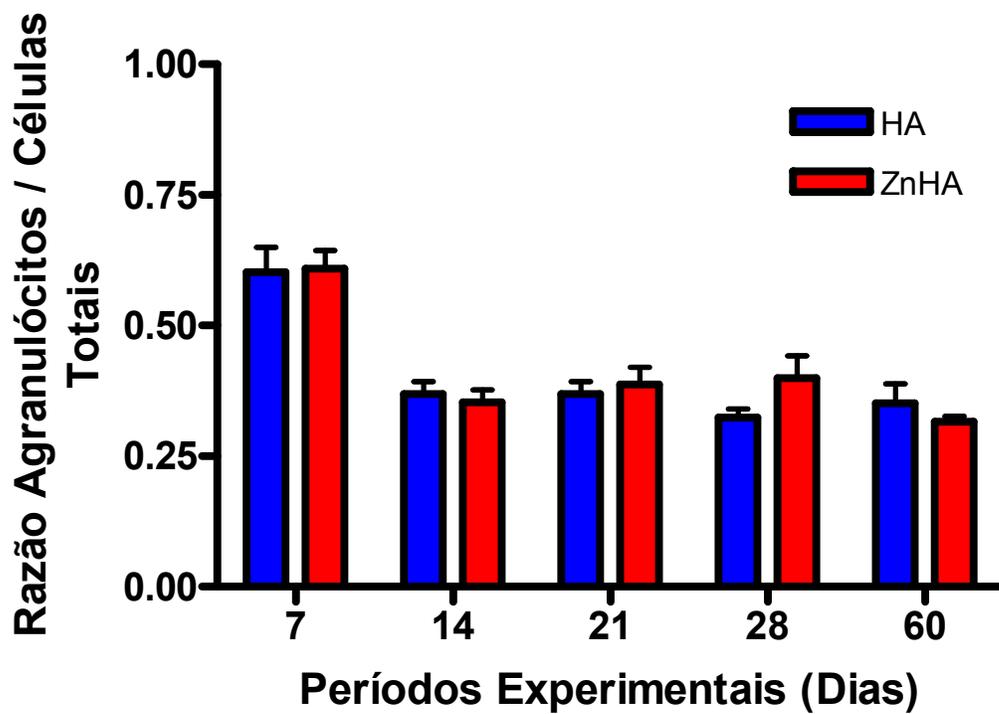


Figura 5.20. Gráfico da razão entre o número de agranulócitos e células totais em função dos períodos experimentais em resposta à HA e ZnHA. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

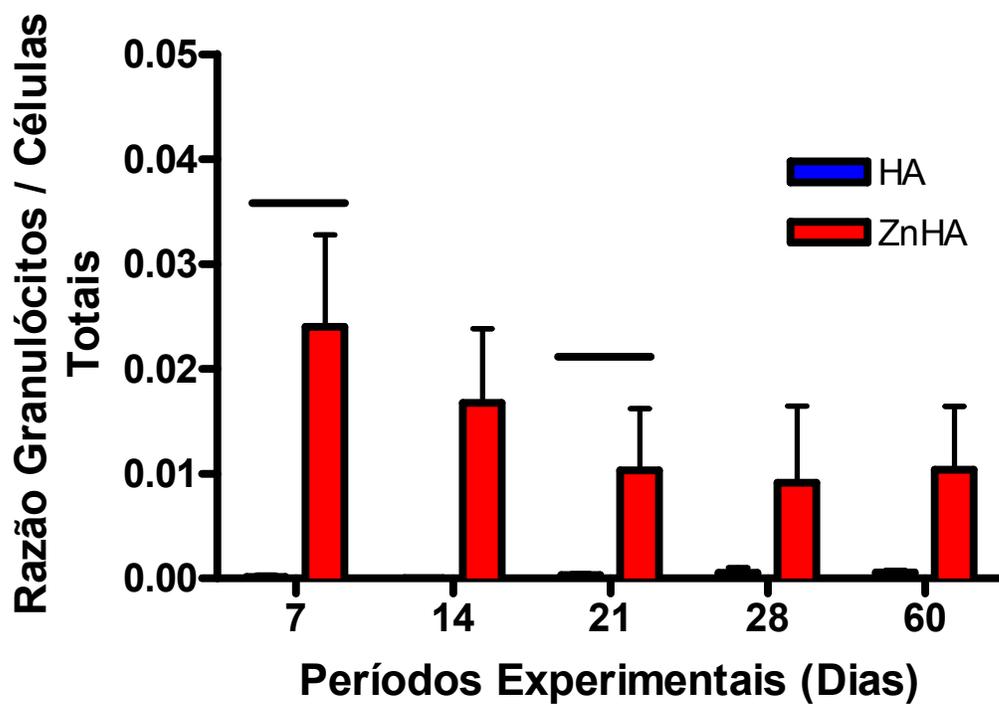


Figura 5.21. Gráfico da razão entre o número de granulócitos e células totais em função dos períodos experimentais em resposta à HA e ZnHA. As barras indicam diferença significativa entre os materiais nos períodos de 7 ($p < 0,01$) e 21 dias ($p < 0,05$).

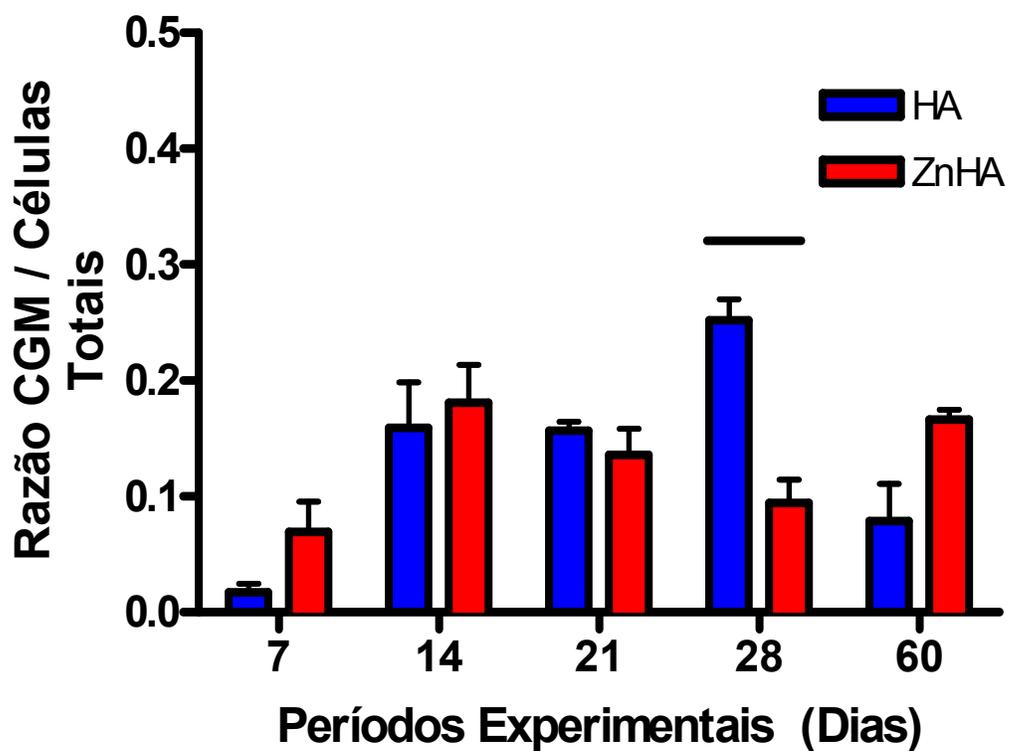


Figura 5.22. Gráfico da razão entre o número de células gigantes multinucleadas e células totais em função dos períodos experimentais em resposta à HA e ZnHA. A barra indica diferença significativa entre os materiais no período de 28 dias ($p < 0,001$).

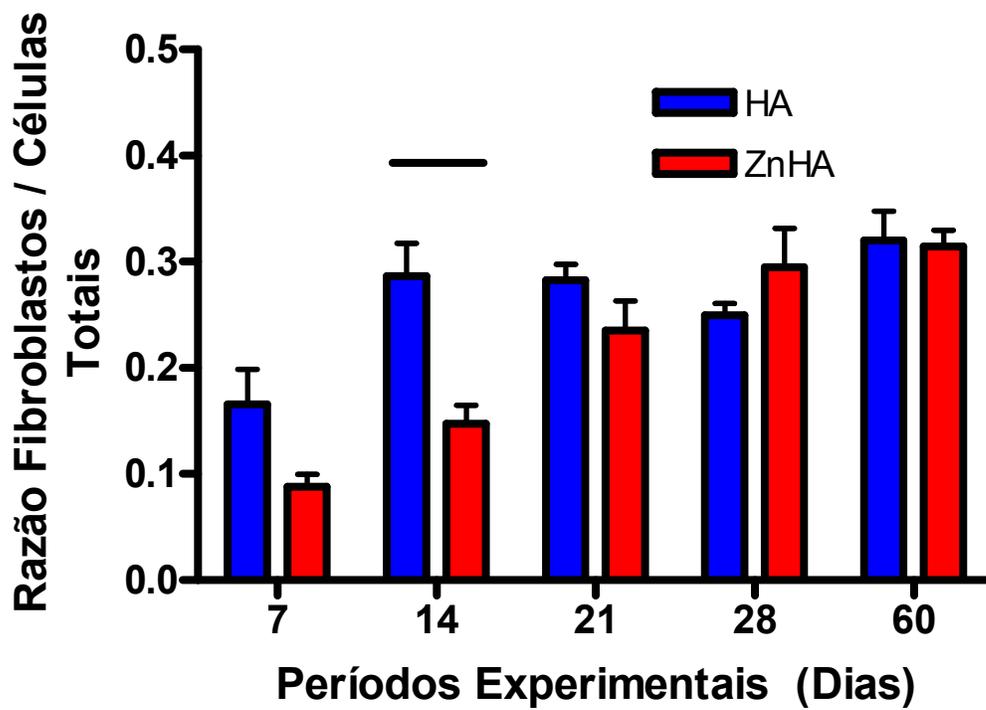


Figura 5.23. Gráfico da razão entre o número de fibroblastos e células totais em função dos períodos experimentais em resposta à HA e ZnHA. A barra indica diferença significativa entre os materiais no período de 14 dias ($p < 0,001$).

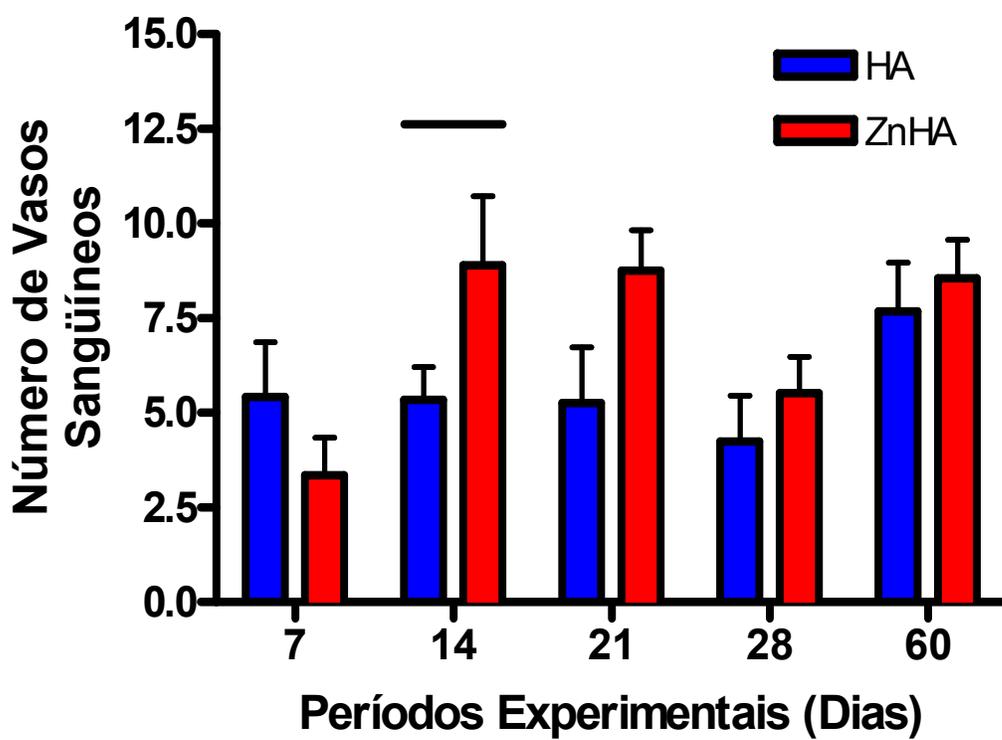


Figura 5.24. Gráfico da razão entre o número de vasos sangüíneos em função dos períodos experimentais em resposta à HA e ZnHA. A barra indica diferença significativa entre os materiais no período de 14 dias ($p < 0,05$).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A caracterização físico-química e morfológica de materiais para uso em enxertos é importante, pois variações na composição e no processamento desses materiais alteram suas propriedades.

A escolha da temperatura de calcinação para a produção de grânulos por compactação uniaxial seguido de calcinação é fundamental para definir as propriedades físico-químicas resultantes. Temperaturas mais elevadas geram grânulos mais resistentes, mas aumentam também a possibilidade de decomposição da HA em outras fases.

Foram testadas duas temperaturas: 400⁰C e 1200⁰C, e optou-se pela última no intuito de se ter integridade estrutural e, no caso da ZnHa 5%, ter a formação de ZnTCP, que a princípio seria uma fase mais solúvel.

Houve uma aparente contradição entre os resultados de degradação *in vitro*, citotoxicidade *in vitro* e análise descritiva *in vivo*.

Contrariando a expectativa de uma maior dissolução, observou-se que a ZnHA 5% se dissolveu tanto ou menos que a HA quando exposta ao -HCl. A citotoxicidade *in vitro* indicou que deve haver um limite de Zn no meio, a partir do qual o efeito benéfico sobre a proliferação celular se inverte, tornando-o tóxico. As imagens das lâminas indicam que, provavelmente, a liberação *in vivo* se situou bastante abaixo dos níveis de toxicidade. Ao contrário, na amostra com grânulos de ZnHA, vasos com grande calibre, artérias e fibras colágenas foram identificadas após 28 dias, indicando a biocompatibilidade do material.

A cicatrização do tecido é mais evidente nos períodos de 28 e 60 dias, tanto nos grânulos de HA quanto de ZnHA. Não se observou inflamação aguda desde o período de 7 dias, mas sim o estabelecimento de um processo inflamatório crônico, rico em células gigantes, compatível com granuloma de células gigantes tipo corpo estranho, possivelmente engajadas na tentativa de fagocitar as partículas dos materiais, já no período de 7 dias.

7 CONCLUSÃO

O processo de prensagem uniaxial a frio de pós, seguido de calcinação e trituração, é um processo satisfatório para a obtenção de HA ou ZnHA granulares.

A temperatura de calcinação afeta as características físico-químicas dos grânulos e a resistência mecânica. Com uma temperatura de 400°C a resistência mecânica é baixa, mas não ocorre decomposição de fases. Já a calcinação a 1200°C induziu a transformação da HA em TCP especialmente nos grânulos produzidos a partir da ZnHA 5%.

As diferenças nas fases presentes nos grânulos calcinados a 1200°C não se refletiram na perda de massa do teste de degradação segundo a norma ISO 10993-9. Entretanto, quando testado a desmineralização dos grânulos presentes nas peças dos camundongos mortos, os grânulos de ZnHA desmineralizaram mais rápido que os de HA.

O efeito do Zn como elemento citotóxico mostrou-se dose-dependente, mas não foi observado nos ensaios *in vivo*.

A biocompatibilidade dos materiais pode ser comprovada pela ausência de processo inflamatório agudo, necrose ou destruição tecidual. A não degradação e bioabsorção dos materiais promoveram a formação de um reparo por cicatrização, com fibrosamento do tecido conjuntivo que envolvia as partículas. O recrutamento de células mononucleares e a formação de células gigantes multinucleadas evidenciaram um granuloma tipo corpo estranho como esperado para o tipo de material avaliado. Não se observou diferenças significativas quanto à biocompatibilidade da HA e ZnHA, sugerindo que as variações físico-químicas observadas não promoveram resposta biológica exacerbadas.

Sugestões de trabalhos futuros:

Avaliar o comportamento desses grânulos durante o reparo ósseo, avaliar as propriedades da ZnHA calcinada em temperatura inferior à responsável pela degradação da ZnHA. Testar a biocompatibilidade da ZnHA em diferentes formatos, assim como condições diferentes de concentrações, temperatura etc.

8 Referências Bibliográficas

ANSELME, K., 2000, "Osteoblast adhesion on biomaterials", *Biomaterials*, v.21, pp. 667-681.

BATTEGAY, E.J, RAINES, E.W., SEIFERT, R.A, et al., 1990, "TGF-beta induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop", *Cell*, vol. 63, no. 3 (Nov), pp. 515-524.

BALESTRINI, J. L., BILLIAR, K. L., 2006 "Equibiaxial cyclic stretch stimulates fibroblasts to rapidly remodel fibrin" *Journal of Biomechanics*, In Press, Corrected Proff.

BAUER, T., MUSCHLER, G.F., 2000, "Bone graft materials", In: *Clinical Orthopedics and Related Research*, no. 371, pp. 10-27.

BIGI, A., FORESTI, E., GANDOLFI, M., et al., 1995, "Inhibiting effect of Zinc on hydroxyapatite crystallization", *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol. 58, pp. 49-58.

BIOMET, 2004, *2004 Biomet Annual Report*, Biomet Inc., Warsaw, Indiana, USA

BURGER, 2005, "A novel RING-type ubiquitin ligase breast cancer-associated gene 2 correlates with outcome in invasive breast cancer", *Cancer Res.*, v. 65(22), pp. 10401-12.

BÜCHTER, A., KLEINHEIN, J., et al., 2005, "Biological and biomechanical evaluation of bone remodelling and implant stability after using na osteotome technique", *Clin.Oral Impl.Res.*, v.16, pp. 1-8.

CARVALHO, P.S.P., BASSIA, A.P.F., VIOLIN, L.A., 2004, "Revisão e proposta de nomenclatura para os biomateriais", *Implant news*, v.1, n^o 3 (Mai/Jun), pp. 255-259.

CHANG, B.S., LEE, C.K., HONG, K.S., et al., 2000, "Osteoblastic cell attachment to hydroxyapatite – coated implant surfaces *in vitro*", *Int. J. Oral Maxillofacial Implants*, vol. 14, pp. 239-247.

CONZ, M.B, SOARES, G.A., GRANJEIRO, J.M.N., 2005, "Physicochemical characterization of six comercial hydroxyapatites for medical-dental applications as bone graft", *J. Appl. Oral Sci.*, vol. 13, no. 2, pp. 136-140.

- COSTA, A.M., 2004, *Preparo e caracterização de fosfatos de cálcio dopados com zinco para aplicações médico-odontológicas*. Dissertação de M.Sc., PEMM/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- DAVIES, J.E., BALDAN, N., 1997, "Scanning Electron Microscopy of the bone-bioactive implant interface.", *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 36, pp. 429-440.
- EGGLI, P.S., MILER, W., SHENK, R.K., 1988, "Porous Hydroxyapatite and Tricalcium Phosphate Cylinders with two different pore size ranges implanted in the Cancellous Bone in rabbits", *Clin. Orthop.*, Vol.232, pp. 127-137.
- ESTRELA, C., 2001, *Metodologia Científica-ensino e pesquisa em Odontologia*. São Paulo, ed. Artes Médicas.
- ELLIOT, J.C., 1994, *Structure and chemistry of the apatite and other calcium orthophosphates*, Amsterdam, Ed. Elsevier.
- FERNANDEZ, E., GIL, F.J, GINEBRA, M.P., et al., 1999, "Calcium phosphate bone cements for clinical applications. Part II: Precipitate formation during setting reactions.", *J.Mater.Sci.Mater.Med*, v.10, pp.169-176.
- FIGUEIRAS, M.R.T., 1993, *Produção de materiais cerâmicos bioativos e sua caracterização como biomaterial para implante ósseo*. Tese de doutorado, PEMM/COPPE//UFRJ Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- FLEET, M.E., LIU, X., 2005, "Local structure of channel ions in carbonate apatite", *Biomaterials*, Vol. 26, pp. 7548-7554.
- FRESHNEY, R.I., 2000, *Culture of animal cells: a manual of basic techniques*. 4th ed., New York, Wiley-Liss.
- FROST, H. M., 2000, "The Utah paradigm of skeletal physiology: An overview of its insights for bone, cartilage and collagenous tissue organs", *J Bone Miner Metab*, v.18, pp. 305-316.
- FULMER, M.T., ISON, I.C., HANKERMAYER, C.R., et al., 2002, "Measurements of the solubilities and dissolution rates of several hydroxyapatites", *Biomaterials*, v. 23, pp. 751-755.

- GARG, A.K., 1999, "Grafting Materials in Repair and Restoration". In: Tissue Engineering-Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics. Cap. 5, Quintessence Books.
- GARRIDO, A. C et al, 2004, "Viabilidade tecidual no uso de biocerâmica de fosfato de cálcio em reconstrução de falhas ósseas", COLAOB, 3º Congresso Latino Americano de Órgãos e Artificiais e Biomateriais.
- GROTENDORST, G.R, 1997 "Connective tissue growth factor: a mediator of TGF- β Action on Fibroblasts.", Cytokine and Growth Factor Reviews, vol. 8, number 3, pp.171-179, Elsevier Science.
- GRODZINSKY, A. J.,1983 "Eletromechanical and physicochemical properties of connective tissue" Crit Rev. Biomed. Eng.; 9(2), 133-99.
- GUYOT, C., LEPREUX, S., COMBE, C. Et al , 2006 "Hepatic fibrosis and cirrosis: The (myo) fibroblastic cell subpopulations involved" The international Journal of Biochemistry & Cell Biology, Vol. 38, Issue 2, pp. 135-151.
- HENCH, L.L., 1980, "Special report: the interfacial behaviour of biomaterials", *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 14, pp. 803-811.
- HENCH, L.L., 1998, "Bioceramics", *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 81, pp. 1705-1728.
- HENCH, L.L., SPLINTER, R.J., ALLEN, W.C., 1971, "Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. Part I.", *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 2, pp. 117-141.
- HENCH, L.L., WILSON, J., 1993, *An introduction to bioceramics*, chp. 1, Advances series in ceramics, vol. 1, London, World Scientific.
- HILL, T.L, 1996, "Adsorption from a one-dimensional lattice gás and the Brunauer-Emmet- Teller equation", *Chemistry*, vol. 93, pp.14328-14332.
- HOCHMAN, B., FERREIRA, L.M., BOAS, F.C.V., 2003, "Integração do enxerto heterólogo de pele humana no subepitélio da bolsa jugal do hamster (*Mesocricetus auratus*)", *Acta Cir. Bras.*, vol. 18, n. 5.

- IGNATIUS, A.A.; SCHIMIDT, C., KASPAR, D., CLAES, L.E., 2001, "In vitro biocompatibility of resorbable experimental glass ceramics for bone substitutes". *Journal Biomed. Mater. Res.* Jun 5, 55 (3), pp. 285-94.
- IKEUCHI, M., ITO, A., DOHI, Y., OHGUSHI, H., et al., 2003, "Osteogenic differentiation of cultured rat and human bone marrow cells on the surface of zinc-releasing calcium phosphate ceramics.
- IMAZATO, S., TARUMI, H., EBI, N., EBISU, S., 2000, "Cytotoxic effects of composite restorations employing self-etching primers or experimental antibacterial primers. *Journal Dent.* Vol 28 (1), pp. 61-7.
- ISHIKAWA, K., MIYAMOTO, Y., TOH, T., et al., 2002, "Fabrication of Zn containing apatite cement and its initial evaluation using human osteoblastic cells.", *Biomaterials*, v. 23, pp. 423-428.
- ITO, A., KAWAMURA, H., OTSUKA, M., et al., 2002, "Zinc-releasing calcium phosphate for stimulating bone formation", *Materials Science and Engineering*, C22, pp.21-25.
- ITO, A., OTSUKA, M., KAWAMURA, H., et al., 2005, "Zinc-containing tricalcium phosphate and related materials for promoting bone formation", *Current Applied Physics*, v. 5, issue 5 (July), pp. 402-406.
- JARCHO, M., 1981, "Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics", *Clinical Orthop. Relat. Res.*, 157, pp.259-278.
- JESUS, C.A.G., 2001, *Balanço Mineral Brasileiro*, Engenharia Metalúrgica do 3 Distrito do DNPM-MG.
- JUNQUEIRA L.C., CARNEIRO, J., 2004, *Histologia Básica*, 10^a ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- KAWACHI, E.Y., BERTRAN, C.A., DOS REIS, R.R., ALVES, O.L., 2000, "Biocerâmicas: Tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar", *Química Nova*, 23(4), pp. 518-522.

KAWAMURA, H., ITO, A., MIYAKAWA, S., LAYROLLE, P., et al., 2000, "Stimulatory effect of zinc-releasing calcium phosphate implant on bone formation in rabbit femora.", *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 50, pp. 184-190.

KEISER, K., JOHNSON, C.C., TIPTON, D.A., 2000, "Cytotoxicity of Mineral Trioxide Aggregate using human periodontal ligament fibroblasts". *J. End. Endodontics*, 26 (5), pp. 288-291.

KELLY, J.D., SCHNEIDER, G. B., 1991 "Morphological and histochemical comparison of cells elicited by ectopic bone implants and tibial osteoclasts". *Am. J. Anat.*, Vol 192, n.3, pp. 45-54.

LANGSTAFF, S., SAYER, M., SMITH, T.J.N., PUGH, S.M., 2001, "Resorbable bioceramics on based stabilized calcium phosphates. Part II: evaluation of biological response", *Biomaterials*, vol. 22, pp. 135-150.

LEGEROS, R.Z., 1991, *Calcium phosphates in oral biology and medicine*, chp. 15, Monographs in oral science, San Francisco, Karger Basel.

LEGEROS, R.Z., KIJKOWSKA R., BAUTISTA, C., LE GEROS, J.P., 1995, "Synergistic effect of magnesium and carbonate on properties of biological and synthetic apatites", *Connect Tissue Res.*, 33(1-3):203-9.

LEGEROS, R.Z., TAHERI, M.H., QUIROLGICO, G.B., LEGEROS, J.P., 1980, "Formation and stability of apatites: Effects of some cationic substituants", In: *Proceedings of Intern. Cong. Phosphorus Compounds*, pp. 89-103, Boston.

LIN, F.H., HON, M.H., 1989, "High strength bioglass ceramic containing $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ", *J. Austr. Ceram. Soc.*, 25 (1) pp. 41-49.

LINDHE, J., KARRING, T., LANG, N.P., 2005, *Tratado de periodontia clínica e implantologia oral*, 4. edição, São Paulo, Guanabara Koogan.

LORENZI, T.F., 2006, *Atlas de Hematologia/ Clínica Hematológica Ilustrada*, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan,.

- LYGRE, H., MOE, G., SOLHEIM, E., GJERDET, N.R., 1995, "Biologic testing of leachable aromatic compounds from denture base materials", *Acta Odont. Scand.*, vol. 53, n. 6, pp. 397-401.
- MACDONALD, R. S., 2000, "The role of Zinc in growth and cell proliferation", *J. Nutr.*, 130 (May), (5S Suppl):1500S-8S .
- MARQUES, A.P, REIS, R.L., HUNT, J.A., 2002, "The biocompatibility of novel starch-based polymers and composites: in vitro studies. *Biomaterials*, vol 23 (6):1471-8.
- MCHALE, J.M, AUROUX, A., PERROTTA, A.J., NAVROTSKY, A., 1997, "Surface energies and thermodynamic phase stability in nanocrystalline aluminas", *Science*, vol. 227, n^o 5327 (Aug), pp. 788-791.
- MEYER, U., BUCHTER, A., NAZER, N., WIESMANN, H.P., 2005, "Design and performance of a bioreactor system for mechanically promoted three-dimensional tissue engineering.", *Br. J Oral Maxillofac Surg.*, v. 15, pp.
- MEYER, U., BÜCHTER, A., WIESMANN, U., JOO, U., 2005, "Basic reactions of osteoblasts on structured material surfaces.", *European Cells and Materials*, vol.9, pp. 39-49
- MILLER A., 2002, "Revision of the ISO and radiation sterilization standards", *Radiation Physics and Chemistry*, v. 63, pp.665-667.
- MISCH. C.C., 2004, *Dental Implants prosthetics*, São Paulo, Ed. Esvier.
- MIYAJI, F., KONO, Y., SUYAMA, Y., 2005, "Formation and structure of zinc-substituted calcium hydroxyapatite", *Materials Research Bulletin*, vol. 40, no. 2, pp. 209-220.
- MOONGA, B.S, DEMPSTER, D.W., 1995, "Zinc is a potent inhibitor os osteoclastic boné resorption *in vitro*", *J. Bone Miner Res.*, v. 10, pp. 453-457.
- MOSSER, G., ANGLO, A., HELARY, C. et al, 2005, " Dense tissue-like collagen matrices formed in cell-free conditions" *Matrix Biology*. In press, Corrected proof.

MRG, 2004, *Latin America market for orthopedic devices*, Millenium Research Group, Toronto, Canada.

NAPOLITANO, B.A., MARTINS, A.F, 2004, “Compósitos de Borracha Natural ou Policloropreno e Celulose II : Influência do Tamanho de Partículas”, *Polímeros: Ciências e Tecnologia*, vol.14, nº 4, p. 223-229.

NOVAES JÚNIOR, A.B., TABA JR., M., PONTES, C.C., 2002, “Recursos e soluções em implantes - Biomateriais em regeneração”. In: CARDOSO, R.J.A., GONÇALVES, E.A.N., *Odontologia*, vol. 5, São Paulo, Artes Médicas.

OEMAR, B. S., 1997 “Connective Tissue Growth Factor”, *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*; vol. 17, 1483-1489.

OLA, B., EVENSEN, O., 2006 “ Inflammatory cells of teleostean fish: A review focusing on mast cells/eosinophilic granule cells and rodlet cells.” *Fish & Shellfish Immunology*, Vol. 20, pp. 192-208.

OLIVEIRA, A.M, 2004, “Decomposição do NO sobre Cu suportado em zeólitas”, *Quím. Nova*, vol.27, nº2, pp. 226-230.

OLIVEIRA, J.F, 2003, *Efeito dos parâmetros de Processamento nas Características de Cerâmicas Porosas à Base de Fosfato de Cálcio para Aplicação em Engenharia Óssea*, Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

OMOTEYAMA, K., IKEDA, H., IMAKI, J., SAKAI, M., 2006 “Activation of connective tissue growth factor gene by the c-Maf and Lc-Maf transcription factors”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 339, 1989-1097.

ÖNAL, M., SARIKAYA, Y, 2001, “Investigation of the Microporous and Mesoporous Structures of the Resadiye (Tokat/Turkey) Bentonite and its Fractions”, *Turk J. Chem*, v. 25, pp. 241-249.

PEÑA, J., VALLET-REGI, M., 2003, “Hidroxyapatite, tricalcium phosphat and biphasic materials prepared by a liquid mix technique”, *J. Of European Ceramic Society*, 23, 1687-1696.

- PEATTIE, R. A., RIEKE, E. R. HEWETT, E. M. FISHER, R. J. 2006 “ Dual growth factor-induced angiogenesis *in vivo* using hyaluronan hydrogel implants.”, *Biomaterials*, Vol. 27, pp. 1868-1875.
- PIENKOWSKI, D., POLLACK, S.R., 1983, “The origin of stress-generated potentials in fluid-saturated bone.”, *J. Orthop. Res.*, v. 1, pp. 30-41.
- PITIC, L., MARKOV, J., JEREMIC, D., DJUKANOVIC, D., 2003 “Investigation of systemic toxicity and local tissue tolerance of a new microporous implant”, Vol. 144, Supplement, p. 90.
- PRADO DA SILVA, M.H., LEMOS, A.F., GIBSON, et al., J.D., 2002, “Porous glass reinforced hydroxyapatite materials produced with different organic additives.”, *Journal of Non-Crystalline Solids*, v.304, pp.286-292.
- PRADO DA SILVA, M.H., LEMOS, I.F., LOPES, M.A., SANTOS, J.D., 2002, “Production of porous biomaterials base don glass reinforced hydroxyapatite composites.”, *Key Eng. Materials*, v.230-232, pp.483-486.
- REYES, L.C.V., 2000, *Aplicação de um vidro bioativo em tibias de coelhos*. Tese de M.Sc., Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos / USP, São Paulo, SP, Brasil.
- RODENAS, L.G., PALACIOS, J.M., 2005, “Surface properties of various powdered hydroxyapatites”, *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 290, pp. 154-154.
- RUBIN, J., RUBIAN, C., JACOBS, C.R., 2005, “Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone”, *Gene*, 2005, *In press corrected proof*.
- SANADA, J.T, RODRIGUES, J.G.R., CANOVA, G.C., et al., 2003, ”Análise histológica, radiográfica e do perfil de imunoglobulinas após implantação do enxerto de osso esponjoso bovino desmineralizado em bloco em músculo de rato.”, *J. Appl.Oral Sci.*, vol.11, nº 3 (Jul/Sept).
- SANTIAGO, A.S., 2004, *Resposta de células osteoblásticas cultivadas sobre titânio com diferentes tratamentos de superfície*. Tese de M.Sc., Engenharia Metalúrgica e de Materiais. COPPE-UFRJ- RJ, Rio de Janeiro, Brasil.

SANTOS, G.R.Y, GUERRA-LÓPEZ, J.G., 1992, *Materiales bioactivos para implantes ósseos. Características y aplicaciones*. Laboratorio de Biomateriales, Centro de Investigaciones Científicas, Cuba.

SCHAWRTZ, Z., MELLONIG, J.T, FONTAINE, D.L., 1996, “Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation. J. Periodontal. Vol.67, pp. 918-926.

SENA, L.A., 2004, *Produção e caracterização de compósitos hidroxiapatita-colágeno para aplicações biomédicas*. Tese de D.Sc., PEMM/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

SICCA, C.M, OLIVEIRA, R.C, SILVA, T.L., et al., 2000, “Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular a enxertos de osso cortical bovino em subcutâneo de ratos. Efeito do tamanho de partículas”. *Rev. FOB*, v. 8, n. 1/2 (Jan-Jun), pp.1-10.

SMART, L., MOORE, E., 1995, *Solid State Chemistry – An Introduction*, 2nd. ed., London, Chapman & Hall.

SOGO, Y., SAKURAI, T., ONUMA, K., ITO, A., 2002, “The most appropriate (Ca+Zn)/P molar ratio to minimize the zinc content of ZnTCP/HAP ceramic used in the promotion of bone formation”, *Journal Biomed Mater Res*. 62(3):457-63.

SOGO, Y., ITO, A., FUKASAWA, K., et al., 2005, “Zinc-containing calcium phosphate ceramics with a (Ca+Zn)/P molar ratio of 1.67”, *Key Engineering Materials*, Vols. 284-286, pp. 31-34.

STEPHAN, R., MERTEN, H., KESSLER, P., WILTFANG, J., 2003, “Hydroxyapatite cement (Bone SourceTM) for repair of critical sized calvarian defects-an experimental study”, *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, Vol. 31, Issue 3, pp. 149-153.

STITZEL, J., JIN LEE, S., KOMURA, M, BERRY, et. al, 2006, “Controlled fabrication of a biological vascular substitute”, *Biomaterials*, Vol 27, pp. 1088-1094

STORRIE, H., STUPP, S.L., 2005, “ Cellular response to zinc-containing organoapatite: an invitro study of proliferation, alkaline phosphatase activity and biomineralization. *Biomaterials*, 26(27):5492-9.

TAKAMORI, E.R., 2004, *Estudo in vitro da citotoxicidade do osso bovino misto quimicamente tratado*, Dissertação de M.Sc., Depto. Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru/USP, Bauru, SP, Brasil.

TORABINEJAD, M., PITTFORD, T.R., 1996, "Root end filling materials: a review.", *Endod. Dent. Traumatol*; vol. 12 (4) (Aug.), pp. 161-78.

WALTER, I., SCHÖNKYPL, S., 2006 "Extracellular matrix components and matrix degrading enzymes in the feline placenta during gestation", *Placenta*, Vol. 27, Issues 2-3, pp.291-306.

WATAHA, J.C., 2001, "Principles of biocompatibility for dental practioners." *J. Prosthet. Dental*, Vol. 86, pp. 203-9.

WEBSTER, T. J., MASSA-SCHLUETER, E. A., SMITH, J. L., SLAMOVICH, E. B., 2004, "Osteoblast response to hydroxyapatite doped with divalent and trivalent cations", *Biomaterials*, vol. 23, pp. 4285-4294.

WENNBERG, A., 1988, "In vitro assessment of the biocompatibility of dental materials-the Millipore filter method.", *Int Endod J*, v. 21, n.2, pp.67-71.

YAMAGUCHI, M., OISHI, H., et. al; 1988, "Zinc stimulation of bone protein synthesis in tissue culture", *Biochem. Pharmacol.*, 37, 4075-4080.

YAMAMOTO, M.K., LUZ, J.G.C., ARAÚJO, V.C., 1994, "Resposta tecidual óssea frente a hidroxiapatita granular implantada em defeitos criadas na mandíbula de ratos", *Revista Odont. USP*, vol. 8, no. 4, pp. 281-286.

VERCIK, L.C., ASSIS, C.M., FOOK, M.V, SANTOS, A.C., 2003 "Recobrimento de apatitas in vitro sobre titâneo-influência do tratamento térmico", *Eclét. Quím.* Vol 28 no. 1,