

**GRACIELA CRISTINA CANDIDO**

**RESPOSTA TECIDUAL AO IMPLANTE DE ZIRCÔNIA GRANULADA EM  
DEFEITOS ÓSSEOS NA CALVÁRIA DE RATOS.**

**MARINGÁ  
2011**

**GRACIELA CRISTINA CANDIDO**

**RESPOSTA TECIDUAL AO IMPLANTE DE ZIRCÔNIA GRANULADA EM  
DEFEITOS ÓSSEOS NA CALVÁRIA DE RATOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Estadual de Maringá, para obtenção do grau de Mestre em Odontologia Integrada.

**Orientador: Prof. Dr. Liogi Iwaki  
filho**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.  
Luzmarina Hernandes**

**MARINGÁ  
2011**

**GRACIELA CRISTINA CANDIDO**

**Resposta tecidual ao implante de zircônia granulada  
em defeitos ósseos na calvária de ratos.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, da  
Universidade Estadual de Maringá, para obtenção do grau de Mestre em Odontologia  
Integrada.

Aprovada em 11 de Março de 2011

BANCA EXAMINADORA

---

**Prof. Dr. Glaykon Alex Vitti Stabile**

Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Raquel Maçal Natali**

Universidade Estadual de Maringá – UEM

---

**Prof. Dr. Liogi Iwaki filho**

Universidade Estadual de Maringá – UEM

---

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR., Brasil)

C217r

Candido, Graciela Cristina

Resposta tecidual ao implante de zircônia granulada em defeitos ósseos na calvária de ratos / Graciela Cristina Candido. -- Maringá, 2011.

32 f. : figs. col., tabs.

**Orientador: Prof. Dr. Liogi Iwaki Filho.**

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luzmarina Hernandes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Odontologia Integrada, 2011

1. Zircônio - Implante. 2. Enxerto ósseo. 3. Osteogênese. 4. Histopatologia. 5. Materiais biocompatíveis. I. Iwaki Filho, Liogi, orient. II. Hernandes, Luzmarina. III. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Odontologia Integrada. IV. Título.

CDD 22.ed. 617.695

Dedico este trabalho,

Aos meus pais, **Tania Regina Tonin Candido** e **José Candido**,

Obrigada por terem me dado condições de sempre poder ir mais longe a todas as etapas da minha vida, por não medirem esforços para eu ir em busca dos meus sonhos. Foi por vocês que cheguei até aqui e é por vocês que sou o que sou hoje. O meus sinceros agradecimentos.

A minha irmã, **Aline Gabriela Candido**,

Por dividir as aflições e dificuldades da área, pela amizade, companheirismo e atenção. Muito obrigada.

Ao meu namorado, **Alysson Ricardo Bosso**,

Por ter permanecido ao meu lado, incentivando-me a percorrer este caminho, por compartilhar angústias e dúvidas estendendo sua mão em momentos difíceis. Por estar presente desde os primeiros dias tanto do mestrado quanto da pesquisa, muitas vezes me ajudando com os animais e trabalhos. Você foi Fundamental na execução deste trabalho.

# *Agradecimento Especial*

---

A Deus,

Porque Ele guia meu caminho, me confortando nos momentos difíceis e colocando pessoas iluminadas na minha vida, estando sempre ao meu lado.

# *Agradecimentos*

---

Ao orientador **Dr. Liogi Iwaki Filho**

Obrigada pela oportunidade. Pela sua orientação continuada da graduação, dedicação e confiança em mim depositada pra a realização desse trabalho.

A co-orientadora **Dr<sup>a</sup>. Luzmarina Hernandez**.

Obrigada pela oportunidade. Exemplo de profissional, de dedicação ao ensino e aos seus orientados, sempre estando ao lado e guiando em todas as etapas da pesquisa. Posso dizer que é uma grande honra tê-la como co-orientadora e como amiga. Sua capacidade de motivar e de lutar sempre pela pesquisa e pelo aluno faz aumentar ainda mais a minha admiração e respeito por você. A jornada foi árdua, porém o mais importante é que conseguimos superar. Muito obrigada pelo incentivo, consideração e amizade.

A banca examinadora **Dr. Glaykon Alex Vitti Stabile** e **Dr<sup>a</sup>. Maria Raquel Maçal Natali**, por se dispuserem a estar presentes tanto na qualificação quanto na defesa deste trabalho enriquecendo-o com as suas considerações. Muito Obrigada.

Aos Professores **Dr. Adilson Ramos** e **Dr<sup>a</sup>. Renata Pascotto**, coordenadores do Programa de Pós-graduação do Departamento de Odontologia da UEM. O meu agradecimento pela oportunidade de ter cursado o mestrado neste departamento e na melhor Universidade do Paraná. Muito Obrigada.

Aos **Professores do departamento de Odontologia** e demais professores convidados do programa, pelos ensinamentos e pela oportunidade de convívio durante esses dois anos.

Aos professores **Mauro** e **Bento** do departamento de Física, pela ajuda nos momentos de dificuldades e duvidas.

Ao Professor **Eduardo** do COMCAP, pelo auxílio na realização da análise no MEV.

As técnicas **Maria Eurides** e **Maria dos Anjos**, pela colaboração na execução desse experimento e pela amizade.

Aos meus amigos de mestrado: **Ariane Ximenes Graciano**, **Guilherme Bosseli**, **Jociele Cristina Evangelista Bagateli**, **Julliana Yuri Nagata**, **Thais Aglaet Matos Miranda**, **Lívia Tolentino**, **Marilene Pintinha**, **Rachel D'Aurea Furquim** e **Roberta Saboia Gomes**.

Aos meus amigos: **Janaína Maniezo**, **Ana Luiza Rocha**, **Hélio Junior**, **Nathalia M. Lucas**, **Paula Ragusa**, **Cristiane Men**, **Carolina Farinazzo** e **Carolina Danieletto**. Pela amizade e companheirismo.

Agradeço toda **família** e **amigos** que, mesmo distantes, nunca deixaram de marcar presença em minha vida durante esse período e que, assim, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

A **Universidade Estadual de Maringá**, muito obrigada.

## **Resposta tecidual ao implante de zircônia granulada em defeitos ósseos na calvária de ratos.**

Graciela Cristina Candido<sup>1</sup>, Luzmarina Hernandez<sup>2</sup>, Liogi Iwaki Filho<sup>3</sup>

### **RESUMO**

O objetivo desse estudo foi avaliar histologicamente a resposta tecidual ao implante de zircônia (Zirkonzahn®) na forma de grânulos em cavidades ósseas realizadas em calvaria de ratos. Foi realizado um defeito ósseo de 6 mm de diâmetro e 1 mm de espessura total (bicortical) foi realizado na calvaria de 40 ratos Wistar machos. Os defeitos foram preenchidos com grânulos de zircônia de 300 a 850 µm de diâmetro, cuja porosidade foi observada em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os animais foram mortos com 7, 14, 30 e 60 dias após a cirurgia, e as amostras foram coletadas para análise microscópica. Os defeitos ósseos foram processados para inclusão em parafina e corados com hematoxilina e eosina. A ocorrência de neoformação óssea e/ou encapsulamento dos grânulos de zircônia foram fenômenos evidentes. Não foi notada presença de resposta inflamatória indesejada. O preenchimento dos defeitos com a zircônia granulada possibilitou a manutenção da espessura da calvária no local do defeito, ao longo de todo o período de observação. Concluiu-se que a zircônia na forma granulada foi biocompatível, bioinerte e osteocondutora no processo de reparo ósseo em calvária de ratos, podendo representar uma boa opção como substituto ósseo na odontologia.

**Palavras-chave:** Zircônio, Transplante ósseo, Osteogênese, Histopatologia.

---

<sup>1</sup> Mestranda da Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Odontologia Integrada

<sup>2</sup> Professora Doutora do Departamento de Ciências Morfológicas da Universidade Estadual de Maringá

<sup>3</sup> Professor Associado do departamento de odontologia da Universidade Estadual de Maringá

## INTRODUÇÃO

Os avanços alcançados na odontologia com os substitutos ósseos têm oferecido opções de tratamento aos pacientes mutilados, aumentando as possibilidades de reconstrução total ou parcial de ossos perdidos proporcionando o reestabelecimento de função e estética.

Considerando as limitações da utilização de enxertos autógenos nos procedimentos de reconstrução óssea (Burg *et al.*, 2000; Gisep 2002; Murugan & Ramakrishna, 2005; Ahlmann *et al.*, 2002; Fleckenstein *et al.*, 2006), uma grande variedade de biomateriais que apresentem propriedades biológicas semelhantes aos enxertos autógenos vem sendo estudados (Josset *et al.*, 1999; Murugan & Ramakrishna, 2005; Fleckenstein *et al.*, 2006; Teixeira, 2009; Moreschi *et al.*, 2010)

Como características ideais de um substituto ósseo temos que os biomateriais ou produtos da sua degradação não devem ser responsáveis por reações inflamatórias indesejáveis, nem provocar reações alérgicas, imunológicas, tóxicas, ou cancerígenas (Hisbergues *et al.*, 2009). Devem apresentar propriedades físicas e biológicas compatíveis com os tecidos vivos dos hospedeiros, de modo a estimular uma resposta adequada (Kawachi *et al.*, 2000).

Os biomateriais do tipo aloplástico são utilizados nas reconstruções de defeitos ósseos e aumento do rebordo alveolar reabsorvido (Fleckenstein *et al.*, 2006) e agem promovendo um arcabouço para a angiogênese e conseqüente neoformação óssea (Teixeira, 2009). As biocerâmicas compreendem um subtipo de biomaterial aloplástico que possui a capacidade osteocondutora, ou seja, atuam como arcabouço para a neoformação óssea (Burg *et al.*, 2000; Murugan & Ramakrishna, 2005; Zabeu & Mercadante, 2008; Teixeira, 2009) e, portanto, podem ser utilizadas como substituto ósseo (Zabeu & Mercadante, 2008). Possuem ótima porosidade (poros maiores que 100  $\mu\text{m}$ ) o que representa uma vantagem no desenvolvimento de rede microvascular, uma condição relacionada à necessidade de suprimento sangüíneo ao tecido conjuntivo em crescimento (Kawachi *et al.*, 2000).

A zircônia (óxido de zircônia estabilizada com ítria) é uma biocerâmica (Murugan & Ramakrishna, 2005) empregada na confecção de próteses dentárias convencionais, implantes endósseos e componentes protéticos (Kawachi *et al.*, 2000; Murugan & Ramakrishna, 2005; Denry & Kelly, 2008; Hisbergues *et al.*, 2009). Entre os vários tipos de zircônia, apenas três são utilizadas na odontologia: a zircônia tetragonal

policristalina estabilizada com Ítria (3Y-TZP); zircônia parcialmente estabilizada com magnésio (Mg-PSZ); e zircônia temperada com alumínio (ZTA) (Denry & Kelly, 2008; Al-Amleh *et al.*, 2010), sendo a 3Y-TZP a mais utilizada (Al-Amleh *et al.*, 2010).

Como peça única, a zircônia é considerada um material biocompatível e bioinerte que induz um fraco encapsulamento por tecido conjuntivo e o desprendimento quase indetectável de resíduos (Murugan & Ramakrishna, 2005; Hisbergues *et al.*, 2009). Apresenta coloração marfim (clara e superfície opaca) (Hoffmann *et al.*, 2008), o que é uma vantagem estética quando empregada no aspecto subgengival, tornando o material apropriado para casos estéticos.

Considerando que alguns aspectos estruturais dos biomateriais, como tamanho (Fleckenstein *et al.*, 2006; Teixeira, 2009), porosidade (Burg *et al.*, 2000; Fleckenstein *et al.*, 2006; Teixeira, 2009) e morfologia dos grânulos (Josset *et al.*, 1999; Hisbergues *et al.*, 2009; Teixeira, 2009) são importantes frente a resposta biológica dos substitutos ósseos e, que de modo geral, o estudo da zircônia em tecido ósseo se restringe à utilização de peças únicas (pílulas ou implantes) nos procedimentos de implante (Hisbergues *et al.*, 2009), a proposta deste trabalho foi avaliar a resposta tecidual estimulada pela zircônia, utilizada na forma granulada, como material de preenchimento em defeitos ósseos na calvária de ratos, considerando a possibilidade de introdução desse biomaterial como substituto ósseo na odontologia.

## **METODOLOGIA**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da Universidade Estadual de Maringá (Parecer nº 079/2010).

Foi utilizada zircônia (óxido de zircônia) pré-sinterizada de estrutura policristalina tetragonal parcialmente estabilizada com ítria (6%) e enriquecida com alumínio. Para a obtenção dos grânulos, foram trituradas peças de zircônia Prettau (Zirkonzahn®), cuja composição apresenta-se descrita na tabela 1, com o auxílio de gral e pistilo de cerâmica, e posteriormente utilizadas tamizas para a padronização do tamanho dos grânulos entre 300 a 850 µm de diâmetro que foram esterilizados em autoclave odontológica.

TABELA 1. Tabela da constituição da zircônia estailizada com ítria.  
www.zirkonzahn.com.

<b>ZIRCÔNIA PRETTAU</b>	
<b>ZrO<sub>2</sub></b>	Componente principal
<b>Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	4 – 6%
<b>Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	<1%
<b>SiO<sub>2</sub></b>	Max. 0.02%
<b>Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	Max. 0.01%
<b>Na<sub>2</sub>O</b>	Max. 0.04%
<b>Densidade</b>	6,0 g/cm <sup>3</sup>
<b>Resistência a flexão</b>	1000 – 1200 Mpa
<b>Dureza (HV10)</b>	1250 HV10
<b>Resistência à fissura</b>	~15
<b>Coefficiente de dilatação térmica</b>	~10 10 <sup>6</sup> K <sup>-1</sup>

Para análise por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), uma amostra dos grânulos de zircônia, selecionados aleatoriamente, foram fixados em um dos lados de uma fita dupla face. A outra face da fita foi fixada em um suporte metálico para metalização com ouro e observação direta em MEV (Shimadzu, modelo SSX550). As Imagens foram capturadas digitalmente utilizando o programa de captura do próprio microscópio.

Para a realização dos experimentos em animais, foram utilizados 40 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*, variedade albinus), machos, adultos, com 90 dias de idade, com peso corporal médio de 275g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Os animais foram anestesiados por via intramuscular com uma associação de 1:1 de cloridrato de xilazina a 2% (Bayer S/A, São Paulo, São Paulo, Brasil) (0,1ml/100g) e cloridrato de cetamina a 10% (União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil) (0,1ml/100g). Após tricotomia da região da cabeça e anti-sepsia com solução alcoólica de polivinilpirrolidona iodada foi realizada uma incisão coronal, com bisturi e lâmina número 15, da pele e tecido subcutâneo dos animais para expor o perióstio do crânio que foi divulsionado para o acesso à calvária subjacente (Figura 1A).

Na calvária de cada animal foi produzido um defeito ósseo com 6 mm de diâmetro e 1 mm de profundidade (espessura total contendo as duas corticais do osso)

(Figura 1B), utilizando broca do tipo trefina NEODENT® montada em peça-reta (Kavo®) acoplada a um motor elétrico cirúrgico (Branemarck System®) com rotação de 1500 rpm sob abundante irrigação de soro fisiológico estéril.

As cavidades foram preenchidas com aproximadamente 0,15 g de grânulos de zircônia, previamente pesada em balança de alta precisão, nos grupos teste (Figura 1C) ou foram preenchidas com coágulo do próprio animal nos grupos controle (Figura 1D).

O retalho foi reaproximado e suturado por planos com pontos contínuos de mononylon 4-0 (Ethicon® Johnson, USA) e a região recebeu aplicação tópica da solução alcoólica de polivinilpirrolidona iodada, como medida antisséptica local.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais em condições ambientais apropriadas, ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura de 20°C, com ração específica para roedores e água *ad libitum* sendo observados no período inicial da recuperação anestésica e diariamente quanto à ocorrência de edema, eritema e aumento de temperatura.

Os animais foram organizados em 8 grupos (4 testes e 4 controles) com 5 animais por grupo, sendo mortos 7, 14, 30 e 60 dias após o procedimento cirúrgico, com uma sobredose de mistura 1:1 de Cloridrato de Cetamina a 10% e de Cloridrato de Xilazina 2%. Os defeitos da calvária foram retirados, fixados em paraformaldeído 4% e descalcificados em solução de Morse (ácido fórmico 50% e citrato de sódio 20%), por 8 dias. Após descalcificação o material foi processado para inclusão em parafina e foram realizados cortes semi-seriados de 7 µm que foram corados com hematoxilina e eosina (HE). O estudo da morfologia dos defeitos foi realizado em microscópio óptico convencional BX41 (Olympus®, Tóquio, Japão).

## **RESULTADOS**

### ***Avaliação clínica***

Não foram observadas alterações macroscópicas no sítio operado, tampouco sinais característicos de inflamação, como edema, aumento de temperatura ou eritema, em nenhum dos períodos avaliados.

### ***MEV dos grânulos de zircônia***

Nas imagens obtidas pela MEV, pôde-se observar a estrutura porosa dos grânulos de zircônia (Figura 2A). Em maior aumento, observou-se que os grânulos

maiores eram constituídos de unidades menores separadas por espaços com diâmetro na ordem de nanômetros (Figura 2B).

### ***Avaliação histopatológica***

#### *Grupo controle: coágulo*

O coágulo dos defeitos foi gradativamente sendo substituído por tecido conjuntivo. Aos 7 dias observou-se um tecido conjuntivo frouxo, vascularizado, rico em fibroblastos e poucos macrófagos (Figura 3A). Nos períodos subseqüentes (14, 30 e 60 dias) observou-se um aumento gradual na formação de tecido conjuntivo denso (Figura 3B). Não foi constatada, em nenhum dos períodos estudados, a ocorrência de infiltrado inflamatório indesejado. Observou-se o crescimento ósseo contínuo a partir das margens dos defeitos (Figura 3A).

#### *Grupo teste: zircônia*

Aos 7 dias, observou-se inicialmente a formação de tecido conjuntivo frouxo (Figura 4A) com presença importante de macrófagos ao redor dos grânulos, contendo partículas de zircônia fagocitadas em seu interior (Figura 4B). Neste período constatou-se a presença de um coto ósseo originado a partir da margem do defeito, em ambos os lados (Figura 4A).

Aos 14 dias, observou-se ao redor dos grânulos a ocorrência de tecido conjuntivo mais organizado, com fibroblastos alinhados circunferencialmente ao redor dos grânulos (figura 4C) e também a presença de osso neoformado, com osteoblastos em íntimo contato com os grânulos de zircônia (Figura 4D). Nesse período houve um aumento na ocorrência de macrófagos isolados contendo zircônia fagocitada, em comparação com aquele observado aos 7 dias.

Aos 30 e 60 dias pôde-se notar um aumento gradativo na quantidade de grânulos envolvidos por tecido ósseo, bem como na quantidade de osso ao redor dos grânulos (Figura 4E e 4F). Nesses períodos, outros grânulos apresentavam-se envolvidos por uma fina cápsula de tecido conjuntivo denso (Figura 4E).

Foi possível observar a manutenção da espessura que a zircônia (Figura 5A) promoveu no defeito ósseo, mantendo a espessura proposta no momento da cirurgia, quando comparado com o grupo controle (Figura 5B).

## DISCUSSÃO

A zircônia é uma das mais recentes introduções da odontologia no campo das cerâmicas dentais (Al-Amleh *et al.*, 2010) graças às boas propriedades mecânicas e químicas (Sollazzo *et al.*, 2008). Normalmente é empregada na forma de peças inteiras para a realização de implantes endósseos. Sua utilização na forma de grânulos ou partículas tem sido voltada a testes de biocompatibilidade em tecido subcutâneo (Hisbergues *et al.*, 2009) e não há referências de sua aplicação como substituto ósseo. Por este motivo, optou-se pela utilização deste material na forma granulada para o preenchimento de defeitos de calvária.

Neste trabalho avaliamos morfológicamente, por meio da microscopia óptica, a resposta tecidual da zircônia estabilizada com ítria e enriquecida com alumínio em defeitos na calvária de ratos. As observações ao MEV permitiram conhecer a estrutura dos grânulos empregados neste estudo. Nossos resultados comprovaram que a zircônia, mesmo na forma granulada, apresentou uma ótima atividade osteocondutora e ausência de reação adversa. O modelo utilizado neste estudo é um defeito comumente empregado em pesquisas com materiais com o objetivo de avaliar a resposta tecidual a materiais de preenchimento ósseo (Fleckestein *et al.*, 2006; Moreschi *et al.*, 2010).

Diversos autores realizaram testes de biocompatibilidade com diferentes formas estruturais (TZP, PSZ ou revestimentos) e físicas (pinos, barras ou partículas de desgaste) de zircônia, *in vitro*, em culturas de células (Josset *et al.*, 1999; Lohmann *et al.*, 2002; Sterner *et al.*, 2004; Hao *et al.*, 2005; Bachle *et al.*, 2007) ou *in vivo*, em tecidos moles ou duros (Piconi & Maccauro, 1999; Scarano *et al.*, 2003; Sennerby *et al.*, 2005; Sollazzo *et al.*, 2008). Os resultados dos testes demonstraram a ocorrência de reação adversa fraca ou ausente, independentemente das diferenças entre os materiais, forma das amostras, sítio de implantação ou método de avaliação selecionado.

Neste estudo não foi observada a ocorrência de resposta inflamatória aguda induzida por polimorfonucleares nem qualquer sinal de citotoxicidade, demonstrando a natureza biocompatível dos grânulos de zircônia da mesma forma que em experimentos *in vitro*, em diferentes linhagens celulares de linfócitos, monócitos ou macrófagos de humanos ou murinos, a zircônia na forma granulada ou em pó não induziu alta citotoxicidade nem inflamação (Hisbergues *et al.*, 2009).

A biocompatibilidade dos materiais depende não somente das propriedades físicas e químicas de sua superfície, mas também da resposta inicial das células

avaliadas sobre a superfície do material. Essa resposta é de fundamental importância e contribui para a osseointegração. A ligação inicial das células e a adesão sobre a superfície do material são seguidas por seu espalhamento e migração (Nebe *et al.*, 2001). A qualidade dessa primeira fase de interação entre célula e material irá influenciar a capacidade celular de proliferação e diferenciação (Anselme, 2000). Por outro lado, a atividade funcional das células em contato com o biomaterial é determinada pelas características de sua superfície, e neste aspecto a rugosidade superficial tem um importante papel na osseointegração (Yamashita *et al.*, 2009).

Por meio da microscopia eletrônica de varredura verificamos que os grânulos de zircônia, com tamanho entre 300 e 850  $\mu\text{m}$  de diâmetro, apresentaram superfície irregular, constituídas por particulados agregados de tamanhos variáveis, separados por espaços na ordem de nanômetros. A característica porosa desse material é importante, pois permite uma ligação mais íntima com as células.

Yamashita *et al.*, (2009) demonstraram o efeito da rugosidade superficial na ligação inicial de células osteoblastos-*like* de camundongos (MC3T3-E1) em zircônia estabilizada com ítria (3Y-TZP). Demonstraram que a 3Y-TZP produziu boa ligação celular e que um maior número de células se ligou a zircônia preparada com superfície rugosa, em comparação àquela com superfície lisa, e que a expressão de integrinas  $\alpha 5$  e  $\beta 1$  por essas células foi maior na superfície rugosa.

De acordo com Fleckenstein *et al.*, (2006) o tamanho do grânulo e do poro são importantes características de qualquer substituto ósseo. Pequenos grânulos ou um poro grande podem ser preferidos por permitirem rápidas bioabsorções, maiores superfícies de área e aumento da osteogênese, entretanto em grânulos muito pequenos não haverá espaço suficiente entre as partículas para que ocorra a angiogênese apropriada dentro do substituto ósseo. O tamanho mínimo de poro necessário para permitir vascularização adequada e formação óssea é de 100 $\mu\text{m}$  (Hulbert & Young, 1970), e o tamanho ótimo de grânulos para materiais aloplásticos está entre 300 e 500 $\mu\text{m}$ . (Zaner & Yukna, 1984) As características granulométricas dos grânulos de zircônia produzidas neste trabalho tiveram como referência o enxerto ósseo bovino inorgânico particulado (Bio-oss), considerado um eficiente biomaterial como substituto ósseo (Gisep, 2002; Teixeira, 2009; Araujo & Lindhe, 2009; Moreschi *et al.*, 2010) que possui grânulos de 250 a 1000  $\mu\text{m}$ .

A partir dos 14 dias de observação constatamos a aposição de osso neoformado ao redor de um número considerável de grânulos de zircônia, assim como Piconi &

Maccauro (1999), Scarano *et al.*, (2003), Sennerby *et al.*, (2005) e Sollazzo *et al.*, (2008) em estudos com implantes de zircônia *in vivo*.

Pôde-se observar que a zircônia apresentou excelente capacidade osteocondutora e que o osso neoformado foi depositado diretamente sobre os grânulos, como ocorre no processo de osseointegração (Hoffmann *et al.*, 2008). A zircônia é um material bioinerte (Murugan & Ramakrishna, 2005; Hisbergues *et al.*, 2009), por essa razão o desenvolvimento de fibrose ao redor dos grânulos foi pouco importante, permanecendo restrito à formação de uma fina cápsula conjuntiva, rica em fibroblastos, em todos os períodos estudados.

Foi demonstrado recentemente que em defeitos preenchidos com osso bovino inorgânico, um dos biomateriais mais comumente utilizados como enxerto ósseo (Araujo & Lindhe, 2009; Moreschi *et al.* 2010), a atividade osteocondutora somente foi observada aos 60 dias (Moreschi *et al.*, 2010). Além disso, a intensidade de fibrose observada neste estudo foi menor, em comparação com o osso bovino inorgânico (Moreschi *et al.*, 2010), reforçando a importância da zircônia como um biomaterial.

Materiais bioinertes são tolerados pelo organismo com mínima formação de envoltório fibroso, não induzindo resposta local do sistema imunológico (Rigo *et al.*, 1999). O desenvolvimento de fibrose extensa e espessa representa menor tolerabilidade dos tecidos ao material e pode ser resultado de instabilidade mecânica ou de rejeição biológica. A formação de uma cápsula fibrosa na interface entre o implante e o hospedeiro deveria ocorrer somente nas fases iniciais de sua aplicação (Barbanti *et al.*, 2005).

Em todos os períodos de avaliação histológica, observou-se a presença de macrófagos isolados contendo pequenos grânulos de zircônia em seu interior, sugerindo a ocorrência de um lento processo de reabsorção do material desprendido dos grânulos.

A ausência de alteração de cor na pele do animal, quando avaliados no momento da morte, foi considerado um fator positivo uma vez que a zircônia pode ser utilizada como um material de preenchimento ósseo sem comprometer esteticamente o tecido que recobre o osso.

A lenta reabsorção dos grânulos de zircônia e o osso neoformado ao redor dos grânulos maiores, foi considerado, neste estudo, um ponto positivo na reconstrução de defeitos ósseos, pois mantêm a espessura proposta no momento da cirurgia quando comparada com o controle (coágulo) que perde espessura. A manutenção da

espessura deve ser levada em consideração uma vez que pode comprometer a reabilitação funcional de pacientes, assim como na reabilitação estética. Esta característica de manutenção da estrutura física que as biocerâmicas permitem é um fator importante para manter a estrutura até que o local possa ser regenerado com osso, adquirindo resistência (Zabeu & Marcadante, 2008).

Nos defeitos preenchidos com coágulo houve a reposição gradual por tecido conjuntivo fibroso e/ou tecido ósseo, como observado por Moreschi *et al*, (2010) entretanto houve a formação de uma depressão óssea, de espessura reduzida, o que pode comprometer a reabilitação funcional e estética futuramente.

Baseado nos resultados obtidos pela metodologia empregada neste trabalho, concluímos que a zircônia na forma granulada, utilizada como substituto ósseo em modelo de defeitos produzidos em calvária de ratos, mostrou-se biocompatível, bioinerte e osteocondutora, além de não provocar alterações de cor na pele subjacente ao local de implantação deste material e possuir custo relativamente baixo quando comparado com outros materiais de preenchimento, podendo representar uma boa opção como substituto ósseo na odontologia.

## REFERÊNCIAS

1. Burg KJL, Porter S, Kellam JF. Biomaterial development for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2000;21:2347-2359.
2. Gisepp A. Research on ceramic bone substitutes: current status. *Injury, Int. J. Care Injured*. 2002; 33:S-B:88-92.
3. Murugan R, Ramakrishna S. Development of nanocomposites for bone grafting. *Compos Sci Technol*. 2005;65:2385-2406.
4. Ahlmann E, Patzakis M, Roidis N, Shepherd L, Holtom P. Comparison of anterior and posterior iliac crest bone grafts in terms of harvest-site morbidity and functional outcomes. *J Bone Joint Surg Am*. 2002;84-A:5:716-720.
5. Fleckenstein KB, Cuenun MF, Peacock ME, Billman MA, Swiec GD, Buxton TB, et al.. Effect of hydroxyapatite tricalcium phosphate alloplast on osseous repair in the rat calvarium. *J Periodontal*. 2006; 77:1:39-45.
6. Josset Y, Oum'Hamed Z, Zarrinpour A, Lorenzato M, Adnet JJ, Laurent-Maquin D. In vitro reactions of human osteoblasts in culture with zirconia and alumina ceramics. *J Biomed Mater Res*. 1999;47:481-493.

7. Teixeira LJC. Potencial osteocondutor de grânulos de hidroxiapatita em defeitos críticos na calvária de ratos. [Tese de Doutorado]. Duque de Caxias: Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”. 2009.
8. Moreschi E, Hernandez L, Dantas JA, Silva MARCP, Casarotto AR, Bersani-Amado CA. Effect of dolomite on the repair of bone defects in rats: histological study. 2010;25: 1547-1556.
9. Hisbergues M, Vendeville S, Vendeville P. Review Zirconia: Established Facts and Perspectives for a Biomaterial in Dental Implantology. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2009;88:2:519-529.
10. Kawachi EY, Bertran CA, Reis RR, Alves OL. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. Quim Nova. 2000; 23:4: 518-522.
11. Zabeu ZLA, Mercadante MT. Substitutos ósseos comparados ao enxerto ósseo autólogo em cirurgia ortopédica – Revisão sistemática de literatura. Rev Bras Ortop. 2008;43:3:59-68.
12. Denry I, Kelly JR. State of the art of zirconia (óxido de zirconia estabilizada com ítria, SIMBOLO) for dental applications. Dent Mater. 2008;24:299-307.
13. Al-Amleh B, Lyons K, Swain M. Clinical trials in zirconia (óxido de zirconia estabilizada com ítria, SIMBOLO): a systematic review. J Oral Rehabil. 2010;37:8:641-652.
14. Hoffmann O, Angelov N, Gallez F, Jung ER, Weber FE. The zirconia implant-bone interface: a preliminar histologic evaluation in rabbits. Int J Oral Maxillofac Implants 2008; 23:691-695.
15. Sollazzo V, Pezzetti F, Scarano A, Piattelli A, Bignozzi CA, Massari L, Brunelli G, Carinci F. Zirconium oxide coating improves implant osseointegration in vivo. Dent Mater 2008; 24:357–361.
16. Lohmann CH, Dean DD, Köster G, Casasola D, Buchhorn GH, Fink U, Schwartz Z, Boyan BD. Ceramic and PMMA particles differentially affect osteoblast phenotype. Biomaterials 2002;23:1855–1863.
17. Sterner T, Schutze N, Saxler G, Jakob F, Rader CP. Effects of clinically relevant alumina ceramic, zirconia ceramic and titanium particles of different sizes and concentrations on TNF-alpha release in a human macrophage cell line. Biomed Tech (Berl) 2004;49:340–344.
18. Hao L, Lawrence J, Chian KS. Osteoblast cell adhesion on a laser modified zirconia based bioceramics. J Mater Sci Mater Med 2005;16:719–726.

19. Bachle M, Butz F, Hubner U, Bakaliniš E, Kohal RJ. Behavior of CAL72 osteoblast-like cells cultured on zirconia ceramics with different surface topographies. *Clin Oral Implants Res* 2007;18:53–59.
20. Piconi C, Maccauro G. Zirconia as a ceramic biomaterial. *Biomaterials* 1999;20:1–25.
21. Scarano A, Di Carlo F, Quaranta M, Piattelli A. Bone response to zirconia ceramic implants: An experimental study in rabbits. *J Oral Implantol* 2003;29:8–2.
22. Sennerby L, Dasmah A, Larsson B, Iverhed M. Bone tissue responses to surface-modified zirconia implants: A histomorphometric and removal torque study in the rabbit. *Clin Implant Dent Relat Res* 2005;7:S13–S20.
23. Nebe B, Forster C, Pommerenke H, Fulda G, Behrend D, Bernewski U, Schmitz KP, Rychly J. Structural alterations of adhesion mediating components in cells cultured on polybeta-hydroxy butyric acid. *Biomaterials* 2001; 22: 2425-2434.
24. Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 2000; 21: 667–681.
25. Yamashita D, Machigashira M, Miyamoto M, Takeuchi H, Noguchi K, Izumi Y, Ban S. Effect of surface roughness on initial responses of osteoblast-like cells on two types of zirconia. *Dent Mater J* 2009; 28(4): 461–470.
26. Hulbert, S. F. e Young, F. A.; *J. Biomed. Mater. Res.* 1970, 4, 433. In: Kawachi EY, Bertran CA, Reis RR, Alves OL. *Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar.* *Quim Nova.* 2000; 23:4: 518-522.
27. Zander DJ, Yukna RA. Particle size of periodontal bone grafting materials. *J Periodontol* 1984;55:406-409.
28. Araújo, M.G. & Lindhe, J. Ridge alterations following tooth extraction with and without flap elevation. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 2009; 20: 545-549.
29. Rigo ECS, Oliveira LC, Santos LA, Bosch AO, Carrodeguaš RG. Implantes metálicos recobertos com hidroxiapatita. *Ver Bras eng biomédica* 1999; 15: 1-2:21-29.
30. Barbanti, SH, Zavaglia CAC, Duek, EAR. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de tecidos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* 2005, 15, 13-21.

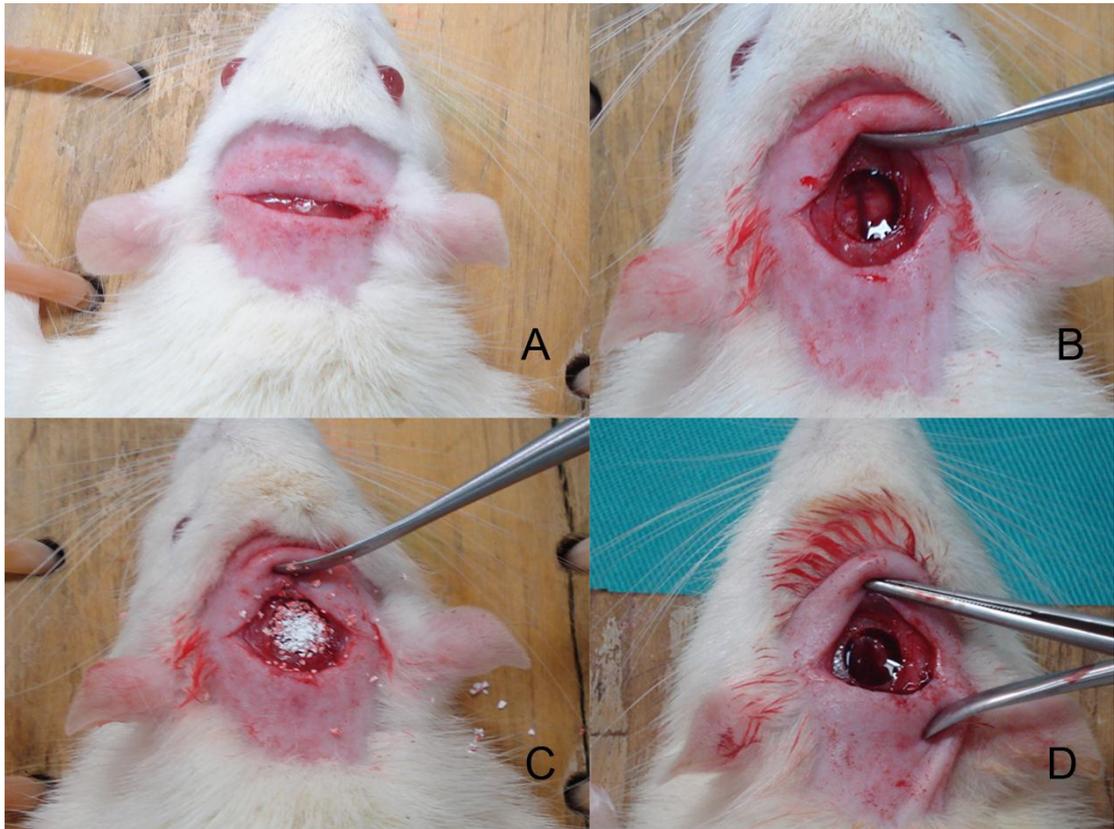


Figura 1. Procedimento cirúrgico em calvaria de rato. (A) Incisão na pele do dorso do rato. (B) Defeito ósseo circular 6 mm de diâmetro produzido na calvaria. Defeito ósseo preenchida com grânulos de zircônia(C) ou por coágulo (D) do próprio animal.

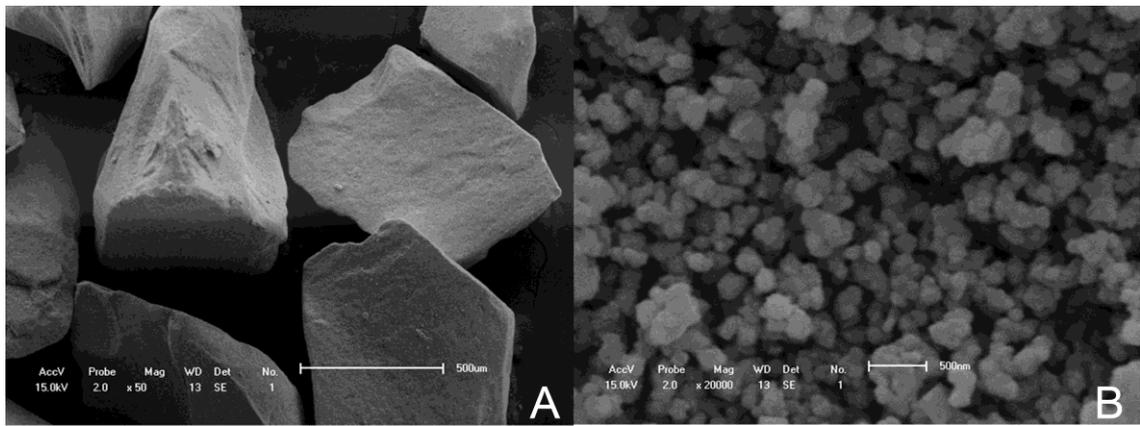


Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura dos grânulos de zircônia. (A) Grânulos de zircônia em menor aumento (50x). (B) Grânulos de em aumento de 20.000x. Observar a presença de unidades menores, na ordem de nanômetros, separados por espaços vazios.

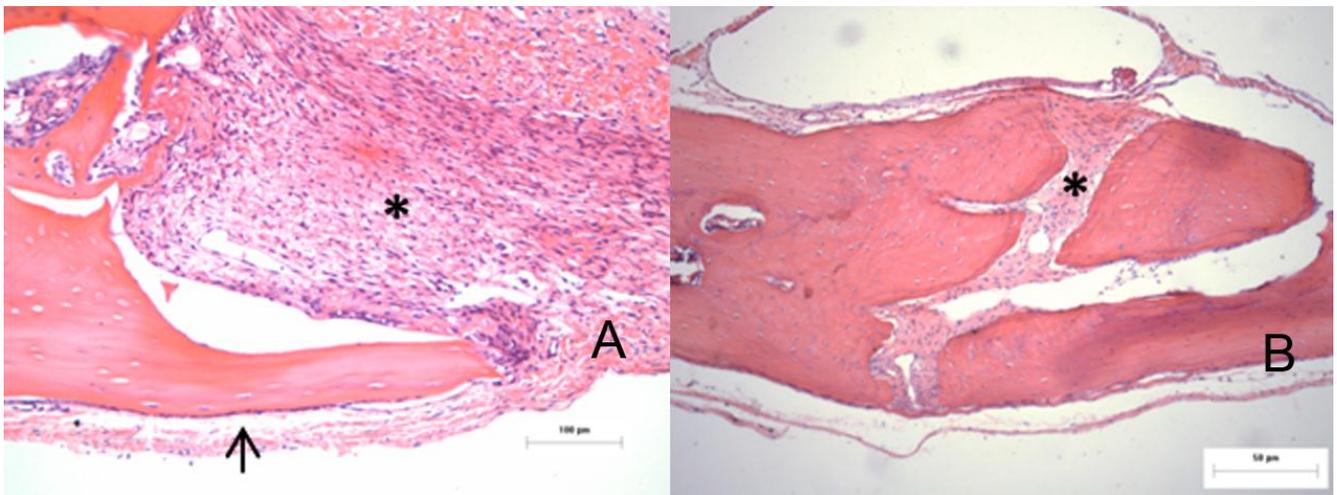


Figura 3. Defeito na calvaria de rato preenchido com coágulo aos 7 dias (A) e 60 dias (B). Aos 7 dias o coágulo apresenta-se entremeado por tecido conjuntivo frouxo (\*) ricamente vascularizado. A seta indica o coto ósseo formado a partir da margem do defeito. Aos 60 dias observou-se um grande desenvolvimento de tecido ósseo de forma que as margens do defeito apresentaram-se separadas por uma pequena quantidade de tecido conjuntivo denso (\*). Corado com Hematoxilina e Eosina.

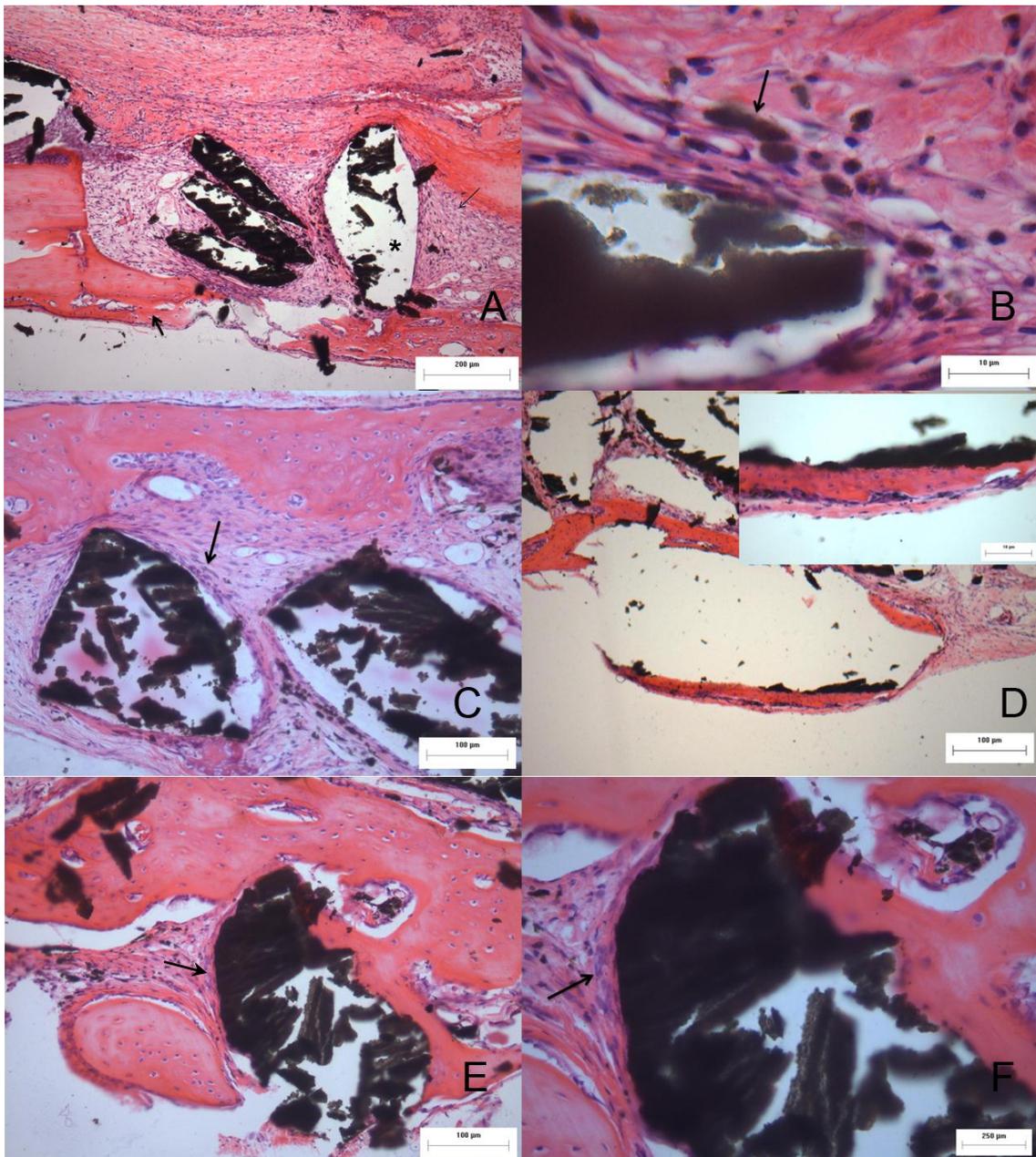


Figura 4. Defeitos na calvaria de rato aos 7 (A e B) 14 (C e D), 30 (E) e 60 (F) dias após o preenchimento com zircônia . (A) Aos 7 dias o reparo consiste de grânulos de zircônia (\*) envolvidos por tecido conjuntivo frouxo (seta fina) e coágulo. Pode ser observado processo de osteogênese a partir do lado periosteal do osso (seta grossa). Em B, detalhe da presença de macrófagos fagocitando partículas de zircônia (seta). Aos 14 dias nota-se o tecido conjuntivo (seta) circundando os grânulos individualmente (C) e a ocorrência de osso neoformado ao redor dos grânulos (D). O detalhe mostra a aposição do osso neoformado sobre os grânulos. Aos 30 (E) e 60 (F) dias, observar maior deposição de tecido ósseo sobre os grânulos (E e F) bem como, uma capsula de tecido conjuntivo denso mais organizada (seta) (E). Corado com Hematoxilina e Eosina.

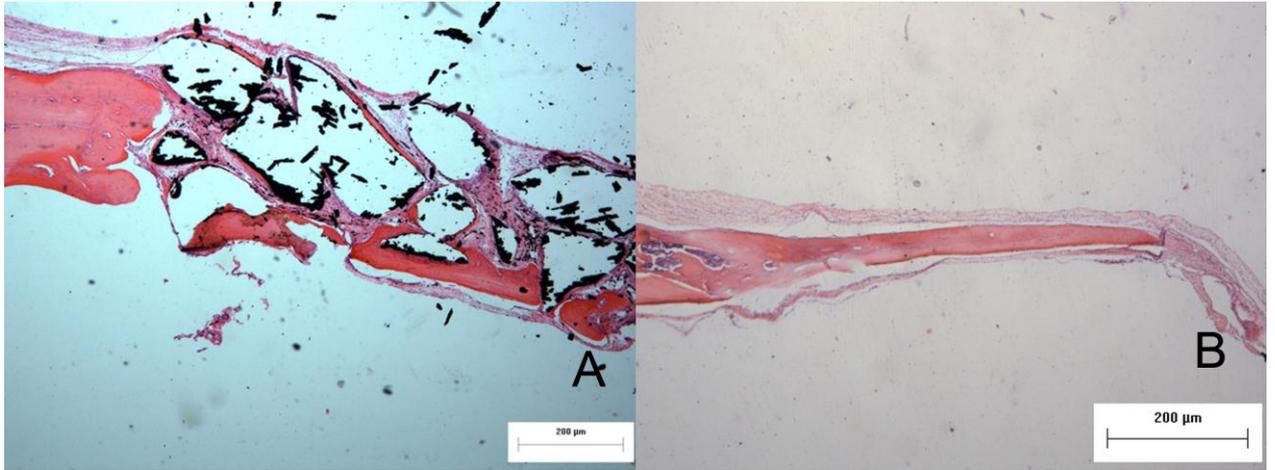


Figura 5. Defeito na calvária de ratos com 60 dias. Nota-se a manutenção da espessura do osso antigo do animal na área do defeito preenchido por zircônia (A) e a depressão no osso neoformado no grupo controle (B). Corado com hematoxilina e Eosina.



Parecer emitido após reunião realizada em: 14/9 /2010

Parecer nº 079/2010

Pesquisador: Liogi Iwaki Filho

Setor: DOD

Título:

Protocolo nº 021/2010

Efeito biológico da zircônia "in vivo": análise histológica, difratográfica e tomográfica

Entrada: 27/5/2010

Início: 1/7/2010

Término: 30/3/2011

Situação do Projeto: **Aprovado**

Relatório Final: **Aguarda finalização do projeto**

**ATENÇÃO: este parecer, quando a situação do projeto constar "aprovado", autoriza os proponentes a executarem o protocolo em questão. O certificado será emitido após apreciação e aprovação do relatório final.**

#### Considerações e Parecer:

Considerando as respostas encaminhadas pelo pesquisador a este Comitê, somos de PARECER FAVORÁVEL à execução do projeto em questão.



Dr<sup>a</sup> Fátima Anjos  
Presidente do CEAEUEM

Artigo 10 da Resolução nº 032/2005-CEP: Os projetos analisados serão enquadrados em uma das seguintes categorias:

I - aprovado;

II - pendente, quando o CEAE considerar o protocolo e o projeto como aceitáveis, porém com problemas no protocolo, no projeto ou em ambos, e houver recomendação de uma revisão específica, ou solicitação de modificação ou informação relevante, que deverá ser atendida em até 60 dias, após o recebimento da comunicação, pelo coordenador do projeto;

III - arquivado, quando o protocolo permanecer pendente, transcorridos 30 dias, após o prazo previsto no inciso II do recebimento da comunicação;

IV - não aprovado

www.ppg.uem.br - e-mail: csea@uem.br