



Universidade da Beira Interior

Desenvolvimento de um Biomaterial de Alumina para Futura Aplicação em Regeneração Óssea

Miguel Ângelo Azenha Rodrigues

Covilhã, Junho 2010

Desenvolvimento de um biomaterial de alumina para futura aplicação em regeneração óssea

Dissertação apresentada à Universidade da Beira Interior para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica

Miguel Ângelo Azenha Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. Ilídio Correia (Universidade da Beira Interior)

À minha irmã

Índice Geral

Agradecimentos	II
Resumo	III
Abstract	IV
Índice de Figuras	V
Índice de Tabelas	VI
Abreviaturas	VII
1. Introdução	1
1.1. Tecido ósseo	2
1.1.1. Células do tecido ósseo	3
1.1.2. Matriz extracelular	5
1.2. Processos de Formação do Tecido Ósseo	5
1.2.1. Ossificação	5
1.2.2. Crescimento Ósseo ou Osteogénese	6
1.2.3. Remodelação e Reparação óssea	6
1.3. Doenças Ósseas	8
1.4. Biomateriais	9
1.4.1. Origem	9
1.4.2. Conceito	10
1.4.3. Classificação dos Biomateriais	10
1.4.4. Tipos de Biomateriais	11
1.4.4.1. Metais e Ligas Metálicas	11
1.4.4.2. Materiais Cerâmicos	12
1.4.4.3. Polímeros	13
1.4.4.4. Compósitos	14
1.4.5. Aplicações Clínicas	14
1.4.6. Comportamento Biológico	15
1.4.7. Alumina	16
1.4.8. Biocompatibilidade	17
1.4.8.1. Estudos <i>in vitro</i>	17
1.4.8.1.1. Ensaio do MTT	17
1.4.8.1.2. Ensaio do MTS	18
1.4.8.1.3. Ensaio da LDH	18

1.4.8.1.4. Ensaio do azul de tripano	18
1.4.8.2. Estudos <i>in vivo</i>	18
1.4.8.2.1. Ensaio histológicos	19
2. Objectivo	20
3. Materiais e Métodos	22
3.1. Síntese do <i>scaffold</i> de alumina	23
3.2. Microscopia electrónica de varrimento	23
3.3. Cultura de osteoblastos humanos	23
3.4. Caracterização do <i>scaffolds</i> de alumina	24
3.4.1. Propriedades mecânicas dos <i>scaffolds</i>	24
3.4.2. Proliferação celular na presença do <i>scaffold</i> de alumina	24
3.4.3. Avaliação do perfil citotóxico do <i>scaffold</i> de alumina através do MTT	25
3.5. Ensaio <i>in vivo</i>	25
3.5.1. Estudos histológicos	26
3.6. Análise estatística	26
4. Resultados e Discussão	27
4.1. Caracterização do <i>scaffold</i> de alumina	28
4.1.1. Análise Macroscópica	28
4.1.2. Propriedades Mecânicas	28
4.1.3. Ensaio de Citotoxicidade	29
4.1.4. Microscopia electrónica de varrimento	30
4.2. Ensaio <i>in vivo</i>	31
4.3. Análise histológica	33
5. Conclusões e Perspectivas futuras	35
6. Bibliografia	37

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Ilídio Correia, pela oportunidade que me deu de realizar este trabalho e pela constante energia e profissionalismo que nunca deixam de me surpreender.

À Patricia agradeço por tudo o que me ensinou, mas também pela amizade, companheirismo e tenacidade na procura de novas metas.

Agradeço ao Prof. Dr. Abílio Silva, pelo apoio que me deu na produção do biomaterial, e pelo interesse que demonstrou no meu trabalho.

À Daniela agradeço pela amizade e pela ajuda que me deu nos ensaios *in vivo*, que de outra forma seriam impossíveis de realizar.

Agradeço ao Max pelo que me ensinou, e a inesgotável boa disposição; aos meus colegas de laboratório, Patrícia e Carlos, muito obrigado pelo companheirismo. À Elisa e à Joana agradeço terem transformado as horas passadas no laboratório, em minutos.

Agradeço à Catarina Ferreira pela inesgotável disponibilidade; à Dr^a. Odette Almeida e Prof^a. Dr^a. Paula Chaves, pelo apoio prestado na interpretação dos resultados histológicos; e à Engenheira Paula pela aquisição das imagens de SEM.

Aos meus amigos de sempre, agradeço por me terem tornado quem sou.

Um agradecimento muito especial para a Andreia, pelo amor, carinho e amizade, e por ter entrado na minha vida, transformando-a para melhor.

À minha irmã, a quem dedico este trabalho, agradeço por seres quem és, e espero que tenhas orgulho neste teu mano.

Por fim agradeço à minha família pelo apoio que me deram, mas sobretudo agradeço aos meus pais, a quem devo absolutamente tudo e que sempre me apoiaram independentemente das minhas escolhas. Com pais destes, tudo se torna muito mais fácil. Muito, muito obrigado.

Resumo

O osso é um tecido conjuntivo muito complexo, e é um dos mais resistentes do organismo. É fundamental na capacidade de carga do esqueleto, e apresenta funções mecânicas, metabólicas, de suporte e de protecção. As lesões ósseas ocorrem devido à idade, mas também devido a traumatismos e doenças.

O processo de reparação óssea é muito dinâmico e envolve uma série de fenómenos: migração, diferenciação, proliferação celular e síntese da matriz extracelular óssea. Quando um biomaterial é inserido num defeito ósseo, o organismo reconhece o biomaterial como um corpo estranho, desencadeando um conjunto de respostas que visam a reparação óssea, mas podendo também rejeitar o biomaterial e desencadear uma resposta inflamatória.

Neste trabalho, um novo *scaffold* de alumina foi produzido, através de um processo inovador, para que futuramente possa ser usado na regeneração. O material foi caracterizado mecanicamente, através de ensaio de dureza, resistência, porosidade e absorção de água. Biologicamente, o material foi caracterizado através de ensaios *in vitro* com osteoblastos humanos: ensaio do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio], para avaliar a citotoxicidade do mesmo, e Microscopia Electrónica de Varrimento, para observar a adesão ou não das células ao material. Foram também realizados ensaios *in vivo*, inserindo o material em defeitos ósseos induzidos em ratos Wistar, de modo a caracterizar o material quanto à sua biocompatibilidade e capacidade de osteointegração.

Os ensaios mecânicos revelaram que o material possui uma elevada resistência mecânica, assim como uma densidade semelhante à do osso, e uma porosidade que permite os osteoblastos aderirem ao material. Os ensaios *in vitro*, revelaram que o material não é citotóxico e que permite a adesão celular na sua superfície. No entanto, os resultados *in vivo*, não confirmaram os dados obtidos *in vitro*, uma vez que a análise histológica revelou que o material induz inflamação a curto e a longo prazo no local de implantação. Tal resultado, permite afirmar, que este material desencadeia uma resposta inflamatória local, tendo estes resultados relevância clínica, uma vez que a alumina é muito usada no revestimento de próteses dentárias e femorais, e desse modo, este trabalho levanta algumas questões quanto à fiabilidade de se usarem dispositivos produzidos com este material, e em que o mesmo contacta directamente com os tecidos.

Abstract

Bone is a very complex connective tissue, and one of the hardest in the body. It's essential in the skeleton load-bearing capacity due to its mechanical, support and protective properties. Bone damages occur not only due to age, but also as a result of traumas and illnesses.

The bone regeneration process is a very dynamic process and involves different stages: migration, differentiation, cellular proliferation and extracellular matrix synthesis. When a biomaterial is implanted in a bone injury, the body identifies it as a foreign body, and this triggers not only a set of responses aiming to repair the bone damage, but can also reject the biomaterial and trigger inflammatory answer.

In this work, a new alumina *scaffold* was produced, through an innovative process to be used in a near future for bone regeneration. The *scaffold* was characterized mechanically, by harness, resistance, porosity and water absorption assays. Moreover, it was also characterized in a biological environment. The *in vitro* studies were done with human osteoblasts: [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium] bromide was used to evaluate the biomaterial's cytotoxicity, and Scanning Electron Microscopy was used to characterize the cell adhesion to the *scaffold* to determine the biomaterial's biocompatibility and osteointegration capacity. *In vivo* studies were also performed. The *scaffold* was inserted in Wistar rats.

The mechanical assays revealed that the *scaffold* has a very high mechanical resistance, a density similar to the bones', and a porosity that allows the osteoblast cells to adhere. *In vitro* studies revealed the biomaterial's lack of cytotoxicity, and also cell adhesion to the *scaffold*. However, the *in vivo* results didn't confirm the *in vitro* ones. The histological analysis showed that the biomaterial induces inflammation at short and long term in the bone injuries. Such results suggest that this *scaffold* triggers a local inflammatory response, and it can be claimed that this findings are clinically relevant because alumina is usually used as coating of dental and femoral prosthesis and so this work raises some questions about the applicability of devices made with alumina to be used directly in living tissues.

Índice de Figuras

Figura 1: Estrutura de um osso achatado	2
Figura 2: Células do tecido ósseo.	4
Figura 3: Redução do MTT a formazano	17
Figura 4: Fotografia do <i>scaffold</i> de alumina	28
Figura 5: Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> pelo método do MTT.	30
Figura 6: Imagens de microscopia óptica invertida de osteoblastos em contacto com o <i>scaffold</i> de alumina	30
Figura 7: Imagens obtidas por SEM da superfície do <i>scaffold</i> de alumina	31
Figura 8: Imagens dos ensaios <i>in vivo</i>	32
Figura 9: Imagens histológicas do processo de regeneração do tecido ósseo da calote	34

Índice de Tabelas

Tabela 1: Classificação dos biomateriais de acordo com a sua aplicabilidade	11
Tabela 2: Biomateriais para substituição óssea	16
Tabela 3: Propriedades mecânicas do <i>scaffold</i> de alumina	29
Tabela 4: Observações obtidas pela análise das lâminas histológicas das amostras da calote dos grupos de controlo e de teste.	34

Abreviaturas

Cél/SA	Osteoblastos na presença do <i>scaffold</i>
DMEM-F12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium – F12
FBS	Soro Fetal Bovino
H&E	Hematoxilina e Eosina
K⁻	Controlo Negativo
K⁺	Controlo Positivo
LDH	Lactato Desidrogenase
MoR	Módulo de Ruptura
MTS	3-(dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada
NADH+H⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
PBS	Solução Tampão de Fosfato
PLA	Ácido Polilactídico
PMMA	Polimetacrilato de metilo
SEM	Microscopia Electrónica de Varrimento
SSA	Área específica de superfícies
UHWPE	Poliétileno de Ultra Alto Peso Molecular

1. Introdução

1.1. Tecido Ósseo

O tecido ósseo pode ser classificado de acordo com as suas características macroscópicas em compacto (cortical) (80%) e esponjoso (trabecular) (20%) [1, 2]. O tecido ósseo compacto apresenta funções mecânicas e de protecção, enquanto o tecido ósseo esponjoso se ocupa das funções metabólicas e de suporte relativamente ao osso compacto. O tecido ósseo existente é maioritariamente compacto (Figura 1). O tecido ósseo compacto é mais denso e possui menores espaços que o osso esponjoso. O tecido ósseo compacto encontra-se na diáfise dos ossos longos e na camada externa da maioria dos ossos. O osso esponjoso situa-se no interior deste tecido, a nível das metáfises e epífises dos ossos longos e na região central da maioria dos ossos planos e irregulares, formando uma rede de trabéculas ósseas [9]. A superfície externa do osso é revestida por uma camada fibrocelular constituída por uma membrana de tecido conjuntivo osteogénico, denominada perióstio, apresentando a sua superfície interna uma estrutura semelhante, denominada endóstio. A principal função do endóstio e do perióstio é a nutrição do tecido ósseo e neles estão presentes osteoblastos, osteoclastos e outras células importantes do metabolismo ósseo, que contribuem significativamente para o processo regenerativo e de remodelação do osso.

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo altamente vascularizado, constituído por células e por uma matriz orgânica firme, enriquecida por depósitos de sais de cálcio, com a característica exclusiva de mineralizar. É um dos tecidos mais resistentes do organismo humano. Além das funções de suporte, locomoção e transporte, o tecido ósseo é um reservatório de minerais, e portanto desempenha um papel activo na regulação da homeostase orgânica, e no balanço do gradiente iónico do organismo. [1].

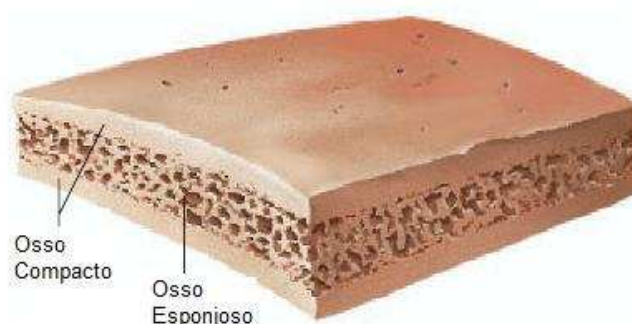


Figura 1: Estrutura de um osso achatado (adaptado de [2])

1.1.1. Células do Tecido Ósseo

O tecido ósseo é formado por diferentes tipos de células provenientes de linhas celulares distintas: células pluripotentes indiferenciadas do mesênquima que se diferenciam em células de linhagem osteoblástica (osteoblastos, osteócitos e células de revestimento) e células hematopoiéticas da medula óssea que dão origem aos osteoclastos [3].

Os osteoblastos, osteócitos e células de revestimento encontram-se localizados a nível da camada interna do perióstio e da medula óssea, na linha osteoprogenitora. Estas células de linhagem osteoblástica são responsáveis pela formação do tecido ósseo, durante o desenvolvimento embrionário, crescimento, remodelação, reparação de fracturas ou de qualquer outro defeito ósseo [1-3].

Os osteoblastos são responsáveis pela produção de matriz óssea, durante o desenvolvimento ou a reparação do osso. Estas células são caracterizadas por possuírem uma membrana citoplasmática rica em fosfatase alcalina, receptores para uma variedade de hormonas e factores de crescimento. Os osteoblastos são responsáveis pela formação da matriz orgânica, bem como, produção de colagénio e proteínas não colagénicas da matriz extracelular óssea, para além da síntese da enzima fosfatase alcalina, necessária para o processo de mineralização [4-6].

Os osteócitos são considerados as células terminais e mais maduras da diferenciação celular da linhagem osteoblástica. Apresentam uma morfologia achatada e fusiforme, e suportam o osso, estando localizados no interior das lamelas do osso esponjoso e compacto. Estas células estão completamente envolvidas por matriz extracelular, formando um espaço denominado de lacuna (Figura 2) [1]. A quantidade de osteócitos existente por unidade de volume ósseo está, directamente, dependente da rapidez do processo de formação óssea. Quanto maior for a rapidez de formação óssea, maior será a quantidade de osteoblastos que se transformarão, em osteócitos [2, 3].

As células de revestimento do tecido ósseo, são células que apesar de não estarem envolvidas na matriz extracelular óssea, podem apresentar um papel importante na diferenciação de células mesenquimatosas, na regulação da homeostasia mineral, na inibição da actividade anabólica dos osteoblastos e também parecem influenciar a

atividade dos osteoclastos. Estas células podem produzir collagenase, enzima com capacidade de degradar a matriz orgânica, e preparar a reabsorção osteoclástica [1].

Os osteoclastos, são células que diferem da linhagem celular dos osteoblastos, uma vez que as suas células precursoras presentes a nível da medula óssea são também as responsáveis pela diferenciação em várias linhas das células hematopoiéticas (monócitos, macrófagos e outros leucócitos presentes no sangue periférico) [20]. Estas células, são fundamentais no processo de remoção e reabsorção do tecido ósseo em áreas de remodelação activa, pela degradação enzimática da matriz proteica e dissolução ácida dos minerais da matriz extracelular óssea. Os osteoclastos distinguem-se das outras células por apresentarem um maior volume e múltiplos núcleos. O citoplasma contém vários vacúolos e vesículas, assim como numerosas mitocôndrias e ribossomas livres [3].

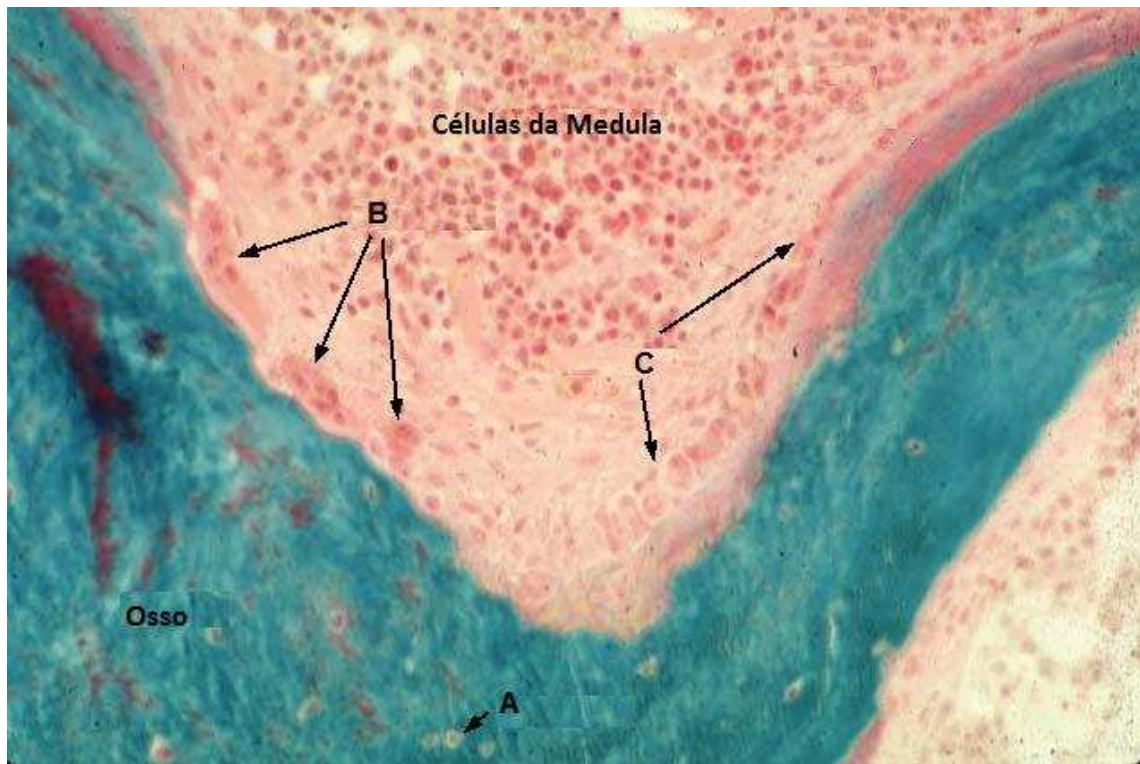


Figura 2: Células do tecido ósseo. A – Osteoclastos; B – Ostócitos; C – Osteoblastos. Ampliação a 300x (adaptado de [77]).

1.1.2. Matriz Extracelular

A matriz extracelular é composta por uma parte orgânica, e outra inorgânica. A primeira é formada por constituintes orgânicos tais como, colagénio tipo I e V, osteocalcina, proteínas não colagénicas da matriz (glicoproteínas: fosfatase alcalina, osteonectina; sialoproteínas; fosfoproteínas; proteoglicanos e factores de crescimento) [5,6]. A parte inorgânica (que compõe 67% da matriz) é constituída por cálcio (Ca^{2+}) e fosfato (PO_4^{3-}) que se depositam sob a forma de cristais de hidroxiapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, bem como, compostos amorfos de fosfato de cálcio (hidrogenofosfato de cálcio (CaHPO_4)) [1-3, 21]. Este mineral é responsável pela dureza e resistência do tecido ósseo, devido à sua associação com fibras de colagénio, nomeadamente do tipo I. Deste modo, o número de células presentes no tecido ósseo é relativamente pequeno quando comparado com o grande volume de matriz extracelular óssea [1, 2].

1.2 Processos de Formação do Tecido Ósseo

1.2.1 Ossificação

A ossificação é o processo pelo qual se procede à formação do tecido ósseo. Este mecanismo ocorre pela acção dos osteoblastos. Primeiramente, os prolongamentos citoplasmáticos dos osteoblastos estendem-se e unem-se aos outros prolongamentos dos osteoblastos vizinhos. Posteriormente, os osteoblastos formam uma matriz extracelular contendo hidroxiapatite e colagénio, que envolve as células (agora denominadas de osteócitos) [10].

Existem dois padrões de formação do tecido ósseo: ossificação membranosa e ossificação endocondral. A ossificação membranosa consiste na transformação das células embrionárias mesenquimais em osso. O seu nome advém do local onde o osso se forma, nas membranas das células do tecido conjuntivo. Por exemplo, a ossificação craniana deriva directamente deste tipo de ossificação [10,11].

A ossificação endocondral, consiste na substituição gradual de cartilagem pelo osso durante o desenvolvimento ósseo. Este processo é responsável pela formação da maioria do esqueleto dos animais vertebrados. Durante este processo, os osteoblastos

atingem regiões designadas por centros de ossificação, onde se diferenciam em osteócitos [12].

1.2.2 Crescimento Ósseo ou Osteogénese

O crescimento ósseo pode ser aposicional, formação de um novo tecido ósseo à superfície, ou endondrial, caso o crescimento ocorra na cartilagem, seguido da substituição deste tecido por osso.[1,2]

O crescimento aposicional é responsável pelo aumento do diâmetro dos ossos longos e pela maior parte do crescimento dos outros ossos. Neste caso, os osteoblastos dividem-se sucessivamente formando camadas. As células mais profundas produzem matriz óssea e diferenciam-se em osteócitos.

O crescimento endondrial ocorre no interior da cartilagem articular, sendo responsável pelo crescimento das extremidades dos ossos (epífises), assim como, pelo crescimento do corpo do osso (diáfise) [12].

1.2.3 Remodelação e Reparação óssea

A remodelação óssea é um processo complexo que permite a substituição do tecido ósseo antigo por um novo tecido ósseo. A remodelação do tecido ósseo compacto adjacente a um implante resulta na formação de sistemas haversianos secundários [2].

No primeiro ano de vida, quase 100% do esqueleto é substituído, enquanto, na idade adulta, este processo ocorre cerca de 10% ao longo do ano.

Quando não ocorre um balanço entre a reabsorção óssea e a formação óssea, resultam várias doenças ósseas metabólicas como é o caso da osteoporose [13].

A resposta normal de regeneração óssea é um fenómeno dinâmico no qual as células e os seus metabolitos interactuam para reparar o tecido danificado. A regeneração óssea, desde a fase da lesão à remodelação final, envolve uma série de fenómenos (migração, diferenciação, proliferação celular e síntese da matriz extracelular óssea) que se encontram controlados e coordenados pela expressão de genes específicos, por sua vez, induzida por factores de crescimento e citocinas [1]. Os

factores de crescimento são péptidos ou glicoproteínas que organizam e coordenam os processos de mitose, quimiotaxia, diferenciação, crescimento e produção de matriz extracelular óssea pelas células. Podem actuar como factores endócrinos, parácrinos ou autócrinos de forma a activar receptores específicos da superfície celular e estimular a actividade celular [22].

Quando um osso é fracturado, os vasos sanguíneos existentes no tecido são lesados, havendo a formação de um coágulo [1, 14]. Alguns dias após a fractura, os vasos sanguíneos e células não especializadas dos tecidos adjacentes invadem o coágulo. Algumas destas células diferenciam-se em fibroblastos, que produzem uma rede fibrosa entre os topos da fractura; outras células diferenciam-se em condroblastos e produzem pequenas ilhas de fibrocartilagem na rede fibrosa – calo fibrocartilágneo. De seguida, os osteoblastos penetram no calo e transformam-no em calo ósseo. Aqui os osteoblastos, através de ossificação membranosa produzem tecido ósseo, enquanto nas ilhas de fibrocartilagem a ossificação é endondrial [2].

Quando há a inserção de um biomaterial no osso lesado, o processo de reparação óssea é semelhante, no entanto o tecido reconhece o biomaterial como corpo estranho, e inicia a resposta à agressão, sendo desencadeado um conjunto de fenómenos que levam à reparação dos danos e à cicatrização tecidular. Ocorre também reacção inflamatória, e tentativa de encapsulamento do biomaterial [14].

O tipo de tecido ósseo que se forma após a colocação de um implante depende da idade, da função e de múltiplos factores sistémicos. Este tipo de tecido é composto por quatro tipos diferentes de osso, caracterizados microscopicamente como osso imaturo ou embrionário, lamelar, compacto e esponjoso [1, 2, 9].

O osso imaturo é um tecido rico em células, que se forma rapidamente (mais de 30 a 50 μm por dia) em resposta ao crescimento ou adaptação biomecânica. Comparativamente com o osso secundário, possui um grau de mineralização relativamente menor, uma orientação das fibras mais irregular e uma resistência menor. Em condições normais é substituído rapidamente por tecido ósseo lamelar [14, 15].

O osso lamelar é o principal tecido ósseo que constitui o esqueleto adulto. Tem uma formação relativamente lenta (0,6 μm por dia) e um mecanismo primário e

secundário de mineralização. A maturação completa deste tipo de osso requer um período de tempo de pelo menos 6 a 12 meses [15].

O osso compacto é semelhante ao osso lamelar na resistência biomecânica, sendo característico das uniões estáveis entre o tecido fibroso e o tecido ósseo.

O osso esponjoso forma-se nas superfícies corticais durante o processo de cicatrização ou reparação, crescimento e adaptação biomecânica do osso [1, 2].

O tipo de regeneração óssea na zona da interface formada entre um implante e o osso recém-formado não é idêntica à que ocorre durante a reparação de uma fratura óssea. Tal facto, deve-se à impossibilidade de se observar a formação de uma cartilagem endocondral como precursora do crescimento do osso esponjoso [16, 17].

No estudo do tecido ósseo regenerado após a implantação de um biomaterial, é muito importante identificar quais os tipos de células que se encontram na zona da interface. A necessidade da inserção de biomateriais no osso advém das patologias, nomeadamente de descalcificação a que o osso está sujeito [22].

1.3 Doenças Ósseas

Nem sempre a fragilidade e fratura óssea, é causada por um acidente. Existem doenças que levam a uma descalcificação progressiva do osso, como é o caso da osteomalacia, osteoartrite, osteoporose. Estas doenças que afectam o tecido ósseo, bem como outras, tais como os osteosarcomas e a doença de Paget, podem estar relacionadas com modificações no genoma do indivíduo.

A osteomalacia resulta da eliminação do cálcio dos ossos, normalmente por uma deficiência em vitamina D. Em determinadas alturas onde a necessidade fisiológica de cálcio é maior, como na gravidez, o cálcio que o feto necessita pode ser removido dos ossos da mãe, deixando-os frágeis [18].

A osteoartrite é uma doença crónica que se caracteriza pelo colapso da cartilagem nas articulações. Este colapso resulta na fricção dos ossos, causando rigidez, dor e perda de movimentos na zona articulada [21].

A osteoporose é uma doença sistémica do esqueleto, caracterizada por diminuição da massa óssea e alteração da microestrutura do tecido ósseo, com o consequente aumento da fragilidade do osso e maior risco de fractura (Godinho et al., 2004). É a principal doença que leva à descalcificação dos osso, e ocorre quando a velocidade de reabsorção óssea é superior à da formação óssea [19].

A doença de Paget do osso é uma perturbação do esqueleto na qual algumas zonas do osso crescem de modo anormal, aumentam de tamanho e tornam-se mais frágeis. Na doença de Paget, os osteoclastos e os osteoblastos tornam-se hiperactivos em algumas áreas do osso, aumentando de maneira significativa a rapidez de renovação do osso. As áreas hiperactivas aumentam; contudo, a sua estrutura é anormal e, portanto, são mais frágeis que as áreas normais. Embora a doença de Paget seja, com frequência, hereditária, não se descobriu qualquer padrão genético específico. Algumas evidências sugerem que uma infecção viral pode estar envolvida. No entanto, ainda não se conhece a causa desta doença [23].

1.4. Biomateriais

1.4.1. Origem

A origem dos biomateriais é desconhecida, contudo, os primeiros registos do seu uso datam da civilização egípcia, onde eram utilizados com o intuito de substituir membros amputados. Nesse tempo, o material de eleição para próteses era a madeira devido à sua resistência mecânica [28]. Posteriormente, o uso de biomateriais foi associado a implantes cirúrgicos, destacando-se, já na era pré-cristã, o uso de biomateriais para substituição óssea. Salienta-se o cobre e/ou o bronze como sendo os materiais mais utilizados [25].

O desenvolvimento de novos biomateriais atingiu particular importância em meados do século XIX. Com os avanços da medicina, a esperança média de vida aumentou, assim como, o interesse na utilização de materiais para suprimir necessidades do organismo (defeitos, lacunas, lesões, etc). Em 1880, Gluck usou próteses de marfim como implantes corporais [25].

A primeira prótese metálica foi elaborada a partir de uma liga de Vitallium (60% cobalto, 20% cromo, 5% molibdênio, 5% de outras substâncias vestigiais), produzida por Bives Willes (1938) e Bruschi (1939). Actualmente, esta liga continua a ser usada em implantes dentários e articulações [26].

1.4.2. Conceito

O termo biomaterial é definido como: "um material destinado a contactar com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do organismo" [30]. O consenso a que chegaram os especialistas na área de biomateriais define-os como: "materiais sintéticos ou naturais, usados para funcionar em contacto com os sistemas vivos [24].

As características mais importantes para seleccionar um material para utilização médica são: a biocompatibilidade, a ausência de efeitos nocivos ou tóxicos para o organismo e as propriedades biomecânicas capazes de responderem às exigências do mesmo [29]. A porosidade e a rugosidade são propriedades que um biomaterial também deve possuir, de modo a contribuir para a adesão e proliferação celular. A biodegradabilidade, é uma característica importante de um biomaterial que tenha como função a entrega controlada de fármacos, ou que sirva como suporte temporário de células [58, 59].

Os biomateriais podem ser classificados sob o ponto de vista do comportamento biológico e da sua composição química.

1.4.3. Classificações dos Biomateriais

Há várias classes de biomateriais: metais, polímeros, carbonos, vidros, cerâmicas e compósitos [27]. Os biomateriais podem também ser divididos em três categorias, dependendo do tipo de resposta celular. Ou seja, materiais inertes (ou praticamente inertes) desencadeiam uma diminuta ou nenhuma resposta tecidual. Materiais activos encorajam uma ligação dos tecidos vizinhos. Materiais degradáveis, ou reabsorvíveis, são incorporados nos tecidos vizinhos, ou podem-se dissolver completamente num determinado período de tempo [31]. Destacam-se como materiais tipicamente inertes, os metais (tabela 1) [31].

Tabela 1. Classificação dos biomateriais de acordo com a sua aplicabilidade (adaptado de [31]).

Metais	Cerâmicas	Polímeros
Aço inoxidável 316L	Alumina	Polietileno de Ultra Alto
Ligas de Co-Cr	Zircónia	Peso Molecular
Titânio	Carbono	Poliuretano
Ti6Al4V	Hidroxiapatite	

Os biomateriais podem ser classificados de acordo com a sua aplicabilidade:

- Biomateriais metálicos são usados para aplicações de carga e têm de ter uma elevada resistência à fadiga, para as exigências do dia-a-dia [32].
- Biomateriais cerâmicos são isoladores de calor, e geralmente são usados pela sua dureza e resistência ao desgaste, como por exemplo, em articulações e implantes dentários, assim como, implantes para regeneração óssea [24, 33]
- Materiais poliméricos são normalmente usados pela sua flexibilidade e estabilidade, mas têm de ser usados em superfícies onde estejam sujeitos a baixa fricção [34].

1.4.4. Tipos de Biomateriais

1.4.4.1. Metais e Ligas Metálicas

Os metais são utilizados em várias aplicações clínicas, em medicina dentária e noutras áreas médicas, devido às suas propriedades mecânicas e relativas propriedades inertes. A rigidez e a potencial toxicidade, através da libertação de iões, podem provocar: metaloses, reacções inflamatórias e encapsulação fibrosa [32].

O aço inox, o titânio, as ligas de titânio-alumínio-vanádio (TÍ6A14V) e as ligas de crómio-cobalto são exemplos de metais ou ligas utilizadas em medicina. Os

implantes metálicos de titânio são o tipo de implante mais usado em implantologia oral e outras aplicações médicas, como próteses [32].

1.4.4.2. Materiais Cerâmicos

Os materiais cerâmicos são muito estáveis e não reactivos. Habitualmente são produzidos a temperaturas superiores a 1000 °C. Quando puros, estes materiais possuem uma estrutura cristalina geralmente robusta, porque os átomos estão num estado de máxima densidade de compactação, ao contrário dos materiais cerâmicos não cristalinos onde as distâncias inter-atômicas são grandes [33]. Os materiais cerâmicos são frágeis, duros e resistentes ao desgaste; altamente resistentes a ataques ácidos; estáveis a altas temperaturas e bons isolantes térmicos e eléctricos [31, 33].

Os materiais cerâmicos podem dividir-se em três grupos, em função das suas propriedades físico-químicas:

- O primeiro grupo é constituído pelos materiais cerâmicos oxidados que, quando inseridos nos tecidos, se mantêm estáveis e inertes (ex. óxidos de alumina, de zircónio e de magnésio) [33, 35].

- Num segundo grupo, encontram-se os materiais cerâmicos ricos em fosfato de cálcio, que apresentam um comportamento biológico distinto. Os representantes mais importantes destes materiais são os fosfatos tricálcicos e as apatites [33]. A utilização destes materiais na substituição de tecido ósseo é relativamente corrente devido à semelhança da sua composição com a fase mineral do tecido ósseo e por apresentarem grande biocompatibilidade. Estes biomateriais têm indicação clínica no preenchimento de defeitos ósseos, mas não em situações em que sejam submetidos a forças de carga, excepto no revestimento de implantes metálicos [35].

- No terceiro grupo podem incluir-se os vidros de sílica e os vidros cerâmicos. Os vidros de sílica são dos materiais mais conhecidos, baseiam-se num vidro de sílica contendo iões de cálcio e fósforo. O primeiro foi desenvolvido por Hench e colaboradores, nos anos setenta, na Universidade da Florida, sendo denominado de Bioglass® [36]. Este material apresenta boas propriedades de osseointegração e biocompatibilidade, embora tenha limitações de resistência mecânica. No sentido de melhorar as propriedades biomecânicas deste grupo de materiais, foram introduzidas

modificações no processo de síntese dos vidros bioactivos levando ao aparecimento dos vidros cerâmicos [35, 36]. Os vidros bioactivos e os vidros cerâmicos têm sido utilizados no preenchimento de defeitos ósseos; na prevenção da reabsorção alveolar pós-extracção dentária; no revestimento de implantes metálicos, melhorando as suas propriedades mecânicas e a regeneração óssea; na substituição de vértebras, de osso ilíaco e na libertação de fármacos [36-38]. Os mecanismos de adesão óssea dos materiais cerâmicos são diferentes conforme se consideram os cerâmicos com superfícies bioactivas e os reabsorvíveis [37-38]. Enquanto os primeiros apresentam um tipo de adesão química (ligações covalentes) ao tecido ósseo através de uma camada superficial bioactiva de apatite, os segundos unem-se, preferencialmente, através de ligações iónicas. A hidroxiapatite é um material cerâmico que apresenta um tipo intermédio de união ao tecido ósseo [38].

1.4.4.3. Polímeros

Os polímeros são cadeias extensas de unidades monoméricas repetidas. A unidade monomérica é essencialmente constituída por ligações do tipo C-C, contendo por vezes átomos de C, N, O, S e Si [39]. Os polietilenos, o polipropileno, o poliuretano, o ácido polilactídico (PLA) e o polimetacrilato de metilo (PMMA) são exemplos de polímeros utilizados no fabrico de implantes. Alguns polímeros podem causar respostas patológicas devido à libertação de monómeros tóxicos ou à sensibilidade alérgica [42]. Por exemplo, o PMMA, é um polímero muito utilizado como cimento ósseo para fixar as próteses ortopédicas. O monómero necessário para a reacção de polimerização é tóxico e pode provocar hipotensão, insuficiência respiratória e/ou cardiovascular e reacções alérgicas [40-42].

A utilização de materiais poliméricos no osso é mais benéfica que os metálicos por duas razões: em primeiro lugar, porque a diferença no módulo de elasticidade entre o implante e o osso é mais reduzida, o que diminui a tensão de contacto e a reabsorção óssea; em segundo lugar, porque, como já se referiu, muitos polímeros são susceptíveis de degradação, o que pode permitir uma substituição gradual do polímero pelo tecido do hospedeiro [40,41].

1.4.4.4. Compósitos

De modo a aumentar as propriedades mecânicas e físico-químicas, podem combinar-se diferentes tipos de materiais, originando os denominados biomateriais compósitos. Os compósitos são sintetizados de forma a criar um biomaterial que possua propriedades que os componentes isolados não possuem individualmente, e que sejam superiores às que adviriam da simples adição das propriedades de cada um dos componentes. Estes materiais permitem o desenvolvimento de novos produtos para utilização biomédica [43].

O tecido ósseo, constituído por fibras de colagénio e minerais, é um bom exemplo de um compósito criado pela natureza, com propriedades biomecânicas excelentes [42, 43, 60].

1.4.5. Aplicações Clínicas

Biomateriais metálicos, cerâmicos e poliméricos são usados em aplicações ortopédicas e dentárias. Materiais metálicos, normalmente são usados para o carregamento membros de carga como hastes femorais, ou como sítios de ancoragem para implantes como parte de aparelhos dentários [48]. As cerâmicas como a alumina e o zircónio são usadas para aplicações nas articulações, uma vez que estas estão sujeitas a elevadas forças de desgaste; enquanto a hidroxiapatite é usada para aplicações ósseas, para preencher grandes espaços vazios de osso, resultante de doença ou trauma, para revestimento de próteses. Do mesmo modo, as cerâmicas de alumina e as porcelanas dentárias, também têm sido usadas como implantes dentários. Neste trabalho, destaca-se a importância da utilização da alumina porosa, que tem vindo a ser usada como substituto ósseo, em secções de osso removidas devido a patologias [37].

Os biomateriais poliméricos são utilizados para na construção de próteses dentárias. Por exemplo, o Polietileno de Ultra Alto Peso Molecular (UHWPE) é usado como superfícies de articulação contra as componentes cerâmicas nas substituições das articulações [44-47].

De entre as aplicações clínicas dos materiais pode ainda fazer-se referência às aplicações ao nível cardiovascular. Diferentes tipos de biomateriais são usados para aplicações cardiovasculares, dependendo do seu *design* ou aplicação específica. Por

exemplo, as ligas de carbono são usadas em válvulas cardíacas, e os poliuretanos são usados para o fabrico de *pacemakers* [50].

1.4.6. Comportamento Biológico

Os diferentes tipos de materiais que têm vindo a ser desenvolvidos, apresentam um comportamento biológico distinto. Os materiais inertes caracterizam-se por não provocarem qualquer reacção de corpo estranho no organismo onde são implantados. Os tecidos envolventes, a nível da interface, encontram-se em contacto directo com o material, com ausência de interposição de cápsula ou tecido fibroso. O zircónio e a alumina estão incluídos nesta classe de materiais [51].

No que diz respeito aos materiais biotolerados, estes são moderadamente aceites pelos tecidos. Observa-se, por vezes, a formação de uma cápsula de tecido fibroso que rodeia o implante. O aço inoxidável e a liga de cromo-cobalto podem induzir respostas deste tipo [52].

Os materiais bioactivos utilizados na substituição de tecido ósseo, possuem normalmente na sua composição química iões livres de cálcio e fósforo superficiais, que promovem uma ligação físico-química com o tecido ósseo envolvente. Quando implantados no organismo, pode observar-se uma união entre a superfície do material e os tecidos envolventes. A hidroxiapatite e os vidros bioactivos são exemplos destes materiais [52].

Actualmente, há vários biomateriais direccionados para a substituição óssea em diferentes fases clínicas, que futuramente se pretende que cheguem ao mercado (tabela 2).

Tabela 2: Biomateriais para substituição óssea (adaptado de [61])

Tecido	Produto	Mercado	Descrição	Material						Uso	Forma
				Sintético	Reabsorvível	Derivado de animal	Derivado de plantas ou bactérias	Derivado de humanos	Factor de crescimento		
Osso	INFUSE Bone Graft, Medtronic	2002	Esponjas de colagénio tipo I bovino, com rhBMP-2	+	+	+			+	Fusão espmhal	Sólido
	OP-1, Stryker	2001	Colagénio tipo I bovino com rh-BMP		+	+			+	Lesão óssea	Pasta
	PuraMatrix, 3DM	Pré-clínico	Péptido sintético com 16 aminoácidos, formando nanofibras	+	+					Defeitos ósseos dentários	Gel
	Vitoss Scaffold FOAM, Orthovita	2004	Espuma porosa com β -TCP e colagénio tipo I bovino	+	+	+				Lesão óssea	Espuma
	Bioset IC, Pioneer surgical	2008	Matriz celular desmineralizada humana com transportador de colagénio tipo I bovino		+	+		+		Lesão óssea	Pasta
	FortrOss, Pioneer Surgical	2008	Hidroxiapatite nanocristalina e matriz-E (colagénio porcino co-polimerizado com dextrano)	+	+	+	+			Lesão óssea	Pasta
	Regenafil, Regeneration Technologies/Exatech	2005	Matriz óssea mineralizada com transportador gelatinoso de porcina		+	+		+		Lesão óssea	Pasta
	GEM 21S, BioMimetic Therapeutics	2005	PARTICULAS DE β -TCP e factor de crescimento recombinante humano derivado de plaquetas (PDGF-BB)	+	+				+	Defeitos ósseos dentários	Pasta
	BCT001, Bioceramic Therapeutics	Pré-clínico	Vidros bioactivos libertadores de estrôncio	+	+					Lesão óssea	Grânulos, pasta

1.4.7. Alumina

A alumina é uma cerâmica de forma molecular Al_2O_3 que está a ser cada vez mais alvo de estudo, na sua função como substituto ósseo, devido à sua elevada dureza e resistência ao desgaste [53-54, 57]. Inicialmente, pensava-se que a alumina, com a sua superfície naturalmente lisa, seria um factor de adesão celular [55, 56]. No entanto, estudos recentes mostram que o comportamento *in vitro* da alumina, se assemelha ao da hidroxiapatite no que diz respeito à adesão e crescimento celular, caso a alumina seja modificada de modo a produzir estruturas rugosas e porosas [58, 59]. Contudo há alguma controvérsia em relação ao uso da alumina como biomaterial, com alguns autores a afirmarem que nanopartículas de alumina são tóxicas [73], e outros a referirem o facto de a alumina ser bioinerte, para justificar o revestimento de próteses com esta cerâmica [70]. No entanto, o que faz da alumina um potencial candidato na regeneração óssea é o facto de a alumina ter propriedades mecânicas semelhantes ao osso, apesar de ainda não haver estudos quanto ao desempenho deste material na promoção da

osteointegração. Ainda assim, alguns autores desenvolveram estudos preliminares *in vivo*, e determinaram uma relação que sugere que quanto menor for o tamanho médio das partículas de a alumina, melhor será a adesão celular [65]. A alumina pode ser encontrada em diferentes fases, alpha, theta e delta, sendo que a delta favorece a adesão e a proliferação celular, mas no entanto é muito instável, ao contrário da alumina alpha, que é a mais estável mecânica e termodinamicamente [66].

1.4.8. Biocompatibilidade

1.4.8.1. Estudos *in vitro*

Este tipo de estudos, são importantes para determinar a citotoxicidade do biomaterial. Existem vários métodos para estudar a citotoxicidade dos biomateriais. Neste trabalho procedeu-se ao estudo da citotoxicidade através dos ensaio dos brometos de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] (MTT), [3-(dimetilazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonetil-2H-tetrazólio] (MTS), lactato desidrogenase (LDH) e o ensaio do azul de tripano.

1.4.8.1.1. Ensaio do MTT

O princípio deste ensaio baseia-se na absorção do sal MTT pelas células, sendo reduzido no interior da mitocôndria, pela enzima succinato desidrogenase, a um produto designado de formazano (Figura 3). Este produto é acumulado dentro da célula e extraído através da adição de um solvente apropriado. A quantidade de formazano produzido é determinada espectrofotometricamente a 570nm, e é directamente proporcional ao número de células vivas [62].

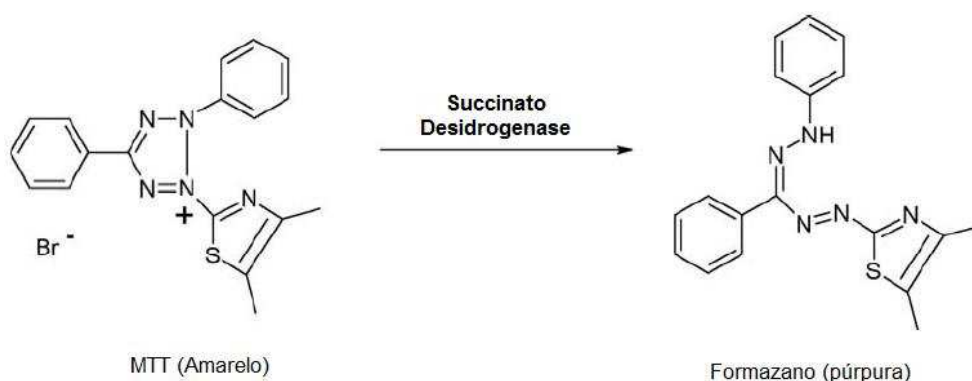


Figura 3: Redução do MTT a formazano através da succinato desidrogenase mitocondrial (adaptado de [78]).

1.4.8.1.2. Ensaio do MTS

O MTS é reduzido pela succinato desidrogenase a formazano. Este método é muito semelhante ao MTT, com a diferença de a quantidade de formazano produzido é determinada espectrofotometricamente a 490. O ensaio do MTS, ao contrário do MTT, pode ser realizado várias vezes ao longo do tempo, na mesma amostra [74].

1.4.8.1.3. Ensaio da LDH

A LDH, que se encontra nas células, é libertada quando a estrutura da membrana citoplasmática é afectada. No meio de cultura celular, esta enzima converte o lactato a piruvato, formando-se nicotinamida adenina dinucliotídeo na forma reduzida (NADH+H⁺). Quando se adiciona ao meio de cultura, lactato e nicotinamida adenina dinucliotídeo na forma oxidada (NAD⁺), a LDH converte-os em piruvato e NADH+H⁺, respectivamente, formando um composto que pode ser quantificado espectrofotometricamente [75].

1.4.8.1.4. Ensaio do azul de tripano

Este ensaio é realizado numa câmara de contagem de Neubauer, onde as células são postas em contacto com o azul de tripano. As células viáveis são impermeáveis a este corante, devido à integridade das membranas citoplasmáticas. Quando as células estão mortas, a sua membrana citoplasmática perde integridade, e o azul de tripano cora as células mortas [63]. Portanto:

$$\%viabilidade = \frac{n^{\circ} \text{ células vivas}}{n^{\circ} \text{ células totais}} \times 100$$

1.4.8.2. Estudos *in vivo*

Os estudos *in vivo*, que são de têm extraordinária importância para o estudo da biocompatibilidade de um biomaterial, uma vez que fornecem dados relevantes sobre as interacções entre os biomateriais e as células. No entanto os resultados destes ensaios não podem substituir os dados obtidos com o estudo de um sistema vivo. Neste trabalho foram usados testes histológicos para verificar a citotoxicidade do material.

1.4.8.2.1. Ensaios histológicos

Neste tipo de ensaios, avalia-se a quantidade e o tipo de células dos componentes da matriz extracelular. Como tal verifica-se a espessura da camada fibrosa que rodeia o biomaterial, após a sua implantação, verificando a presença ou ausência de reacção inflamatória. Além do local de implantação do biomaterial, nos ensaios histológicos são analisados vários tecidos e órgãos, de modo a verificar se as eventuais reacções ao biomaterial, são só locais, ou também sistémicas.

2. Objectivo

O presente trabalho teve como objectivo, a avaliação de um *scaffold* de alumina, para aplicação em regeneração óssea. Deste modo, foi analisado o comportamento celular, na presença do *scaffold*. Para este fim, realizaram-se estudos *in vitro*, através da avaliação da viabilidade/proliferação celular, e posteriormente foram efectuados estudos *in vivo*, onde se procedeu à implantação do biomaterial em animais.

3. Materiais e Métodos

3.1. Síntese do *scaffold* de alumina

Os provetes de alumina foram produzidos através de uma mistura de 3 tipos de alumina. Alumina tabular comercial T60 (Alcoa), disponível em duas classes diferentes (<0,2mm; 0,2-0,5mm) com uma densidade compreendida entre 3,96 - 4 g/cm³, e alumina reactiva (<0,7µm) com uma área específica de superfície (SSA) de 7 m²/g. O *scaffold* foi produzido de acordo com o método descrito na Patente Portuguesa #103432, 2008. A mistura foi elaborada através da adição de 33% de cada tipo de alumina, 1% de ácido cítrico, como antifloculante (0,36 mg/m² SSA), e água desionizada num misturador. Após esta estar homogénea, foram feitos provetes de dimensões 10x30x50 mm³. Seguidamente, foram deixados à temperatura ambiente durante 24 horas, e posteriormente secados a 110°C durante 24 horas. Depois da secagem, foram sinterizados em ciclos de 1600°C numa mufla (Termolab).

3.2. Microscopia electrónica de varrimento (SEM)

A morfologia dos *scaffolds*, com ou sem células, foi caracterizado por SEM. Os *scaffolds* foram fixados durante a noite com glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato salino (PBS) a 4°C. As amostras foram lavadas três vezes com PBS durante 2 minutos e desidratadas com etanol de acordo com um gradiente de 70, 80, 90 e 100%, durante 5 minutos cada. Seguidamente as amostras foram submetidas a uma secagem por ponto crítico de CO₂ e colocadas em suportes adequados. Posteriormente, as amostras foram revestidas a ouro (Emitech K550) e observadas num microscópio electrónico de varrimento (Hitachi S-2700) com uma voltagem de aceleração de 20 quilovolts a diferentes ampliações.

3.3. Cultura de Osteoblastos humanos.

Os osteoblastos humanos usados neste estudo foram adquiridos à American Type Culture Collection (CRL-11372). As células foram semeadas em frascos de cultura de 25 cm³ (Nunc) com 10 ml de meio Dulbecco's Modified Eagle Medium – F12 (DMEM-F12), suplementado com soro fetal bovino (FBS) (10% v/v) inactivado, penicilina G (100 unidades/ml), estreptomicina (100 µg/ml) e anfotericina B (0,25

µg/ml). As amostras foram mantidas numa incubadora a 37°C, numa atmosfera húmida com 5% CO₂. O meio de cultura foi mudado a cada 3 dias, até se obter confluência celular. A confluência foi obtida após 7 dias. Após a obtenção da mesma, as células foram lavadas com PBS/EDTA a 0,025% e adicionou-se tripsina a 0,18% (Sigma). As células foram incubadas durante 3 minutos, após os quais se inactivou a tripsina, adicionando o mesmo volume de meio de cultura. Transferiu-se o conteúdo do frasco de cultura para um tubo falcon, que foi centrifugado a 250xg, durante 5 minutos, à temperatura ambiente. Após rejeição do sobrenadante, o precipitado foi suspenso com meio de cultura. As células foram distribuídas por frascos de cultura, repetindo-se o procedimento.

3.4. Caracterização dos *scaffolds* de alumina

3.4.1. Propriedades mecânicas dos *scaffolds*.

Para avaliar as propriedades físicas dos *scaffolds*, foi determinado o módulo de ruptura (MoR), sujeitando os *scaffolds* a um ensaio de ruptura de três pontos, pelo procedimento descrito e padronizado ASTM C-133. Após o término deste ensaio, as peças partidas, foram usadas para determinar a porosidade, densidade e absorção de água. Foi também determinada a dureza, submetendo os *scaffolds* a testes num aparelho de determinação de dureza – microhardness tester AVK-C2.

3.4.2. Proliferação celular na presença do *scaffold* de alumina.

Para analisar a proliferação celular na presença do *scaffold* de alumina, os osteoblastos foram semeados em placas de cultura de 96 poços (Nunc) durante 24h, na presença do material, numa densidade celular de 5×10^4 células/ml. O crescimento celular foi monitorizado usando um microscópio óptico invertido (Olympus CX41), equipado com uma câmara digital Olympus SP-500 UZ.

3.4.3. Avaliação do perfil citotóxico do *scaffold* de alumina através do método do MTT.

Os osteoblastos foram semeados com uma densidade de 5×10^4 células/ml, em placas de 96 poços (Nunc). Foram adicionados 100 μ L de meio de cultura a cada poço e os *scaffolds*. Posteriormente, foram incubados a 37°C, numa atmosfera húmida de 5% CO₂, durante 24 horas. Foi efectuado o mesmo processo para o controlo negativo, com a excepção da adição de *scaffolds*. Os controlos positivos foram efectuados do mesmo modo, no entanto, foi adicionado a cada poço etanol a 96%.

Após 24 horas de incubação, foi adicionado a cada poço 100 μ l de MTT. As placas foram colocadas na incubadora durante 4 horas, e findo esse tempo, foi adicionado a cada poço 100 μ l de uma solução de isopropanol/HCl a 0,04N, para dissolver os cristais de formazano formados. As placas foram colocadas à temperatura ambiente durante 90 minutos, no escuro. Posteriormente, foi transferido 50 μ l do conteúdo de cada poço para uma placa de 96 poços (Nunc) e efectuada a leitura da absorvância a 570 nm, através de um leitor de microplacas (Biorad Microplate Reader Benchmark). Em cada ensaio foram usadas pelo menos 5 amostras.

3.5. Ensaio *in vivo*

Nestes ensaios foram utilizados ratos Wistar fêmeas, com um peso compreendido entre 200 e 230g, (com idade de 12 semanas). Cada animal foi anestesiado com uma injeção intraperitoneal (40 mg/kg quetamina, 5 mg/kg xilazina), de modo a serem submetidos a cirurgia.

Estes ensaios envolveram duas fases. Na primeira fase, foram utilizados 18 animais, divididos igualmente por dois grupos (teste e controlo). Os animais em questão foram submetidos a uma cirurgia que consistiu na inserção do material subcutaneamente no dorso, no caso do grupo teste. No caso do grupo controlo, foi apenas elaborado um corte e respectiva sutura, sem inserção de qualquer material.

Na segunda fase, foram utilizados 24 ratos Wistar fêmeas, que foram separadas em dois grupos (teste e controlo), apresentado cada um 12 animais. Em todos os animais foi criado um defeito ósseo na calote. No grupo controlo, esse defeito não foi

preenchido com qualquer material, enquanto no grupo teste houve inserção do *scaffold* produzido.

Após a cirurgia, os animais foram mantidos em jaulas individuais e alimentados com alimentação comercial e água *ad libitum*. Os animais foram sacrificados após 3, 7 (para os animais das duas fases), 14 e 21 dias (apenas para os animais utilizados na segunda fase).

3.5.1. Estudos histológicos

Após necrópsia dos animais, foram retirados os órgãos vitais (cérebro, coração, pulmão, fígado, baço e rins) de todos os animais. No caso dos animais onde foram efectuados os implantes subcutâneos também foi retirada a pele. Nos animais onde foi efectuado o defeito da calote, foi recolhida uma amostra de tecido onde foi realizada a lesão. Os órgãos foram fixados em formalina e posteriormente, embebidos em parafina. Foram obtidas secções de 3mm, de cada bloco de parafina e estas, foram seguidamente coradas com hematoxilina e eosina (H&E). Após elaboração das preparações histológicas, estas foram avaliadas por microscopia óptica, utilizando um software específico da Olympus.

3.6. Análise estatística

Foi utilizado um conjunto de amostras de cada um dos grupos e foram analisados os dados obtidos no ensaio do MTT. Os resultados obtidos são expressos como média \pm desvio padrão. A significância estatística foi calculada usando a análise de variância one-way ANOVA com teste de Dunnet's post hoc, pelo programa SigmaStat. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

4. Resultados e Discussão

4.1. Caracterização do *scaffold* de alumina

4.1.1. Análise Macroscópica

Os *scaffolds* de alumina produzidos, apresentam uma cor branca opaca, com uma superfície rugosa e irregular, sendo também visível alguma porosidade superficial.



Figura 4: Fotografia do *scaffold* de alumina

4.1.2. Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas do *scaffold* são factores importantes a ter em conta, na produção de um biomaterial para ser usado como substituto ósseo. Neste caso, é imprescindível a verificação do balanço conseguido entre a porosidade, MoR e a densidade.

A porosidade é um factor muito importante na superfície da alumina, para a implantação e crescimento de osteoblastos [64, 65]. No entanto, a porosidade aumenta na medida em que a densidade, a resistência e a dureza diminuem. Como tal, é importante encontrar um meio-termo entre estes factores. No caso deste *scaffold* a porosidade obtida foi de $6,9 \pm 1,7\%$ (tabela 3). Ao analisar a densidade, é de notar, que comparando o valor da mesma ($3,2 \pm 0,06 \text{ g/cm}^3$) com o valor do material em pó ($3,98 \text{ g/cm}^3$), há um decréscimo, que apesar de ligeiro se deve ao facto do *scaffold* ser poroso. No entanto, é de notar que ainda assim, esta densidade é superior à densidade óssea de um indivíduo adulto ($1,9 \text{ g/cm}^3$) [66].

Ao sinterizar o material foi possível obter valores de dureza e MoR bastante elevados, o que fazem deste biomaterial um bom candidato a substituto ósseo, uma vez que a resistência e o desgaste aos quais o material é sujeito são elevadas. A absorção de água é também um factor importante uma vez que permite às células aderirem ao *scaffold*, e promoverem trocas iónicas através deste.

Tabela 3: Propriedades mecânicas do *scaffold* de alumina, representando a média \pm desvio padrão da dureza, módulo de ruptura, densidade, porosidade e absorção de água.

<i>Tipo de teste</i>	<i>Resultado</i>
Dureza [MPa]	528,3 \pm 48,5
Módulo de Ruptura [MPa]	>55
Densidade [g/cm ³]	3,2 \pm 0,06
Porosidade [%]	6,9 \pm 1,7
Absorção de água [%]	2,2 \pm 0,4

4.1.3. Ensaios de Citotoxicidade

Para avaliar a citotoxicidade deste *scaffold*, as células foram colocadas em contacto com o material. A figura 6 mostra os resultados relativos à viabilidade/proliferação celular (ensaio do MTT). O controlo negativo (K⁻) representa (figura 5) 100% de viabilidade celular. Através da análise do gráfico pode verificar-se que os resultados são estatisticamente significativos ($p < 0,01$), entre o controlo positivo (K⁺) e o controlo negativo; e entre o K⁺ e a amostra de células em contacto com o *scaffold*. Apesar da viabilidade celular dos osteoblastos em presença do *scaffold* (Cél/SA) ser superior ao K⁻, esta relação não é estatisticamente significativa. Contudo permite afirmar que este material não tem um efeito tóxico agudo nos osteoblastos. Este resultado contraria algumas fontes bibliográficas, que revelam a suposta citotoxicidade da alumina [73]. No entanto o presente material tem um processo de fabrico inovador, o que poderá ser a justificação para os resultados obtidos *in vitro*.

O controlo positivo (K⁺) revela a morte celular, uma vez que as células estiveram em contacto com etanol a 96% (morfologia esférica como se pode observar na figura 6).

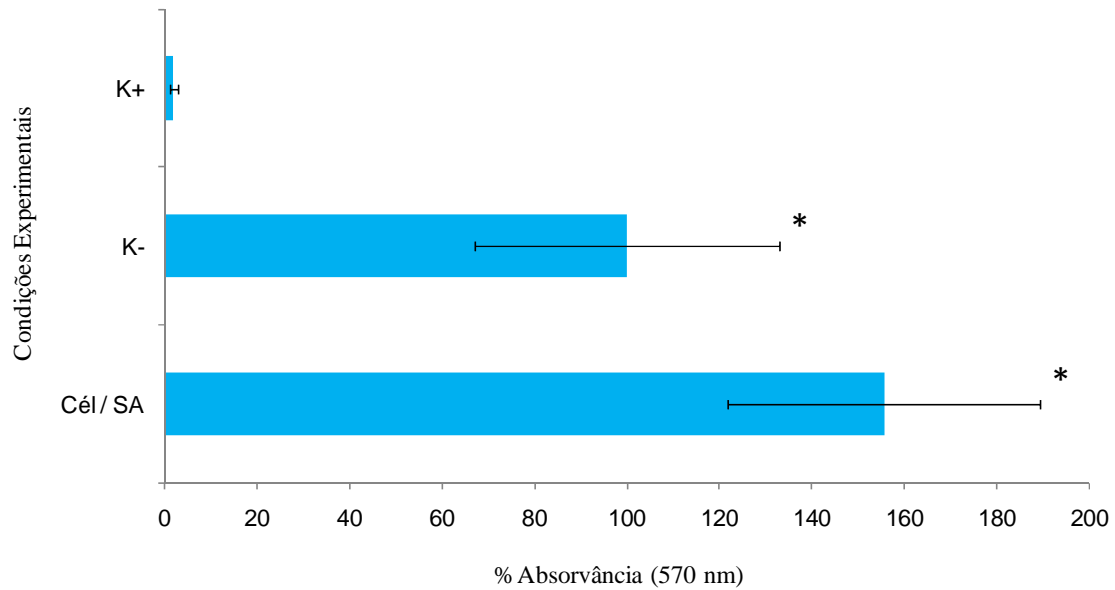


Figura 5: Ensaio de citotoxicidade *in vitro* pelo método do MTT. K⁺, controlo positivo; K⁻, controlo negativo; Cél/SA, osteoblastos humanos na presença de *scaffold* de alumina. *Cél/SA versus K⁺, e K⁻ versus K⁺. (p<0,05, one-way ANOVA com o teste Dunnet post-hoc).

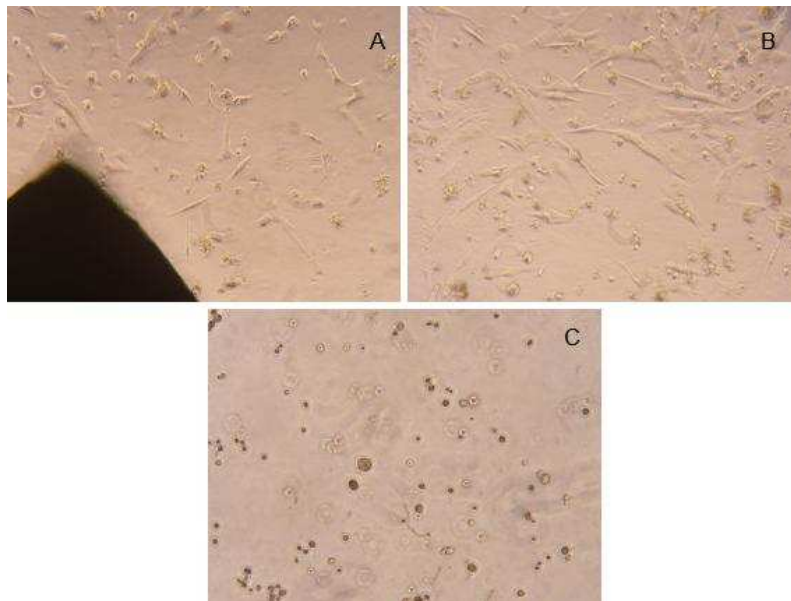


Figura 6: Imagens obtidas por microscopia óptica invertida de osteoblastos em contacto com o *scaffold* de alumina ao fim de 24 horas (A); controlo negativo (B); controlo positivo (C).

4.1.4. Microscopia electrónica de varrimento

As imagens de SEM revelam que o *scaffold* possui uma estrutura interna porosa (figura 7-A). Juntamente com a análise macroscópica, é possível então verificar que o *scaffold* revela as características de porosidade e rugosidade, essenciais, para permitir o crescimento e adesão dos osteoblastos. Devido a estas propriedades, pode verificar-se na figura 7-B, a existência de adesão celular ao material, contrariando mais uma vez

vários autores que argumentavam a alumina como sendo completamente inerte e não permitindo qualquer tipo de contacto directo desta com células [67-69].

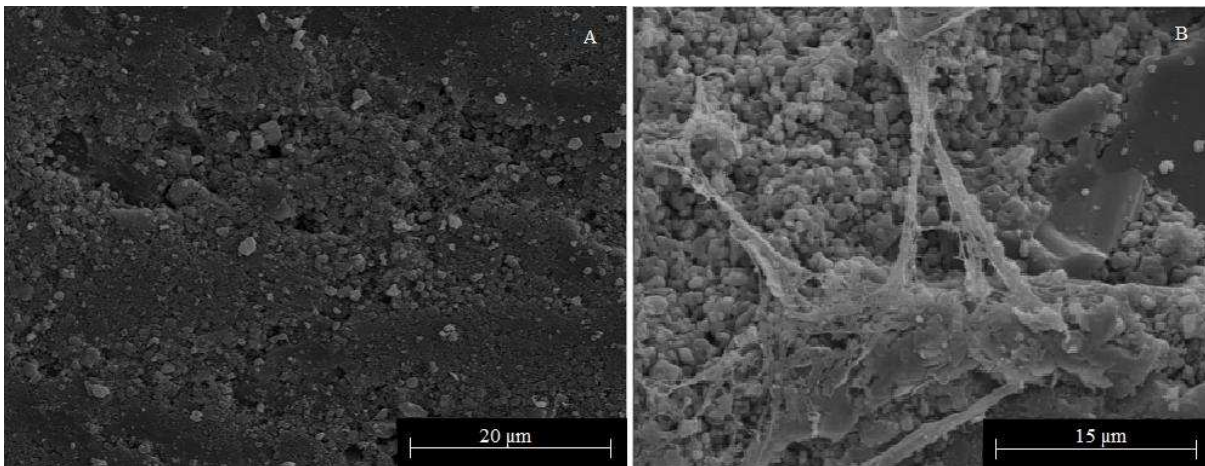


Figura 7: Imagens de SEM (A) da superfície do *scaffold* de alumina sem células com ampliação a 2000x e (B) osteoblasto aderido à superfície do *scaffold* com ampliação a 3000x.

4.2. Ensaio *in vivo*

Na figura 8 são apresentadas imagens dos ensaios *in vivo*. Nestes ensaios não se observam diferenças macroscópicas nos animais teste e nos animais controlo. Estes ensaios, complementam a informação obtida através dos ensaios *in vitro*, uma vez que mostram que o *scaffold* não exerce efeitos tóxicos no organismo. O *scaffold* tem uma grande estabilidade termodinâmica, devido ao processo de fabrico, nomeadamente aos ciclos de sinterização [74]. Devido a essa estabilidade, e ao facto da alumina se encontrar no estado de oxidação mais elevado, o organismo não reduz a alumina (Al_2O_3) a iões alumínio (Al^{3+}). Assim, a alumina permanece no organismo nesse mesmo estado de oxidação, e não na forma de alumínio, o que a acontecer seria prejudicial aos tecidos, devido não só à conhecida toxicidade deste metal nas células, mas também à capacidade que os iões alumínio têm de competir com o cálcio e consequentemente provocam a descalcificação óssea [71, 72].

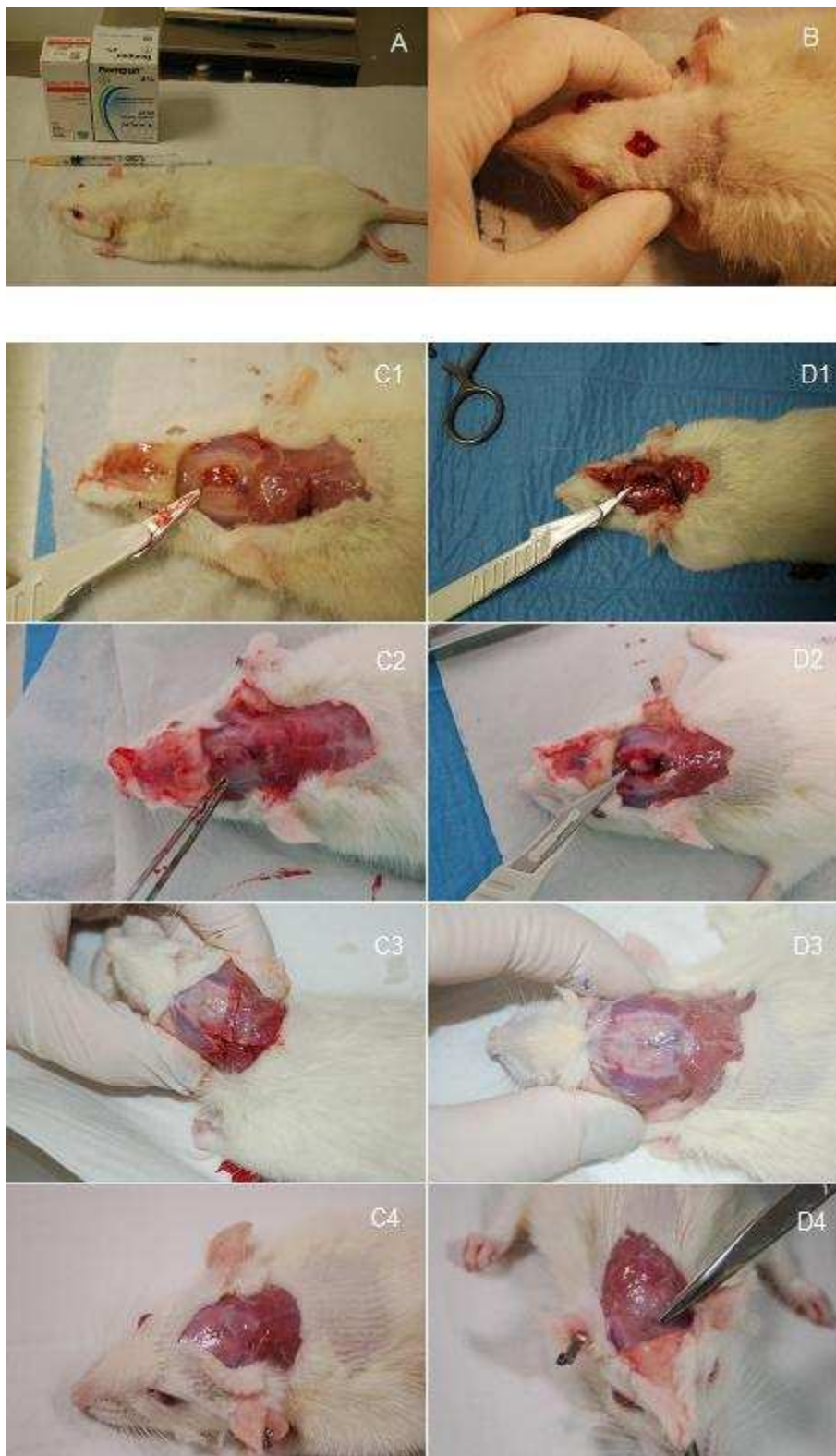


Figura 8: Imagens dos ensaios *in vivo*, A - Rato Wistar antes da execução do defeito ósseo na calote; B – Inserção do material no defeito ósseo da calote; C1-C4 – Remoção da calote com o defeito ósseo e o *scaffold* através do sacrifício do grupo teste aos dias 3, 7, 14 e 30 dias, respectivamente; D1-D4 – Remoção da calote com o defeito ósseo através do sacrifício do grupo controle aos dias 3, 7, 14 e 30 dias, respectivamente.

4.3. Análise histológica

A análise histológica foi realizada nas lâminas dos órgãos vitais (cérebro, pulmão, coração, rim, baço e fígado), e na amostra de tecido ósseo obtida da calote com o defeito ósseo. Após a análise das lâminas histológicas dos órgãos vitais, pode verificar-se que não houve alterações entre o grupo controlo e o grupo teste, o que indica a ausência de reacção sistémica ao biomaterial. Já nas lâminas obtidas da calote, verificou-se que havia diferenças entre os dois grupos. Em nenhum dos controlos (3, 7, 14 e 30 dias) se verificou qualquer tipo de reacção inflamatória (tabela 3). No entanto, no caso dos grupos teste, é possível verificar que aos 3 dias há presença de reacção inflamatória severa dos tecidos, quando em contacto com o *scaffold*, como é possível verificar na figura 9. Este tipo de reacção é comum nas inserções de biomateriais nos tecidos. Contudo, é possível analisar que aos dias 14 e 21 essa reacção ainda é visível, com monócitos presentes, o que indica a progressão da resposta inflamatória. Também é possível verificar que não houve qualquer osseointegração do material, e ao dia 30, há uma ligeira cicatrização, fruto da ausência do *scaffold* no local de implante.

Apesar do método de fabrico ser distinto, a alumina é também usada no revestimento de próteses femorais e dentárias, que são usadas por milhares de pessoas em todo o mundo. Uma vez que a alumina nesses dispositivos está em contacto directo com os tecidos, será imperativo aferir as propriedades destes dispositivos para integração directa no tecido ósseo, por exemplo através da análise histológica de tecidos em contacto com próteses usadas.

Tabela 3: Observações obtidas pela análise das lâminas histológicas das amostras da calote dos grupos de controlo e teste.

Dias	Grupo	Observações
3	Controlo	Sem sinais de inflamação; ligeira reacção periosteal (formação de tecido ósseo)
	Teste	Inflamação severa; necrose óssea; reacção periosteal intensa.
7	Controlo	Tecido fibroso com angiogénese; presença de tecido de granulação e detritos sem reacção.
	Teste	Material é desfragmentado e dispersado; pequeno foco de tecido de granulação; reacção periosteal.
14	Controlo	Presença de um espaçamento entre os topos ósseos; reacção periosteal; tecido fibroso ligeiro.
	Teste	Presença de um espaçamento entre os dois topos ósseos, onde esteve o material; grande quantidade de tecido de granulação.
30	Controlo	Em ambos os fragmentos observa-se remodelação óssea, áreas espessas e sem reacção periosteal
	Teste	2 fragmentos ósseos com espaçamentos ligados por tecido conjuntivo; segue cicatrização tardia

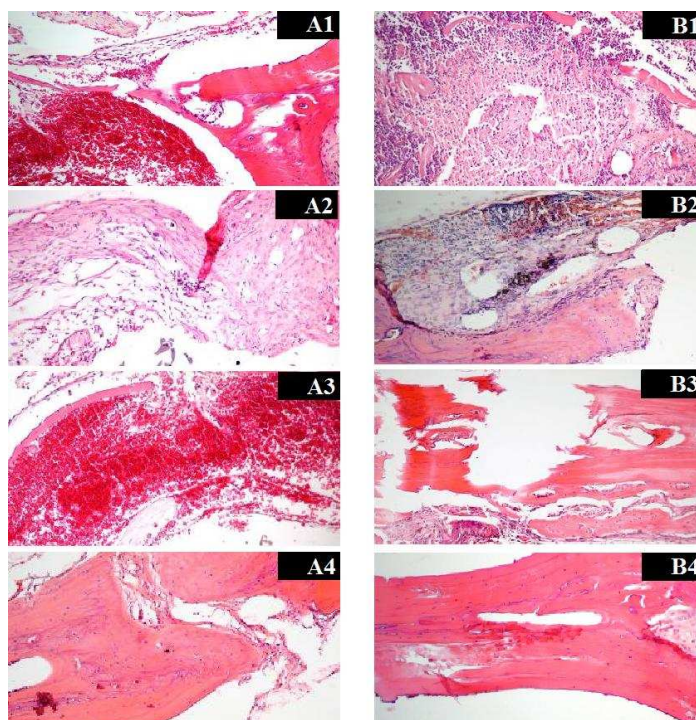


Figura 9: Imagens histológicas do processo de regeneração do tecido ósseo da calote. A1-A4 – Amostras controlo, sem inserção do biomaterial no defeito ósseo aos dias 3, 7, 14 e 30 dias, respectivamente; B1-B4 – Amostras teste com inserção do biomaterial no defeito ósseo aos dias 3, 7, 14 e 30 dias, respectivamente. Ampliação a 100x.

5. Conclusões e Perspectivas Futuras

O presente trabalho teve como objectivo a criação de um biomaterial de alumina, avaliar a sua biocompatibilidade e a sua aplicabilidade na regeneração do tecido ósseo, através de estudos de caracterização mecânica e estudos biológicos.

Os resultados obtidos indicaram que o material tem características mecânicas que se adequam à sua aplicação em engenharia de tecidos (nomeadamente na regeneração do tecido ósseo). Os ensaios *in vitro*, permitem afirmar que o material é não citotóxico. No entanto, neste estudo foram também realizados estudos *in vivo* ao longo de 30 dias. Os resultados dos ensaios *in vivo*, indicam que o *scaffold* de alumina despoleta uma reacção inflamatória severa, quer a curto, quer a longo prazo. Estes resultados levantam a questão da aplicabilidade deste biomaterial em dispositivos médicos, alguns dos quais são uso corrente em meio clínico, nomeadamente no revestimento de próteses dentárias e femorais.

No futuro, será interessante melhorar as propriedades deste *scaffold*, de forma a aproveitar as suas propriedades mecânicas, mas sem que o mesmo despolete reacções adversas nos tecidos. Como tal, o próximo passo será ligar moléculas de adesão celular à superfície do material, ou alterá-lo quimicamente de forma a torná-lo mais bioactivo, e mais biocompatível, como é o caso da hidroxilação superficial. Outro rumo a seguir será criar o *scaffold* por impressão 3D de maneira a controlar a porosidade e a geometria, que são dois factores muito importantes na biocompatibilidade de um biomaterial, revestindo-o de substâncias altamente biocompatíveis, como é o caso do quitosano ou o alginato.

6. Bibliografia

- [1] Junqueira, L. C.; Carneiro, J (2004). “Histologia básica”, 10th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- [2] Seeley, Stephens, Tate (2004). “Anatomy and Physiology”, Sixth Edition, The McGraw-Hill Companies.
- [3] Dallas, S. L., and Bonewald, L. F. (2010) “Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte”, *Ann N Y Acad Sci* 1192, 437-443.
- [4] Jensen, E. D., Gopalakrishnan, R., and Westendorf, J. J. (2010) “Regulation of gene expression in osteoblasts”, *Biofactors* 36, 25-32.
- [5] Takayanagi, H. (2010) “New immune connections in osteoclast formation”, *Ann N Y Acad Sci* 1192, 117-123.
- [6] Datta, H. K., Ng, W. F., Walker, J. A., Tuck, S. P., and Varanasi, S. S. (2008) “The cell biology of bone metabolism”, *J Clin Pathol* 61, 577-587.
- [7] Gordon, J. A., Tye, C. E., Sampaio, A. V., Underhill, T. M., Hunter, G. K., and Goldberg, H. A. (2007) “Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro”, *Bone* 41, 462-473.
- [8] Yamaguchi, A., Komori, T., and Suda, T. (2000) “Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1”, *Endocr Rev* 21, 393-411.
- [9] Di Stefano, D. A., Artese, L., Iezzi, G., Piattelli, A., Pagnutti, S., Piccirilli, M., and Perrotti, V. (2009) “Alveolar ridge regeneration with equine spongy bone: a clinical, histological, and immunohistochemical case series”, *Clin Implant Dent Relat Res* 11, 90-100.
- [10] Giraud Guille, M. M., Mosser, G., Helary, C., and Eglin, D. (2005) “Bone matrix like assemblies of collagen: from liquid crystals to gels and biomimetic materials”, *Micron* 36, 602-608.
- [11] Tran, N., and Webster, T. J. (2009) “Nanotechnology for bone materials”, *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 1, 336-351.
- [12] Oestreich, A. E. (2004) “The acrophysis: a unifying concept for understanding enchondral bone growth and its disorders. II. Abnormal growth”, *Skeletal Radiol* 33, 119-128.
- [13] Horiuchi, N., and Maeda, T. (2006) “Statins and bone metabolism”, *Oral Dis* 12, 85-101.
- [14] Choi, I. H., Chung, C. Y., Cho, T. J., and Yoo, W. J. (2002) “Angiogenesis and mineralization during distraction osteogenesis”, *J Korean Med Sci* 17, 435-447.
- [15] Walsh, N. C., and Gravallesse, E. M. (2010) “Bone remodeling in rheumatic disease: a question of balance”, *Immunol Rev* 233, 301-312.

- [16] Woo, D. G., Lee, B. Y., Lim, D., and Kim, H. S. (2009) "Relationship between nutrition factors and osteopenia: Effects of experimental diets on immature bone quality", *J Biomech* 42, 1102-1107.
- [17] Emerton, K. B., Hu, B., Woo, A. A., Sinofsky, A., Hernandez, C., Majeska, R. J., Jepsen, K. J., and Schaffler, M. B. (2010) "Osteocyte apoptosis and control of bone resorption following ovariectomy in mice", *Bone* 46, 577-583.
- [18] Ukinc, K. (2009) "Severe osteomalacia presenting with multiple vertebral fractures: a case report and review of the literature", *Endocrine* 36, 30-36.
- [19] Boivin, G., and Meunier, P. J. (2003) "The mineralization of bone tissue: a forgotten dimension in osteoporosis research", *Osteoporos Int* 14 Suppl 3, S19-24.
- [20] Takahashi, N. (2002). "Cells of Bone. Osteoclast generation". In: Eds. Bilezikian, J. P., Raisz, L. G. e Rodan, G. A., *Principles of Bone Biology*, Academic Press, Vol. I, 2nd Ed., San Diego.
- [21] Fernandes, M. H. R. (1998). "Mecanismos de regulação do metabolismo ósseo". *Acta Medica Portuguesa* 11, 41-52.
- [22] Tsurushima, H., Marushima, A., Suzuki, K., Oyane, A., Sogo, Y., Nakamura, K., Matsumura, A., and Ito, A. (2010) "Enhanced bone formation using hydroxyapatite ceramic coated with fibroblast growth factor-2", *Acta Biomater* 6, 2751-2759.
- [23] Guanabens, N., Garrido, J., Gobbo, M., Piga, A. M., del Pino, J., Torrijos, A., Descalzo, M. A., Garcia, F. J., Cros, J. R., Carbonell, J., Perez, M. R., Tornero, J., and Carmona, L. (2008) "Prevalence of Paget's disease of bone in Spain", *Bone* 43, 1006-1009.
- [24] Dorozhkin, S. V. (2010) "Bioceramics of calcium orthophosphates", *Biomaterials* 31, 1465-1485.
- [25] Muster D. (1990) "Themistocles Gluck, Berlin 1890: a Pioneer of Multidisciplinary Applied Research into Biomaterials for Endoprostheses" *Bulletin of the history of dentistry*, 38: 3-6.
- [26] Mahalingam, K., and Reidy, D. (1996) "Smith-Petersen vitallium mould arthroplasty: a 45-year follow-up", *J Bone Joint Surg Br* 78, 496-497.
- [27] Ratner, B.D., Hoffman, A.S. (1996) "Biomaterials Science, an Introduction to Materials in Medicine." California, US. *Academic Press*; ch. 5 and 6.
- [28] Batchelo A.W., Chandrasekaran, M. (2004) "Service Characteristics of Biomedical Materials and Implants." *Imperial College Press*, 57 Shelton Street Covent Garden London; Vol. 3.
- [29] Kim, B. S., Baez, C. E., and Atala, A. (2000) "Biomaterials for tissue engineering", *World J Urol* 18, 2-9.

- [30] Driemel, O., Braun, S., Muller-Richter, U. D., Behr, M., Reichert, T. E., Kunkel, M., and Reich, R. (2009) "Historical development of alloplastic temporomandibular joint replacement after 1945 and state of the art", *Int J Oral Maxillofac Surg* 38, 909-920.
- [31] Czernuszka J. (1996) "Biomaterials under the microscope." *Materials World*, 4, 452-453.
- [32] Niinomi M. (2008) "Metallic biomaterials." *Journal of Artificial Organs*, 11, 105-110.
- [33] Jones D.W. (1996) "Ceramic Biomaterials" *Key Engineering Materials* 122, 345-386
- [34] Griffith, L. G. (2000) "Polymeric biomaterials." *Acta Materialia* 48, 263-277.
- [35] Boccaccini, A. R., and Blaker, J. J. (2005) "Bioactive composite materials for tissue engineering scaffolds", *Expert Rev Med Devices* 2, 303-317.
- [36] Berbecaru, C., Alexandru, H.V. (2009) "Bioglass thin films for biomimetic implants." *Applied Surface Science* 255, 5476-5479.
- [37] Kokubo, T. (1991). "Bioactive glass ceramics: properties and applications." *Biomaterials* 12, 155-163.
- [38] Domingues, Z. R., Cortés, M. E. (2004) "Bioactive glass as a drug delivery system of tetracycline and tetracycline associated with [beta]-cyclodextrin." *Biomaterials* 25, 327-333.
- [39] Wang, P. H., Pan, C-Y. (2000). "Polymer metal composite microspheres: Preparation and characterization of poly(St-co-AN)Ni microspheres." *European Polymer Journal* 36: 2297-2300.
- [40] Nair, L. S., Laurencin C.T. (2007) "Biodegradable polymers as biomaterials." *Progress in Polymer Science* 32, 762-798.
- [41] Vert, M. (2007) "Polymeric biomaterials: Strategies of the past vs. strategies of the future." *Progress in Polymer Science* 32, 755-761.
- [42] Wu, M.-C., Liao, H-C (2009). "Nanostructured polymer blends (P3HT/PMMA): Inorganic titania hybrid photovoltaic devices." *Solar Energy Materials and Solar Cells* 93, 961-965.
- [43] Kurtz, S. M. (2009). "Composite UHMWPE Biomaterials and Fibers". *Biomaterials Handbook* 2nd Ed.. M. K. Steven and Ph.D. Boston, Academic Press: 249-258.
- [44] Bahna, P., Dvorak, T. et al. (2007). "Orthopaedic metal devices coated with a novel antiseptic dye for the prevention of bacterial infections." *International Journal of Antimicrobial Agents* 29, 593-596.

- [45] Binyamin, G., Shafi, B.M. et al. (2006). "Biomaterials: A primer for surgeons." *Seminars in Pediatric Surgery* 15, 276-283.
- [46] Zambonin, G., Grano G.(1995). "Biomaterials in orthopaedic surgery: effects of different hydroxyapatites and demineralized bone matrix on proliferation rate and bone matrix synthesis by human osteoblasts." *Biomaterials* 16, 397-402.
- [47] Ballo, A. M., Akca, E. A., Ozen, T., Lassila, L., Vallittu, P. K., and Narhi, T. O. (2009) "Bone tissue responses to glass fiber-reinforced composite implants – a histomorphometric study", *Clin Oral Implants Res* 20, 608-615.
- [48] Cain, P. (2005). "Learning from tough teeth: Biomaterials." *Materials Today* 8: 12-14.
- [49] Jones, F. H. (2001). "Teeth and bones: applications of surface science to dental materials and related biomaterials." *Surface Science Reports* 42, 75-205.
- [50] Chen, Q.-Z., Harding, S.E. (2008). "Biomaterials in cardiac tissue engineering: Ten years of research survey." *Materials Science and Engineering: R: Reports* 59, 1-37.
- [51] Xu, F. J., Neoh, K.J. (2009). "Bioactive surfaces and biomaterials via atom transfer radical polymerization." *Progress in Polymer Science* 34, 719-761.
- [52] Zhu, J. (2010). "Bioactive modification of poly(ethylene glycol) hydrogels for tissue engineering." *Biomaterials* 31, 4639-4656.
- [53] Jung, M., Kim, S.U. (2009). "Immobilization of biomaterials on nanopatterned surface using nanoporous alumina for biodevices." *Current Applied Physics* 9, 111-114.
- [54] La Flamme, K. E., Popat, K. C. (2007). "Biocompatibility of nanoporous alumina membranes for immunoisolation." *Biomaterials* 28, 2638-2645.
- [55] Malik, M. A., Puleo, D. A., Bizios, R., and Doremus, R. H. (1992) "Osteoblasts on hydroxyapatite, alumina and bone surfaces in vitro: morphology during the first 2 h of attachment", *Biomaterials* 13, 123-128.
- [56] Roualdes, O., Duclos, M. E., Gutknecht, D., Frappart, L., Chevalier, J., and Hartmann, D. J. (2010) "In vitro and in vivo evaluation of an alumina-zirconia composite for arthroplasty applications", *Biomaterials* 31, 2043-2054.
- [57] Morita, Y., Nakata, K., Kim, Y. H., Sekino, T., Niihara, K., and Ikeuchi, K. (2004) "Wear properties of alumina/zirconia composite ceramics for joint prostheses measured with an end-face apparatus", *Biomed Mater Eng* 14, 263-270.
- [58] Fischer, H., Niedhart, C., Kaltenborn, N., Prange, A., Marx, R., Niethard, F. U., and Telle, R. (2005) "Bioactivation of inert alumina ceramics by hydroxylation", *Biomaterials* 26, 6151-6157.

- [59] Dammaschke, T., Gerth, H. U., Zuchner, H., and Schafer, E. (2005) "Chemical and physical surface and bulk material characterization of white ProRoot MTA and two Portland cements", *Dent Mater* 21, 731-738.
- [60] Sahithi, K., Swetha, M., Ramasamy, K., Srinivasan, N., and Selvamurugan, N. (2010) "Polymeric composites containing carbon nanotubes for bone tissue engineering", *Int J Biol Macromol* 46, 281-283.
- [61] Place, E. S., Evans, N. D., and Stevens, M. M. (2009) "Complexity in biomaterials for tissue engineering", *Nat Mater* 8, 457-470.
- [62] Ciapetti, G., Cenni, E., Pratelli, L., and Pizzoferrato, A. (1993) "In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay", *Biomaterials* 14, 359-364.
- [63] Vinardell, M. P., and Garcia, L. (2000) "The quantitative chloroallantoic membrane test using trypan blue stain to predict the eye irritancy of liquid scintillation cocktails", *Toxicol In Vitro* 14, 551-555.
- [64] Popat, K. C., Leary Swan, E. E., Mukhatyar, V., Chatvanichkul, K. I., Mor, G. K., Grimes, C. A., and Desai, T. A. (2005) "Influence of nanoporous alumina membranes on long-term osteoblast response", *Biomaterials* 26, 4516-4522.
- [65] Webster, T. J., Hellenmeyer, E. L., and Price, R. L. (2005) "Increased osteoblast functions on theta + delta nanofiber alumina", *Biomaterials* 26, 953-960.
- [66] Leslie, W. D., and Ward, L. M. (2004) "Bone density monitoring with the total hip site: time for a re-evaluation?", *J Clin Densitom* 7, 269-274.
- [67] Hayashi, K., Inadome, T., Tsumura, H., Mashima, T., and Sugioka, Y. (1993) "Bone-implant interface mechanics of in vivo bio-inert ceramics", *Biomaterials* 14, 1173-1179.
- [68] Kim, Y. H., Yoon, S. H., and Kim, J. S. (2007) "Changes in the bone mineral density in the acetabulum and proximal femur after cementless total hip replacement: alumina-on-alumina versus alumina-on-polyethylene articulation", *J Bone Joint Surg Br* 89, 174-179.
- [69] Hamadouche, M. (2006) "Alumina-on-Alumina Articulation in Total Hip Arthroplasty: From Bench-side to Bedside", *Seminars in Arthroplasty* 17, 125-133.
- [70] Kodama, A., Bauer, S., Komatsu, A., Asoh, H., Ono, S., and Schmuki, P. (2009) Bioactivation of titanium surfaces using coatings of TiO₂ nanotubes rapidly pre-loaded with synthetic hydroxyapatite, *Acta Biomaterialia* 5, 2322-2330.
- [71] Matsumoto, H. (2000) "Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants", *International Review of Cytology*, 1-46.
- [72] Poschenrieder, C., (2008) "A glance into aluminum toxicity and resistance in plants", *Science of The Total Environment* 400, 356-368.

[73] Germain, M. A., Hatton, A., Williams, S., Matthews, J. B., Stone, M. H., Fisher, J., and Ingham, E. (2003) “Comparison of the cytotoxicity of clinically relevant cobalt-chromium and alumina ceramic wear particles in vitro”, *Biomaterials* 24, 469-479.

[74] Bowen, P., Carry, C., Luxembourg, D., and Hofmann, H. (2005) Colloidal processing and sintering of nanosized transition aluminas, *Powder Technology* 157, 100-107.

[75] Promega TB245 (2008). CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. © 2008 Promega Corporation.

[76] Watanabe, W., Sudo, K., Asawa, S., Konno, K., Yokota, T., and Shigeta, S. (1995) “Use of lactate dehydrogenase to evaluate the anti-viral activity against influenza A vírus”, *J Virol Methods* 51, 185-191.

[77] <http://courses.washington.edu/bonephys/Gallery/BMU2.jpg>, acessado em 24/06/10.

[78] <http://www.biocompare.com/images/bc/006/ArticleImages/>, acessado a 22/06/10.