



Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por: Ana Amélia Rodrigues e aprovada pela Comissão Julgada em 30/08/06 Baranauskas Orientador

Avaliação da Biocompatibilidade de Diamantes
Microestruturados e Nanoestruturados: Ensaios "in vitro" e "in vivo"

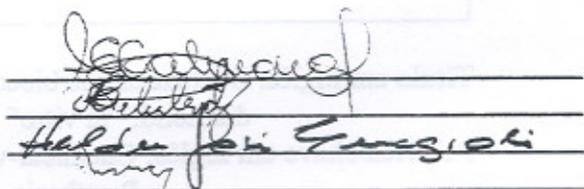
Ana Amélia Rodrigues

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do Título de Mestre em Engenharia Elétrica

Orientador: Prof. Dr. Vitor Baranauskas
Co-Orientador: Prof. Dr. William Dias Belangero

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Sonia Maria Malmonge
Dr. Alfredo Carlos Peterlevitz
Dr. Helder José Ceragioli
Prof. Dr. Vitor Baranauskas



Departamento de Semicondutores, Instrumentos e Fotônica
Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação
Universidade Estadual de Campinas

2006



UNIDADE BC
Nº CHAMADA: T/UNICAMP R618a
V. _____ EX. _____
TOMBO BCCL 73844
PROC. 6.195-07
C _____ D _____
PREÇO 11,00
DATA 28.8.07
BIB-ID 423606



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

R618a Rodrigues, Ana Amélia
Avaliação da biocompatibilidade de diamantes microestruturados e nanoestruturados: ensaios in vitro e in vivo / Ana Amélia Rodrigues. --Campinas, SP: [s.n.], 2006.
Orientador: Vitor Baranauskas.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação.
1. Diamante. 2. Biomateriais. 3. Implantes ortopédicos.
4. Próteses. I. Baranauskas, Vitor. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. III. Título.

Título em Inglês: Evaluation the biocompatibility of microcrystalline and nanocrystalline diamond: "in vitro" and "in vivo" assays.

Palavras-chave em Inglês: Chemical-vapor-deposited diamond, Biomaterials, Implants, Prosthesis.

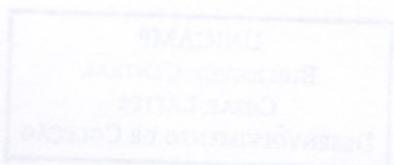
Área de concentração: Engenharia de Computação

Titulação: Mestre em Engenharia Elétrica

Banca examinadora: Sonia Maria Malmonge, Alfredo Carlos Peterlevitz e Helder José Ceragioli.

Data da defesa: 30/08/2006

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Elétrica



Dedico este trabalho aos meus pais, Luis e Wilma, a quem devo a minha formação moral. Meu reconhecimento e gratidão pela paciência, compreensão e apoio constante.

Agradecimentos

A todos que colaboraram com o desenvolvimento deste trabalho, em especial:

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Vitor Baranauskas e Prof. Dr. William Dias Belangero, pelo exemplo de seriedade e profissionalismo.

Ao Dr. Alfredo Carlos Peterlevitz e Dr. Helder Ceragioli que sempre estiveram dispostos a ajudar.

Ao Prof. Dr. Arnaldo Santos Júnior pela oportunidade de desenvolver os ensaios “*in vitro*” no Laboratório de Cultura Celular do Instituto de Biologia da UNICAMP.

Ao Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da UNICAMP por autorizar a utilização de Lupa Estereoscópica, equipamento necessário ao desenvolvimento das análises.

À bióloga Nilza Alzira Batista pelo auxílio prestado durante o desenvolvimento deste trabalho e pela amizade.

A minha tia Sônia das Dores Rodrigues, que sempre me incentivou. Muito obrigada por toda atenção.

À minha família, pelo carinho e apoio.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, pela utilização do Laboratório de Microscopia Eletrônica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa.

À Fundação de Auxílio a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro através do Projeto Temático nº 2003/10101-7

Resumo

O desenvolvimento de novos materiais para a produção de implantes ortopédicos tem sido uma busca constante, devido principalmente ao aumento das aplicações clínicas e à necessidade de se alcançar maior durabilidade, diminuindo assim as cirurgias de revisão. O diamante CVD obtido por deposição química da fase vapor é um novo material com grande potencial de uso devido às suas excelentes propriedades físico-químicas. Dentre elas pode-se destacar a inércia química, extrema dureza e baixo coeficiente de atrito, características importantes para materiais que necessitam resistir ao desgaste e à corrosão produzida pelos fluídos do corpo humano. O objetivo deste estudo foi avaliar pela análise “*in vitro*” e “*in vivo*” a biocompatibilidade de tubos de diamante microcristalino e diamante nanocristalino produzidos pela deposição química de vapor em filamento quente (CVD).

Palavras Chave: diamante CVD, biomateriais, implantes, próteses.

Abstract

The development of new materials for orthopedic implants has been a quest due to the increasing number of clinical applications and necessity of achieving larger durability for lessening the need for revision surgeries. Diamond CVD (Chemical Vapour Deposition) is a new material with larger potential of future use due its excellent physico-chemical properties like for instance, high chemical inertness, extreme hardness and low friction coefficient. The aim of this study is to evaluate by “*in vitro*” and “*in vivo*” assays the biocompatibility of microcrystalline and nanocrystalline diamond self-sustaining tubes produced by hot-filament chemical vapor deposition (CVD).

Key Words: chemical-vapor-deposited diamond, biomaterials, implants, prosthesis.

Conteúdo

<i>Agradecimentos</i>	iii	
<i>Resumo</i>	iv	
Capítulo I	Introdução.....	01
I-1	Preâmbulo.....	01
I-2	Objetivo.....	05
I-3	Material utilizado.....	05
I-4	Local de desenvolvimento.....	05
I-5	Capítulos da tese.....	06
I-6	Fluxograma.....	07
I-7	Referências Bibliográficas.....	08
Capítulo II	Avaliação da citotoxicidade indireta e direta “ <i>in vitro</i> ” de diamantes microestruturado e nanoestruturado	
II-1	Introdução.....	09
II-2	Material e Métodos.....	11
II- 2.1	Material.....	11
II-2.1.1	Tubos de Diamante CVD.....	11
II-2.1.2	Cultura Celular.....	12
II-2.2	Métodos.....	12
II-2.2.1	Ensaio de Citotoxicidade Indireta.....	12
II-2.2.2	Ensaio de Citotoxicidade Direta.....	16
II-3	Resultados	17
II-3.1	Ensaio de Citotoxicidade Indireta	17
II-3.1.1	Análise em Contraste de Fase.....	17
II-3.1.2	Análise Citoquímica da Cultura de Células.....	17
II-3.1.3	Leitura de Absorbância.....	20
II-3.2	Ensaio de Citotoxicidade Direta.....	21
II-3.2.1	Leitura de Absorbância.....	21
II-3.2.2	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	22
II-4	Discussão.....	27
II-5	Conclusões.....	31

II-6	Referências Bibliográficas.....	32
Capítulo III	Estudo da interface óssea de tubos de diamante microestruturado e nanoestruturado implantados na região femoral de ratos da linhagem wistar	
III-1	Introdução.....	36
III-2.	Material e Métodos.....	39
III-2.1	Material	40
III-2.1.1	Tubos de Diamante CVD.....	40
III-2.1.2	Animais utilizados.....	40
III-2.2	Métodos.....	40
III-2.2.1	Grupos Experimentais.....	40
III-2.2.2	Procedimento Cirúrgico.....	41
III-2.2.3	Sacrifício.....	43
III-2.2.4	Avaliação dos espécimes.....	44
III-2.2.5	Análise Macroscópica.....	44
III-2.2.6	Microscopia Óptica Convencional.....	44
III-2.2.7	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	45
III-3	Resultados	46
III-3.1	Análise Macroscópica	46
III-3.1.1	Análise Macroscópica - Máquina Digital.....	46
III-3.1.2	Análise Macroscópica – Lupa.....	49
III-3.2	Variação de Massa.....	52
III-3.3	Microscopia Óptica Convencional	56
III-3.4	Microscopia Eletrônica de Varredura	61
III-4	Discussão.....	67
III-5	Conclusões.....	69
III-6	Referências Bibliográficas.....	70
Capítulo IV	Considerações Finais	73
Apêndices	Apêndice A: Certificado da comissão de ética na experimentação animal CEEA-IB-UNICAMP.....	75
	Apêndice B: Lista de abreviatura.....	76

Capítulo I

Introdução

1. Preâmbulo

O desenvolvimento de materiais de implante, utilizando diamante sintetizado a partir do processo de deposição química na fase vapor (do inglês: chemical vapor deposition - CVD), tem despertado grande interesse devido às características únicas deste material, como por exemplo: extrema dureza, alta condutividade térmica, baixo coeficiente de atrito e inércia química [1-3]. Estas propriedades oferecem grande potencial de uso aos materiais diamantíferos para aplicações biomédicas [4]. Atualmente, utilizam-se metais e suas ligas para a fabricação de próteses para tratamento de fraturas, e implantes dentários. Estes materiais vêm sendo amplamente utilizados devido à sua resistência mecânica, porém a corrosão ocasionada pelo contato com os fluidos corpóreos tem comprometido sua funcionalidade e, conseqüentemente seu período de vida útil [5]. Existe a necessidade de buscar soluções para tais problemas através do desenvolvimento de novos materiais que ofereçam uma interface propícia a osteointegração, de modo a não alterar suas propriedades químicas e não liberar partículas que comprometam sua função ao longo do período de utilização. Estes fatores nos levaram a investigar o diamante CVD como uma possível solução para estes problemas devido, principalmente as propriedade físico-químicas que este material possui.

O diamante pode ser sintetizado a partir do processo CVD pelo método de filamento quente. As reações químicas de decomposição do vapor de álcool etílico diluído em hidrogênio ocorrem mediante a passagem dos gases em baixa pressão em um filamento em alta temperatura. O esquema básico do reator é apresentado na Figura 01. Os gases e

vapores são introduzidos no reator e controlados com medidores de fluxo de massa. Os átomos para formação do diamante são provenientes dos radicais do álcool etílico. A diluição do vapor de álcool etílico é feita somente com hidrogênio (Diamante Microestruturado - DM) ou hidrogênio e argônio (Diamante Nanoestruturado - DN). As reações ocorrem em um tubo de quartzo, mantido em baixa pressão através da utilização de uma bomba de vácuo. Durante o processo de síntese, a pressão e a temperatura são rigorosamente controladas através de um medidor de pressão e um termopar localizado no interior do tubo de quartzo. Ao serem liberados, os reagentes passam obrigatoriamente pelo filamento de tungstênio altamente aquecido e, após o desencadeamento de reações químicas, vão sendo depositados no substrato posicionado logo abaixo do filamento. Os mecanismos envolvidos no processo de crescimento do diamante CVD são complexos, mas sabe-se que o principal fator de catálise é a terminação da superfície de carbono com hidrogênio atômico [6-7].

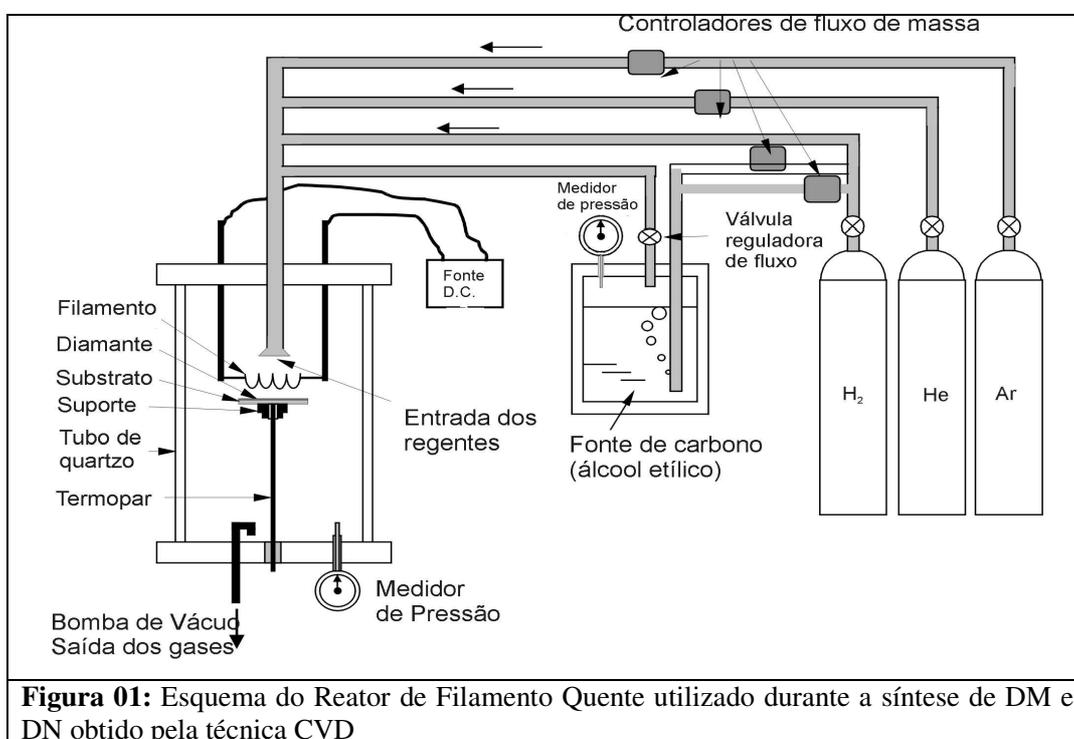


Figura 01: Esquema do Reator de Filamento Quente utilizado durante a síntese de DM e DN obtido pela técnica CVD

As duas formas do diamante, DN e DM, obtidos a partir da técnica CVD possuem diferenças superficiais entre si. A partir de imagens obtidas em Microscópio Eletrônico de Varredura é possível evidenciar o aspecto superficial do DM e do DN, sendo este aspecto superficial ocasionado pelos gases reagentes empregados durante a sua síntese. No DM diluído apenas em hidrogênio, os grãos que se depositam no substrato possuem formato triangular com ápice pontiagudo, sendo este aspecto mantido por toda sua extensão (Figura 02). O DN diluído em hidrogênio e 65% de Argônio é composto por grãos de diamante com acabamento arredondado e aspecto semelhante a uma couve-flor e, portanto mais irregular. Este acabamento superficial é, conforme descrito na literatura, ocasionado pela adição de gás nobre (neste estudo com 65% de Argônio) utilizado durante sua síntese (Figura 03).

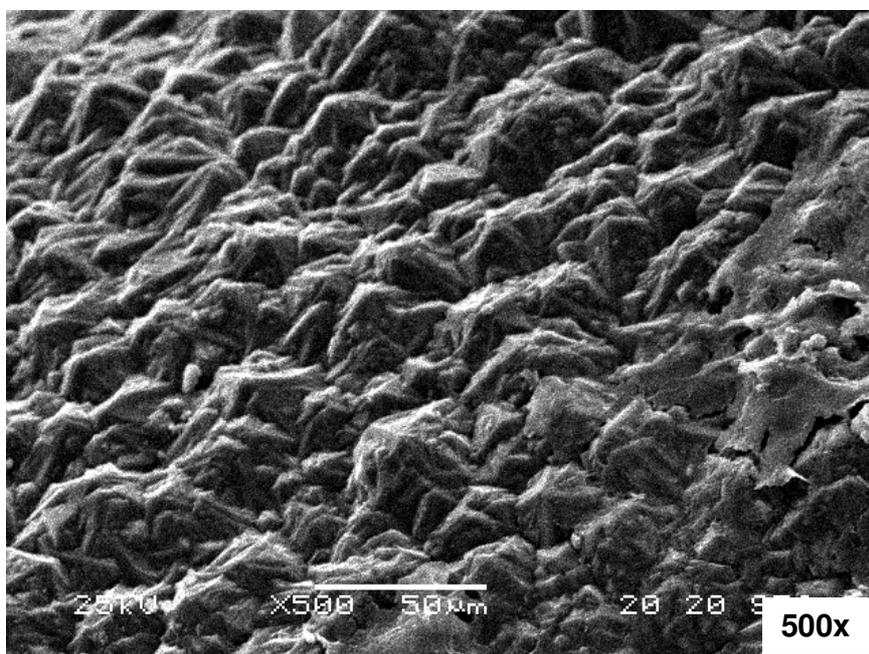


Figura 02: Microscopia Eletrônica de Varredura do Diamante Microestruturado (DM). Acabamento superficial composto por grãos de diamante com ápice triangular pontiagudo. Aumento de 500x

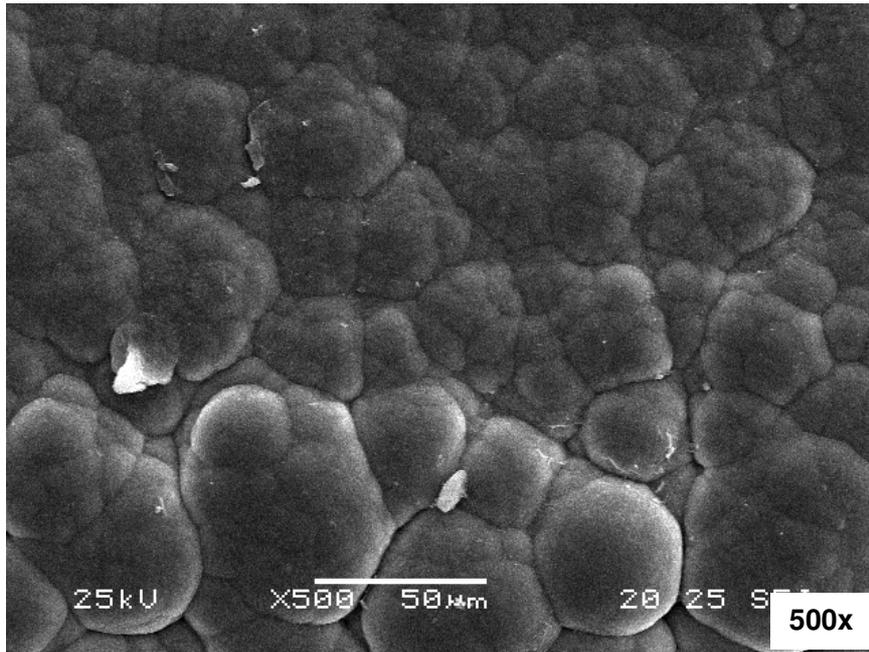


Figura 03: Microscopia Eletrônica de Varredura do Diamante Nanoestruturado (DN). Acabamento superficial composto por grãos de diamante com aspecto semelhante à couve flor. Aumento de 500x

Atualmente esta técnica permite o crescimento de materiais diamantíferos com diferentes geometrias e acabamento superficial, de modo a permitir a produção de materiais com morfologia adequada ao local de implante e desta forma proporcionar uma melhor integração com o tecido receptor [6]. Estas possibilidades evidenciam a importância do desenvolvimento de estudos para avaliar a biocompatibilidade do diamante CVD. Os materiais diamantíferos poderão contribuir através de sua aplicação não somente no desenvolvimento de próteses, mas também em outros dispositivos que possam melhorar a qualidade de vida humana.

2. Objetivo

Caracterizar tubos de DN (sintetizados com 65% de Argônio) e tubos de DM como possíveis materiais biologicamente compatíveis e seguros para futuras aplicações como materiais de implante. Para verificar o comportamento de tubos de diamante CVD, este estudo contou com dois ensaios: “*in vitro*” e “*in vivo*”.

3. Material utilizado

As amostras de Diamante CVD, utilizadas no desenvolvimento destes ensaios, foram sintetizadas pelo Laboratório de Nanoengenharia e Diamante (LANADIA) do Departamento de Semicondutores, Instrumentos e Fotônica (DSIF) da Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação (FEEC) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

4. Local de desenvolvimento

Os ensaios “*in vitro*” descritos no Capítulo II desta tese foram realizados no Laboratório de Cultura Celular do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia (IB) da UNICAMP. O ensaio “*in vivo*” descrito no Capítulo III foi desenvolvido no Laboratório de Biomecânica Ortopédica (LABIMO) do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP. As Análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Sincotron (LNLS).

5. Capítulos da tese

Esta dissertação está organizada em quatro capítulos, sendo o Capítulo I referente à Introdução.

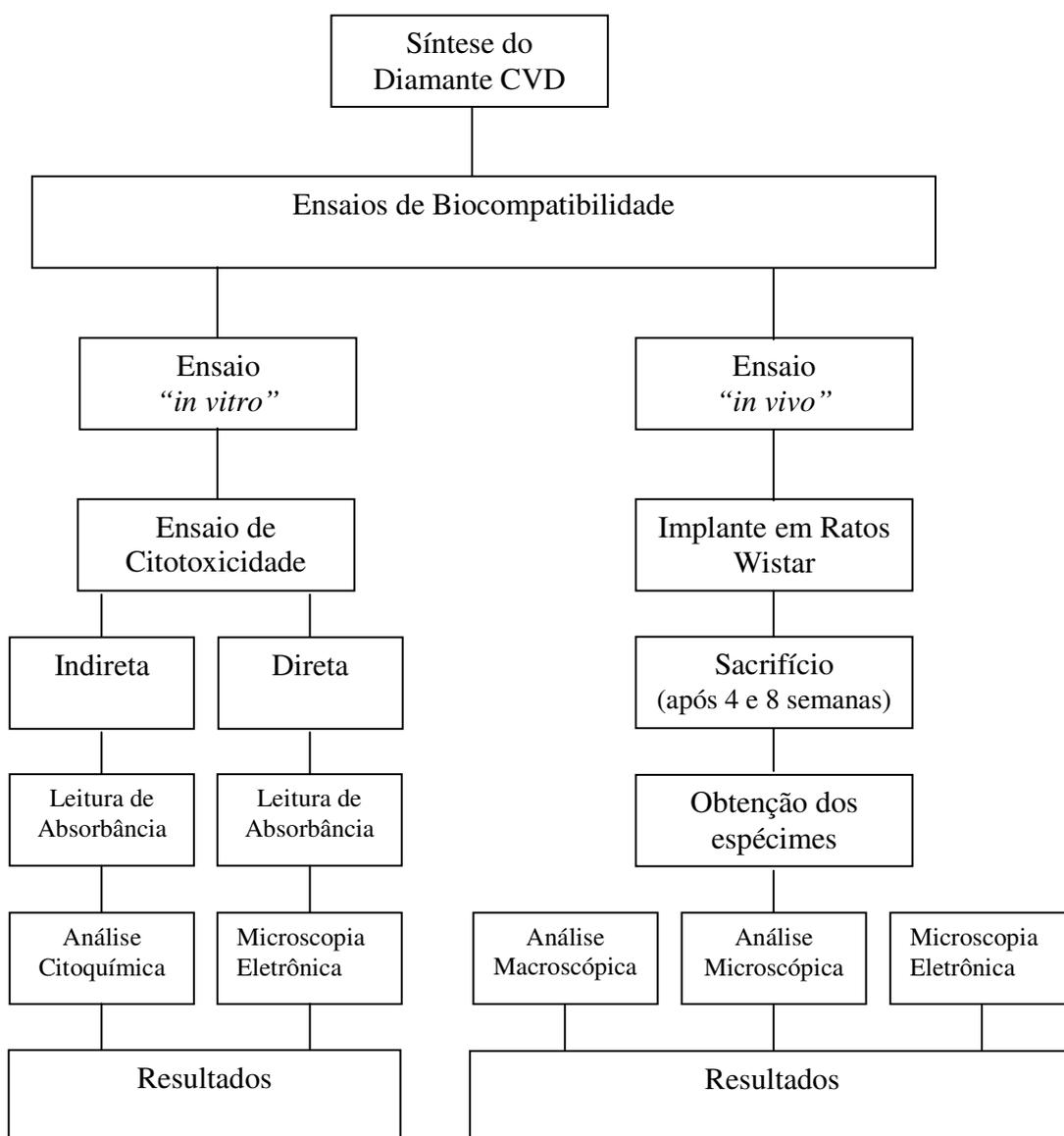
O Capítulo II é dedicado a apresentação e discussões dos resultados obtidos a partir dos ensaios “*in vitro*” utilizados para avaliar o comportamento de células do tipo fibroblastos mediante a presença do DN e DM. Utilizou-se duas metodologias para avaliação da biocompatibilidade do diamante: Ensaio de Citotoxicidade Indireta (ECI) e Ensaio de Citotoxicidade Direta (ECD). Através dos resultados obtidos notou-se ótima interação dos tubos de DN e DM em meio celular, pois estes não interferiram no crescimento, na adesão e na viabilidade celular.

O Capítulo III trata da avaliação do desempenho de tubos de diamante CVD, após período de implante predeterminado na região femoral de ratos Wistar, através da análise da interface diamante-osso e tecidos adjacentes. As análises utilizadas foram: Análise Macroscópica (AM), Microscopia Óptica Convencional (MOC) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

No Capítulo IV apresentamos as considerações finais.

6. Fluxograma

Todas as etapas adotadas no desenvolvimento deste estudo, com a finalidade de avaliar o desempenho e interações dos tubos de DN e DM, encontram-se descritas resumidamente no fluxograma a seguir:



7. Referências Bibliográficas

- [1] Angus JC, Hayman CC. Low-pressure, metastable growth of diamond and “diamondlike” phases. *Science* 1998 (241); 913-919.
- [2] Baranauskas V, Ceraglieri HJ, Peterlevitz AC. Growth of self-supported diamond tubes in the hot filament chemical vapor deposition. *Diamond Related Materials*. 2003; (12): 346-349.
- [3] Trava-Airold VJ, Corat EJ, Leite NF, Nono MC, Baranauskas V, et al. CVD diamond burrs-development and applications. *Diamond and Related Materials* 1996; (5): 857-860.
- [4] Hamers RJ, Butler JE, Lasseter T, Nichols BM, Russel JNJ, et al. Molecular and biomolecular monolayers on diamond as an interface biology. *Diamond and Related Materials* 2005; (14): 661-668.
- [5] Tang L, Tsai C, Gerberich WW, Kruckeberg L, Kania DR. Biocompatibility of chemical vapour deposited diamond. *Biomaterials* 1995; (16): 483-488.
- [6] Kohmura N, Sudoh K, Sato K, Hirakuri KK, Miyake K, Friedbcher G. Diamond growth on the high purity iron substrate using hot filament CVD method. *Diamond and Related Materials*. 2005; (14): 283-287.
- [7] Swaing GM, Ramesham M. The electrochemical activity of boron-doped polycrystalline diamond thin electrodes. *Anal. Chem.* 1993; (65): 345-351.

Capítulo II

Avaliação da citotoxicidade indireta e direta “*in vitro*” de diamantes microestruturado e nanoestruturado

1. Introdução

Nas últimas décadas o aumento da utilização dos implantes ortopédicos na prática clínica incentivou o desenvolvimento de novos materiais. Devido à boa tolerância que apresentam aos fluídos e tecidos humanos, metais e ligas metálicas especiais vêm sendo os materiais mais utilizados na fabricação de implantes ortopédicos. Simultaneamente, houve também aumento no número de pesquisas com o objetivo de se desenvolver novos materiais e testes de biocompatibilidade mais avançados [1-8].

Para ser considerado adequado em aplicações em ossos e substituições articulares, um implante deve apresentar além de resistência à corrosão características peculiares, tais como resistência à fadiga e ao desgaste. Nesse sentido, são necessários estudos que avaliem o comportamento do material frente ao meio interno, aos fluídos e aos componentes celulares que vão interagir na interface implante-osso. Antes de qualquer material ser aprovado para a fabricação de implantes, é necessário que se investigue a sua biocompatibilidade [9-10]. A avaliação destes novos materiais pode ser realizada por meio de análise “*in vitro*” ou por meio da análise “*in vivo*”.

Os estudos “*in vivo*” são essenciais para se obter informações relativas às reações biológicas decorrentes do implante, uma vez que o organismo receptor desencadeia reações inflamatórias e processo de cicatrização dos tecidos lesados em resposta aos danos gerados durante o processo de implantação e pela permanência do material no organismo.

Os testes “*in vitro*”, por outro lado, representam um sistema válido quando se quer analisar especificamente a tolerância e a proliferação celular sobre esses novos materiais, sem que haja interferência das reações teciduais que ocorrem ao redor do material quando se faz o ensaio “*in vivo*” [11-14]. Além disso, esse tipo de análise tem como vantagem propiciar resultados rápidos e de baixo custo, quando comparados aos modelos “*in vivo*”.

Em relação aos tipos de materiais, as ligas de titânio (Ti) vêm sendo amplamente utilizadas como materiais de implante, devido principalmente às suas propriedades mecânicas e à sua biocompatibilidade. Vários estudos na literatura descrevem as ligas de Titânio-Alumínio-Vanádio (TiAlV) com biocompatibilidade maior que as ligas de Cromo-Cobalto (Cr-Co), Cromo-Cobalto-Molibdênio (Cr-Co-Mo) e cerâmicas [15-18]. No entanto, após a implantação, todos estes materiais sofrem corrosão apresentando comportamento de má qualidade, liberando produtos de degradação para o meio interno em quantidades variáveis relacionadas com o tempo de permanência e a função do implante. Estes produtos são freqüentemente detectados através da presença de partículas nos tecidos e organismos associados aos implantes [19]. HAYNES et al [20] descrevem que essas partículas de TiAlV causam aumento na quantidade de mediadores inflamatórios responsáveis pela reabsorção óssea, e conseqüentemente, pelo afrouxamento e soltura das próteses, acompanhado ou não de um quadro clínico que se caracteriza por dor, não sendo este tipo de ocorrência ideal para a longevidade das próteses. Nesse sentido, torna-se necessário o desenvolvimento de novos materiais mais inertes ao meio interno e que possuam interfaces propícias à osteointegração.

O diamante obtido pela técnica CVD e os materiais diamantíferos podem oferecer soluções mais promissoras a esses problemas, já que apresentam extrema dureza, alta condutividade térmica, baixo coeficiente de atrito e inércia química [21-23]. Essas

características indicam que há grande potencial para a aplicação de diamante CVD no desenvolvimento de implantes ortopédicos.

Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi analisar o comportamento do DN e DM através de Ensaio de biocompatibilidade “*in vitro*”. Foi analisado o crescimento de células de fibroblastos em contato com o extrato obtido após a imersão de tubos de diamante CVD e sobre sua superfície, por meio dos ECI e ECD durante um período de 48 e 24 horas, para se verificar a sua biocompatibilidade. Foram analisadas especificamente a adesão, viabilidade e proliferação de fibroblastos, reconstituindo de certa forma a interface implante-osso através de ensaios “*in vitro*”.

2. Material e Métodos

2.1 Material

2.1.1 Tubos de Diamante CVD

Os tubos de diamante utilizados neste estudo foram desenvolvidos no LANADIA do DSIF da FEEC da UNICAMP. Este material foi obtido por meio da técnica CVD em Reator de Filamento Quente, a partir de reações químicas do etanol e hidrogênio, de modo que durante o processo de síntese do Diamante CVD algumas amostras foram sintetizadas com 65% de argônio na atmosfera. Portanto, duas diferentes formas do diamante foram utilizadas neste estudo: tubos de DN e tubos de DM.

2.1.2 Cultura Celular

Foram utilizadas células VERO, uma linhagem celular do tipo fibroblastos originários de rim de Macaco Verde Africano (*Cercopithecus aethiops*), obtidas junto ao Instituto Adolfo Lutz, localizado na cidade de São Paulo-SP. Estas células foram mantidas no Laboratório de Cultura Celular do IB da UNICAMP, em meio Ham F-10 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO- USA) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB)-Nutricell, Campinas-SP-Brasil- a 37° C. As células VERO são linhagens recomendadas para testes de citotoxicidade e interações com biomateriais [24] e foram utilizadas para o desenvolvimento do ECI e ECD das duas diferentes formas do diamante CVD descrito a seguir.

2.2 Métodos

As amostras do DN e DM foram analisadas a partir dos ensaios acima citados para caracterizar sua biocompatibilidade quando adicionados em cultura de células de fibroblastos. Os tubos de Diamante CVD foram esterilizados em autoclave a 134°C por 30 minutos, antes de serem inoculados em placas de cultura com meio Ham F-10 sem SFB e incubados em estufa a 37° por 24 horas, previamente à inoculação celular.

2.2.1 Ensaio de Citotoxicidade Indireta (ECI)

As duas formas do diamante analisadas neste estudo foram maceradas e submersas em meio Ham F-10 com 10% de SFB a 37°C na proporção de 0,2g/ml de meio por 48 horas, para realização do ECI segundo normas internacionais [25-26]. O objetivo é a

extração de possíveis substâncias tóxicas solúveis eliminadas pelos tubos de diamante. Após a obtenção dos extratos para realização do ECI, uma suspensão celular na concentração de 3×10^5 células/ml foi inoculada em placas de 96 poços (Corning Costar Corporation, Cambridge, MA, USA) e as células cultivadas por 24 horas a 37°C.

Após este período, o meio de cultura presente na placa foi trocado pelos respectivos extratos adquiridos após o período de imersão do DN e DM. As células foram cultivadas nestas condições por mais um período de 24 horas a 37°C. Foi utilizado como Controle Positivo de Toxidade (CPT) uma solução de meio Ham F-10 com 10% SFB e 10% de Fenol, que é altamente nocivo a células; e como Controle Negativo de Toxidade (CNT) o extrato de poliestireno que não oferece nenhum tipo de interferência ao desenvolvimento celular (Figura 04). Decorrido o período de cultivo de 24 horas, foram feitas imagens das células vivas em Contraste de Fase utilizando Microscópio Invertido Olympus IX-50.

Em seguida, através da utilização do Teste de Viabilidade Celular pelo ensaio com MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium) as amostras do DN, DM, CPT e CNT inoculadas na placa de cultura receberam em cada poço (n= 8) 200µl de meio Ham-F10 com 10mM de tampão Hepes e 50µl de MTT Sigma (5µg/ml em PBS - Phosphate Buffer Saline). Este reagente evidencia a mitocôndria de células metabolicamente ativas demonstrando o número de células viáveis contidas na placa. Após a adição do MTT a placa foi incubada no escuro por 4 horas a 37°C (Figura 05). Decorrido o período de incubação, o meio com o MTT foi removido e 200µl de DMSO mais 25µl de Tampão glicina Sorensen pH 10,5 foi adicionado em cada poço para dissolver os cristais formados pelo MTT e conseqüentemente corar as células marcadas por este reagente. (Figura 06).

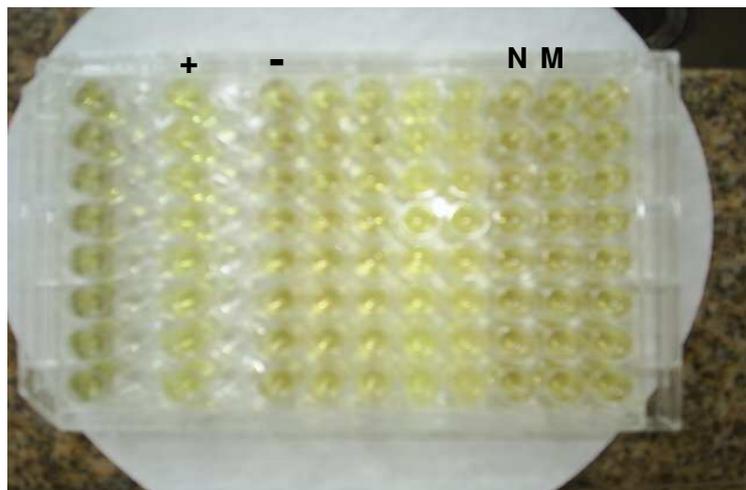


Figura 04: Placa de Cultura de Células em contato com os extratos do: CPT (+), CNT (-), DN (N) e DM (M).

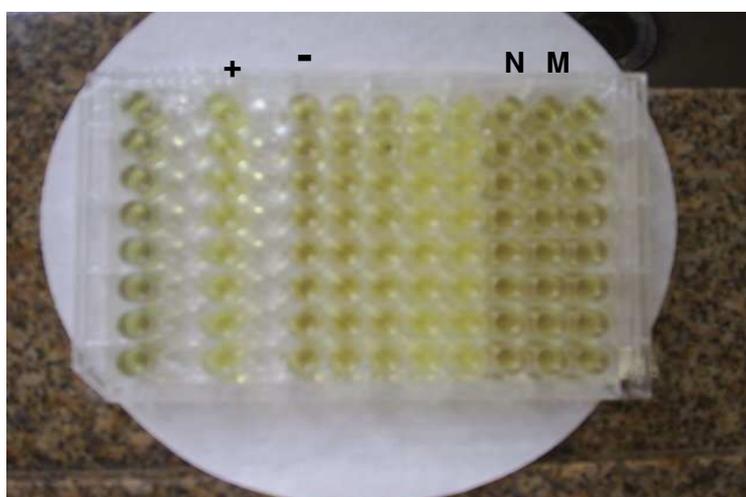


Figura 05: Cultura de células sob ação da solução de MTT em diferentes condições experimentais: CPT (+), CNT (-), DN (N) e DM (M)

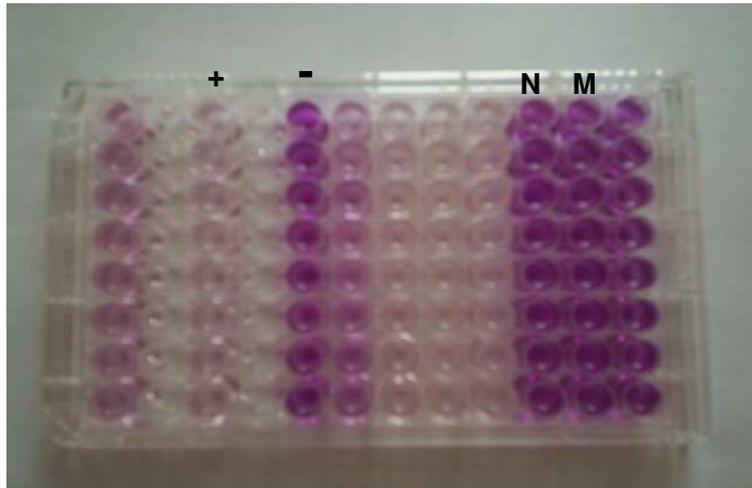


Figura 06: Cultura de células sob ação do DMSO em diferentes condições experimentais: CPT (+), CNT (-), DN (N) e DM (M)

A leitura da absorbância foi feita em leitor de Microplacas Multiskan Bichromatic Version 1.06 Microplate Reader (Labsystems Inc, Helsinki, Finland) em comprimento de onda de 540nm. Foram utilizados como controle de reação poços onde não houve o cultivo de células, mas foram adicionados os mesmos reagentes descritos anteriormente.

Foram realizadas ainda a avaliação citoquímica de células cultivadas na presença dos extratos obtidos do CPT, CNT, DN e DM. Neste experimento, células cultivadas por 24 horas foram fixadas em Formol 10% e coradas com Azul de Toluidina (AT) em pH 4,0 para a detecção de ácidos nucléicos, e glicosaminoglicanos e coloração de Xylidine Ponceau (XP) pH 2,5 para evidenciação de proteínas [27].

2.2.2 Ensaio de Citotoxicidade Direta (ECD)

Este ensaio visa à observação dos possíveis efeitos deletérios sobre as células a partir do contato direto das mesmas com a superfície do material estudado. Para avaliação do ECD, células VERO foram cultivadas diretamente sobre as amostras de diamante em meio Ham F-10 com 10% de SFB a 37° por 24h ($n = 8$). Para verificar a atividade celular, após o período de incubação, o meio de cultura foi removido e cada poço recebeu 200 μ l de meio Ham-F10 com 10mM de tampão Hepes e 50 μ l de MTT Sigma (5 μ g/ml em PBS - Phosphate Buffer Saline). A placa foi incubada no escuro por 4 horas a 37°C. Para acessar o número de células viáveis através de leitura de absorbância o MTT foi removido e 200 μ l de DMSO mais 25 μ l de Tampão glicina Sorensen pH 10,5 foi adicionado. A leitura das absorbâncias foi feita em leitor de Microplacas Multiskan Bichromatic em comprimento de onda de 540nm e utilizamos como controle de reação, poços onde não houve o cultivo de células.

As células sobre as diferentes formas do diamante também foram analisadas em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Nesta fase, os tubos de DN e DM, foram inoculados sobre lamínulas de vidro com 2×10^5 células/ml em meio Ham F-10 com 10% de SFB por 24h a 37°C. Os tubos foram fixados em glutaraldeído 2,5% (em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2), pós-fixados com tetróxido de ósmio 1% (Sigma), desidratados em etanol em concentrações crescentes, secos em equipamento de Ponto Crítico Balzers CTD-030, e submetidos à metalização com ouro em Sputter Balzers CTD-050. Posteriormente, a superfície dos tubos de DN e DM foram observadas em Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL 5800.

3. Resultados

3.1 Ensaio de Citotoxicidade Indireta (ECI)

3.1.1 Análise em Contraste de Fase

Foram obtidas imagens em Contraste de Fase da cultura de células de fibroblastos em contato com material analisado com auxílio de Microscópio Invertido disponível no Laboratório de Cultura Celular do IB da UNICAMP. A partir destas imagens foi observado o desenvolvimento dos fibroblastos em contato com o extrato do DN e DM e foi comparado ao CNT. Foi observado o seu desenvolvimento e morfologia em aumento de 400x, tendo-se notado semelhança no aspecto entre as culturas de células, sendo, portanto característico e dentro do padrão esperado, conforme pode ser visualizado na Figura 07.

3.1.2 Análise Citoquímica da Cultura de Células

As células VERO inoculadas na presença do extrato do DN e DM, depois de fixadas e coradas, apresentaram padrão adequado, conforme apresentado na Figura 08. Dos corantes utilizados, o AT se presta a detecção de grupos negativos PO_4^- , SO_4^- e COO^- , que em pH 4,0 estão presentes apenas em glicosaminoglicanos, DNA e RNA. Observou-se que as células cultivadas nas condições do CNT se apresentavam com uma monocamada celular semiconfluente. Uma leve basofilia metacromática pôde ser observada em nível nuclear e citoplasmático. Por outro lado, as células de CPT, cultivadas na presença de fenol, apresentavam numerosos pontos com restos e fragmentos celulares. As células cultivadas na presença do DN e DM mostraram um padrão muito semelhante ao CNT para o AT. O XP se presta à detecção de grupos NH_3^+ , que em pH 2,5 estão presentes em quantidade

significativa em proteínas. Nas células do CNT observou-se um leve acidofilia, quando coradas com XP. Por outro lado, o CPT mostrou células fragmentadas e restos celulares. O padrão das células que cresceram na presença do DN e DM se assemelhava ao CNT, quando corados pelo XP (Figura 08).

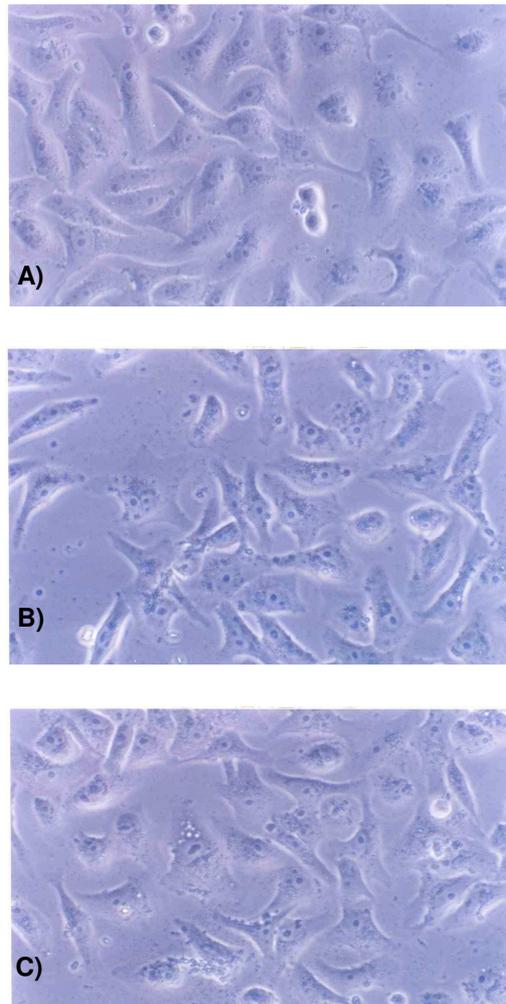


Figura 07: Imagens da cultura de células fibroblásticas vivas em Contraste de Fase. A) CNT; B) DN; C) DM. Aumento de 400x.

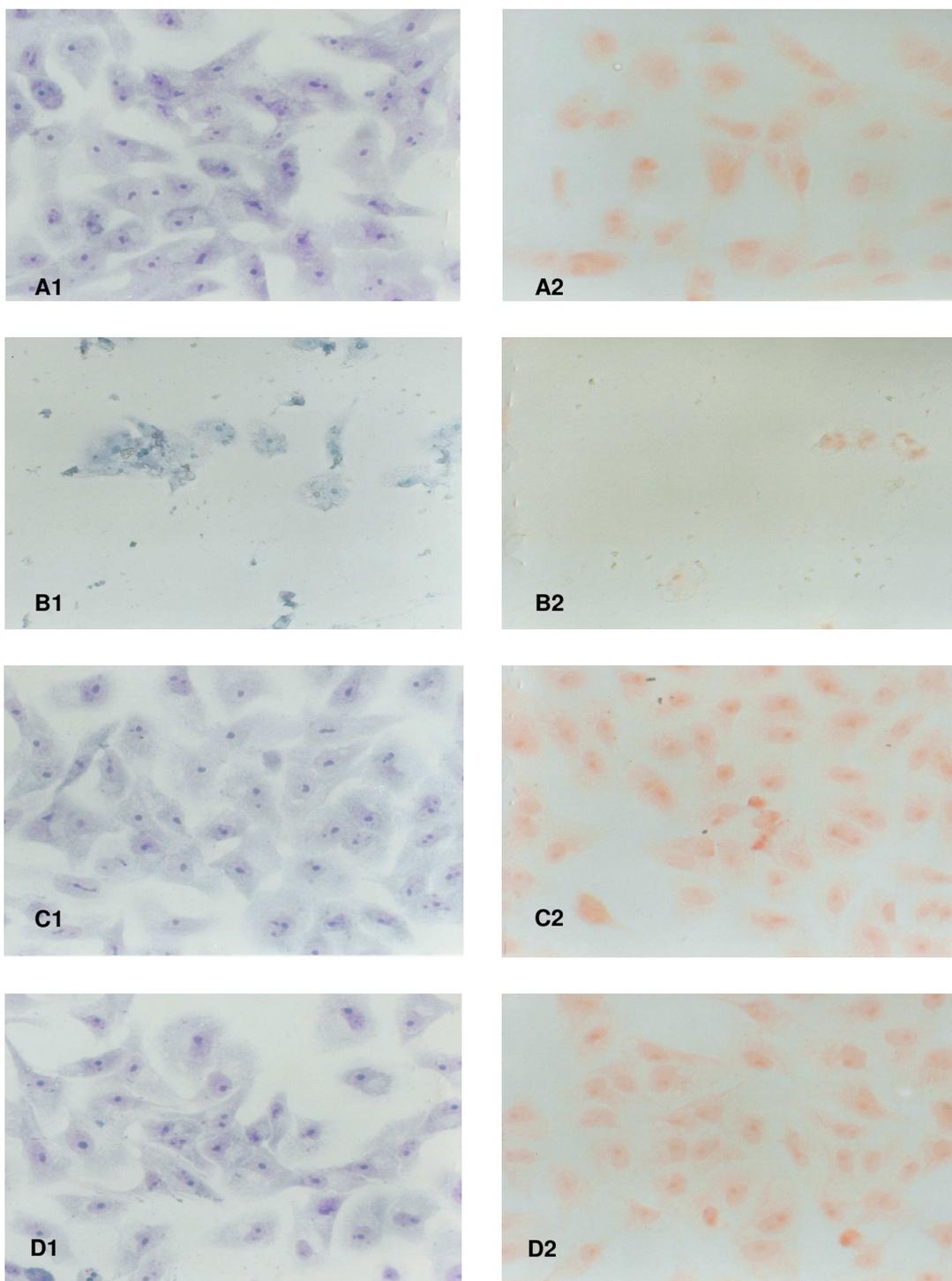


Figura 08: Citoquímica da cultura de células fibroblásticas cultivadas nas diferentes condições experimentais. A) CNT; B) CPT; C) DN; D) DM. De A1 até D1 coloração com AT. De A2 até D2 coloração com XP. Aumento de 400x para todas as imagens.

3.1.3 Leitura de Absorbância

A partir dos valores obtidos através da leitura de absorbância da placa, na qual continha células do tipo fibroblastos cultivados em contato com o extrato do CPT, DN e DM, foi possível acessar o número de células metabolicamente ativas para cada amostra e compará-las ao CNT. O resultado obtido não apresentou valores estatisticamente significativos, pois as duas amostras do diamante se mantiveram próximas ao CNT, conforme pode ser observado na Tabela 01.

Tabela 01: Dados do Ensaio de Citotoxicidade Indireta (ECI) obtidos a partir da leitura de absorbância				
	CNT	CPT	DN	DM
	0,782	0,226	0,619	0,623
	0,7	0,232	0,671	0,575
	0,642	0,231	0,673	0,589
	0,662	0,232	0,617	0,642
	0,68	0,24	0,638	0,657
	0,555	0,244	0,677	0,687
	0,655	0,219	0,72	0,684
	0,731	0,236	0,715	0,696
<i>Média</i>	0,675875	0,2325	0,66625	0,644125

Os valores da leitura de absorbância das amostras de DN e DM se mantiveram dentro do esperado, quando comparado ao CNT. A viabilidade celular mediante os materiais analisados foi semelhante à observada nas amostras de CNT, conforme ilustrado no Figura 09.

Gráfico de Citotoxicidade Indireta

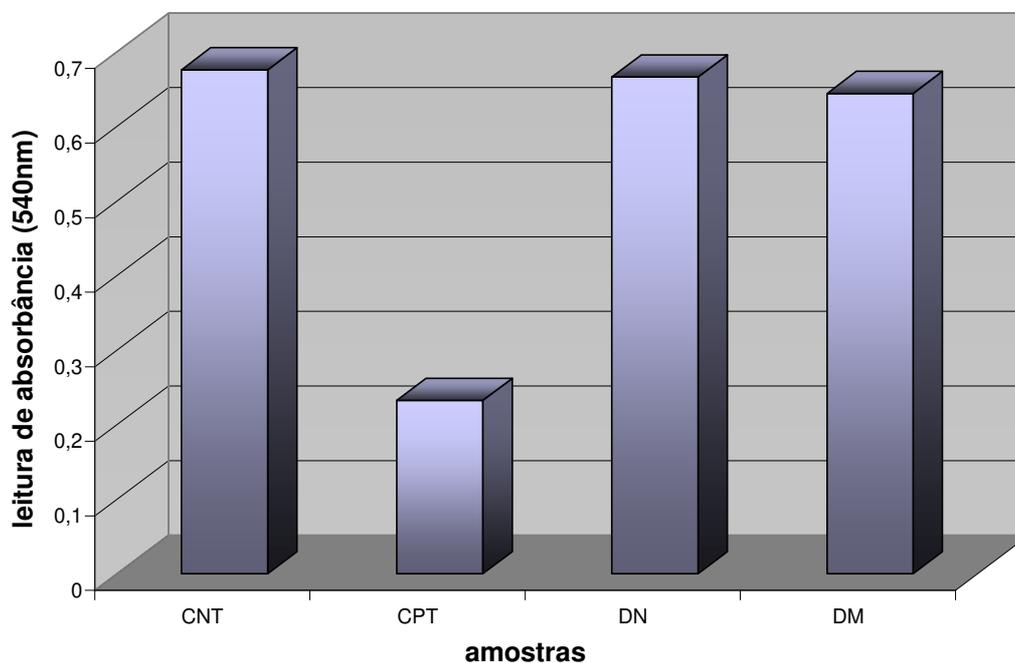


Figura 09: Apresentação da leitura de absorvância do ECI onde as amostras de DN e DM obtiveram resultados semelhantes ao CNT indicando adequado desenvolvimento celular frente às duas formas do diamante analisadas.

3.2 Ensaio de Citotoxicidade Direta (ECD)

3.2.1 Leitura de Absorvância

Com a leitura de absorvância da placa que continha células em contato direto com as diferentes condições experimentais (CNT, CPT, DN e DM), observou-se o número de células metabolicamente ativas para cada amostra e comparou-se umas com as outras. Esta análise permitiu avaliar a viabilidade celular mediante a presença do DN e DM, onde a proliferação celular quando comparada ao CNT apresentou resultado satisfatório, mantendo-se dentro do padrão esperado, conforme ilustrado no Figura 10.

Gráfico de Citotoxicidade Direta

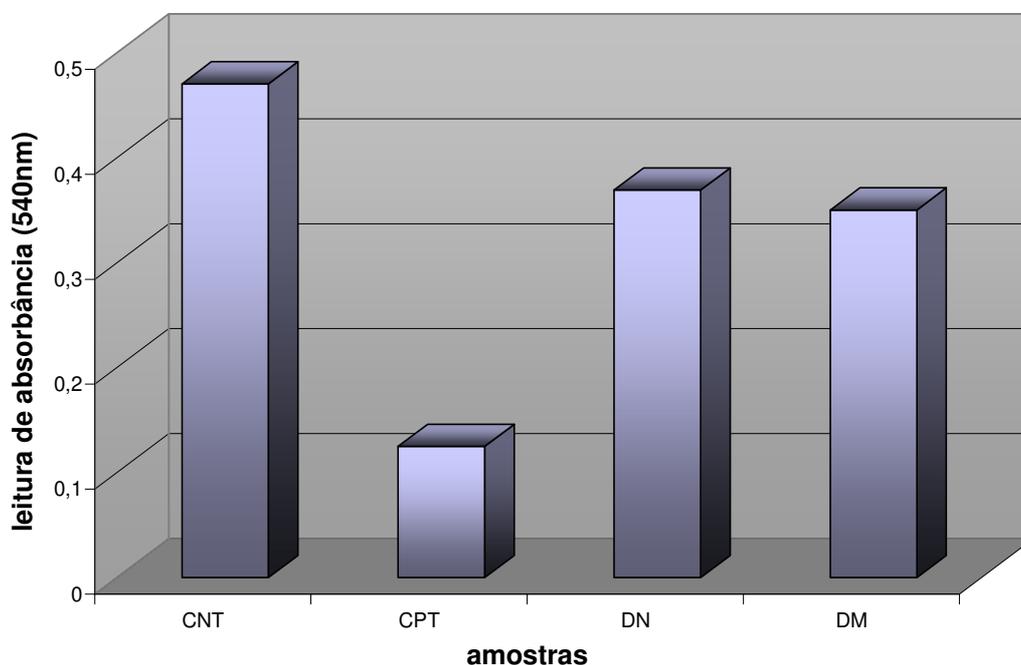


Figura 10: Apresentação da leitura de absorvância do ECD. As amostras de DN e DM obtiveram resultados semelhantes ao CNT indicando proliferação celular adequada.

3.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Foi realizada a avaliação da citotoxicidade, mediante análise morfológica das células VERO cultivadas sobre as amostras de diamante através de MEV. Após o período de crescimento predeterminado, os tubos foram fixados e metalizados e as células observadas em Microscópio Eletrônico JEOL, onde foi possível analisar o crescimento e adesão celular sobre as amostras de diamante analisadas.

Por meio das imagens obtidas, identificou-se a adesão e crescimento de camadas celulares sobre o diamante, caracterizando as duas composições do DN e DM como biologicamente compatíveis. Nas amostras de DM foi possível observar, após período de 24

horas de cultivo, a adesão celular sobre o substrato, indicando boa interação com a superfície desses tubos (Figura 11).

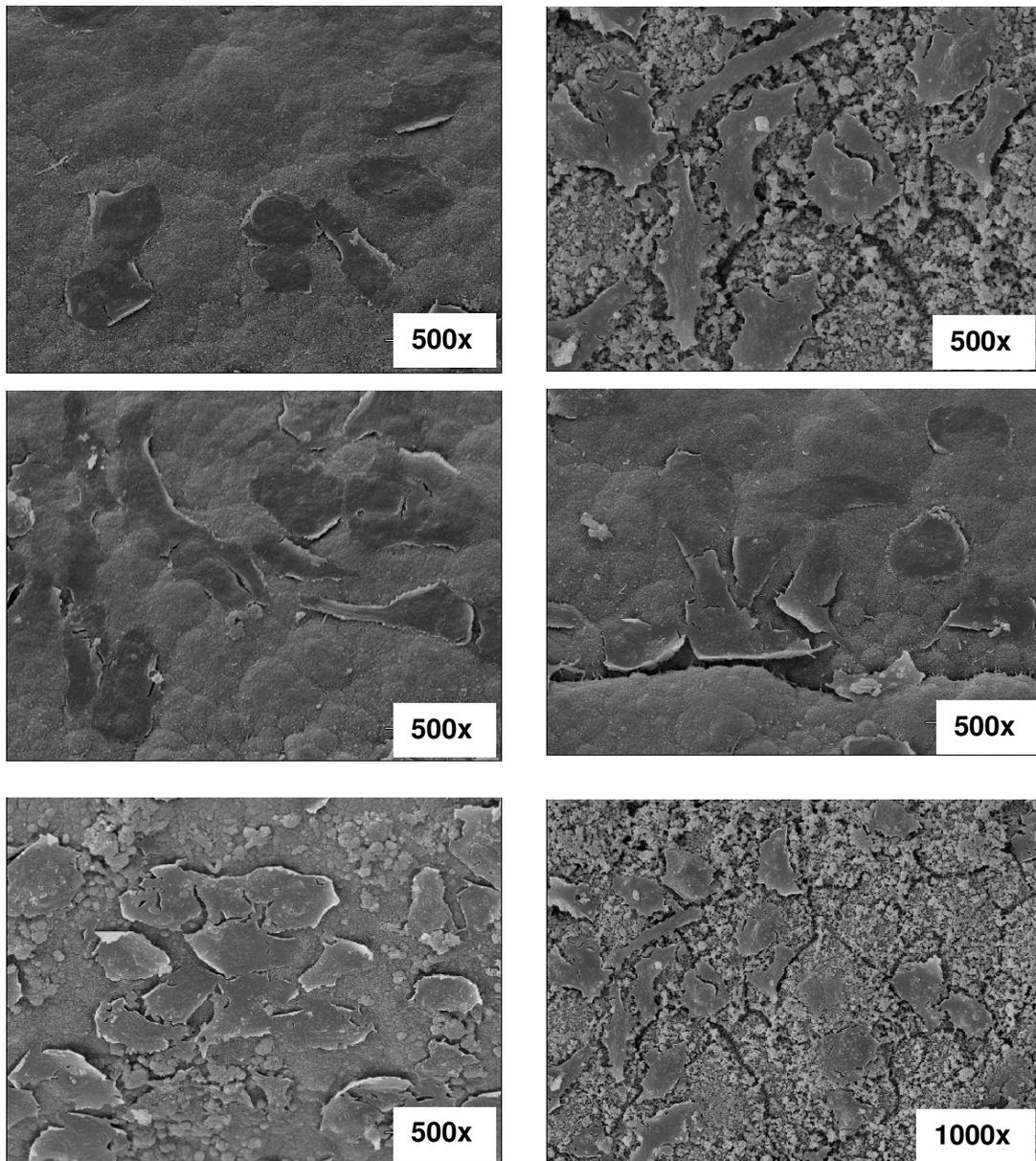


Figura 11: MEV de cultura de células do tipo fibroblastos após 24h de cultivo sobre tubos de DM. As imagens apresentam a adesão de tecidos sobre os tubos de diamante e união célula-célula

Também foi identificada a formação de uma camada celular delgada formada a partir da união célula-célula iniciando a fase de confluência celular, que evidencia o

desenvolvimento adequado dos fibroblastos sobre esta amostra sem nenhum tipo de alteração ou atraso em seu desenvolvimento (Figura 12).

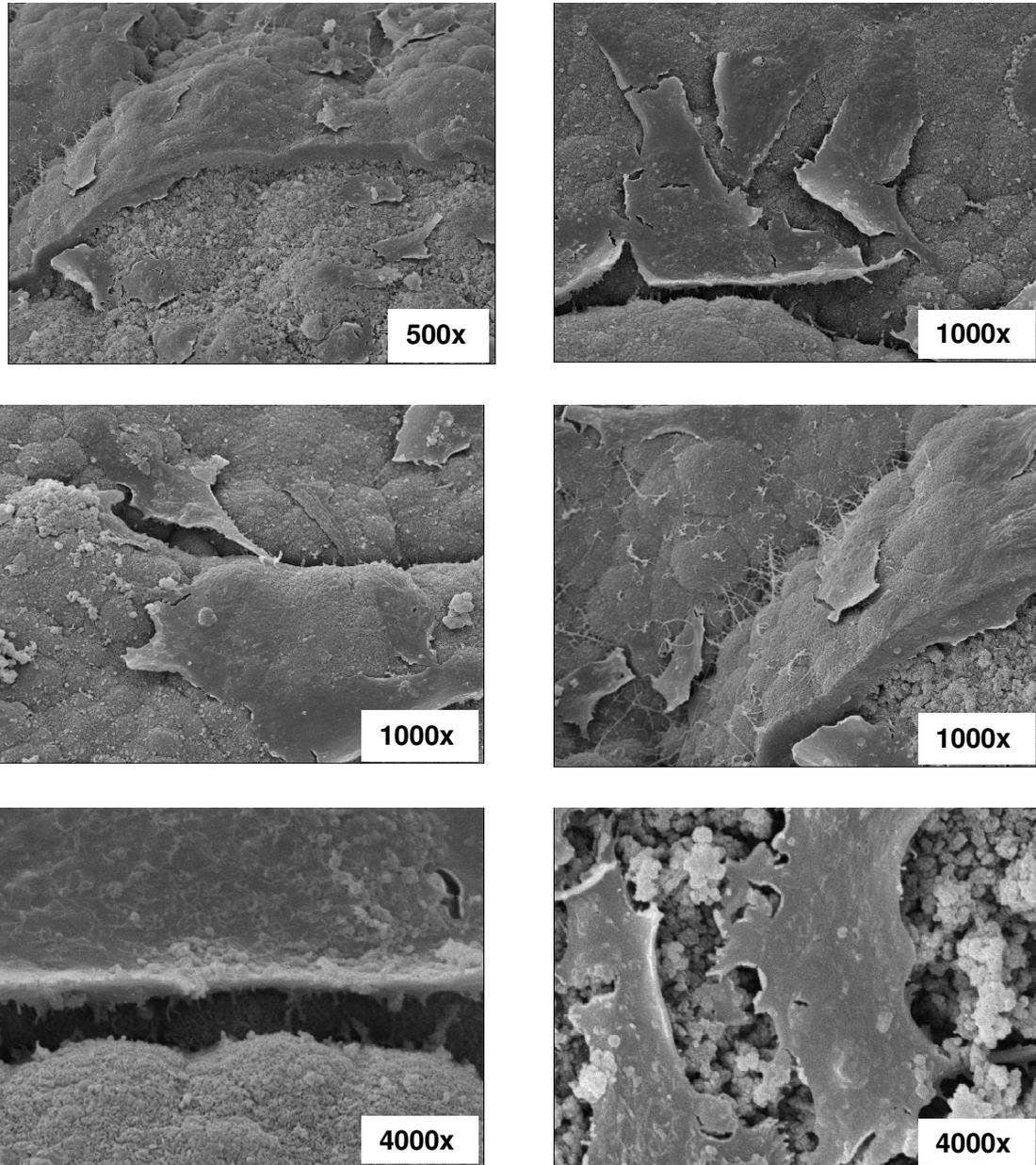


Figura 12: MEV de cultura de células do tipo fibroblastos após 24h de cultivo sobre de tubos DM. As imagens apresentam a formação de camada celular recobrimdo diversas regiões do tubo.

Nas amostras de DN observou-se, após período de cultivo de 24 horas, desenvolvimento mais intenso dos fibroblastos sobre o substrato, quando comparado às

amostras de DM. Identificou-se a formação de uma camada celular espessa (Figura 13) e, em algumas regiões, foi possível identificar a síntese de matriz extracelular fibrosa. Os tubos de DN apresentaram ótima interação, com adesão e proliferação intensa dos fibroblastos, além da síntese de componentes da matriz extracelular (Figura 14).

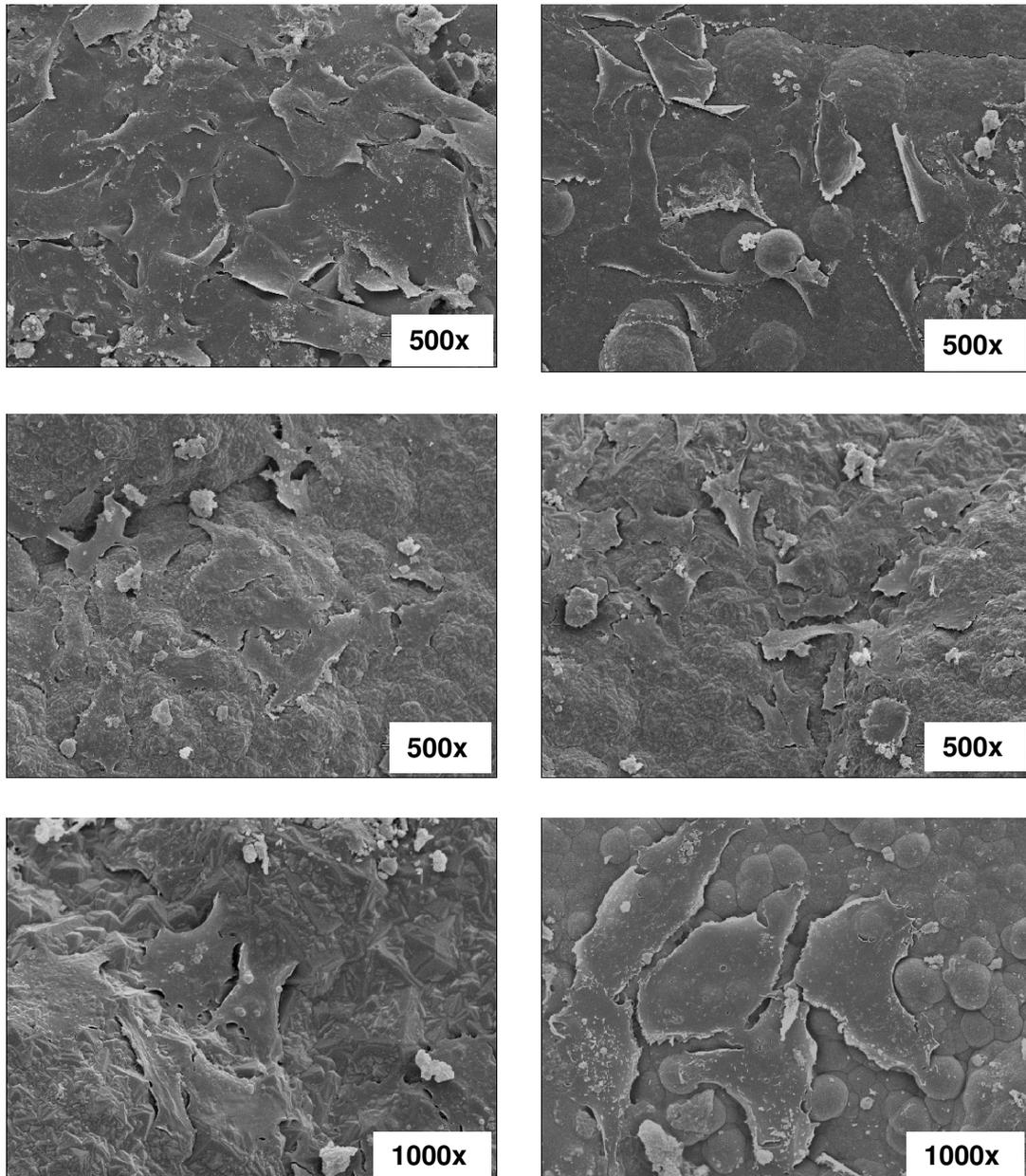


Figura 13: MEV de cultura de células do tipo fibroblastos após 24h de cultivo sobre tubos de DN. Todas as imagens evidenciam a formação de camada celular espessa e confluência celular intensa dos fibroblastos sobre os tubos de DN.

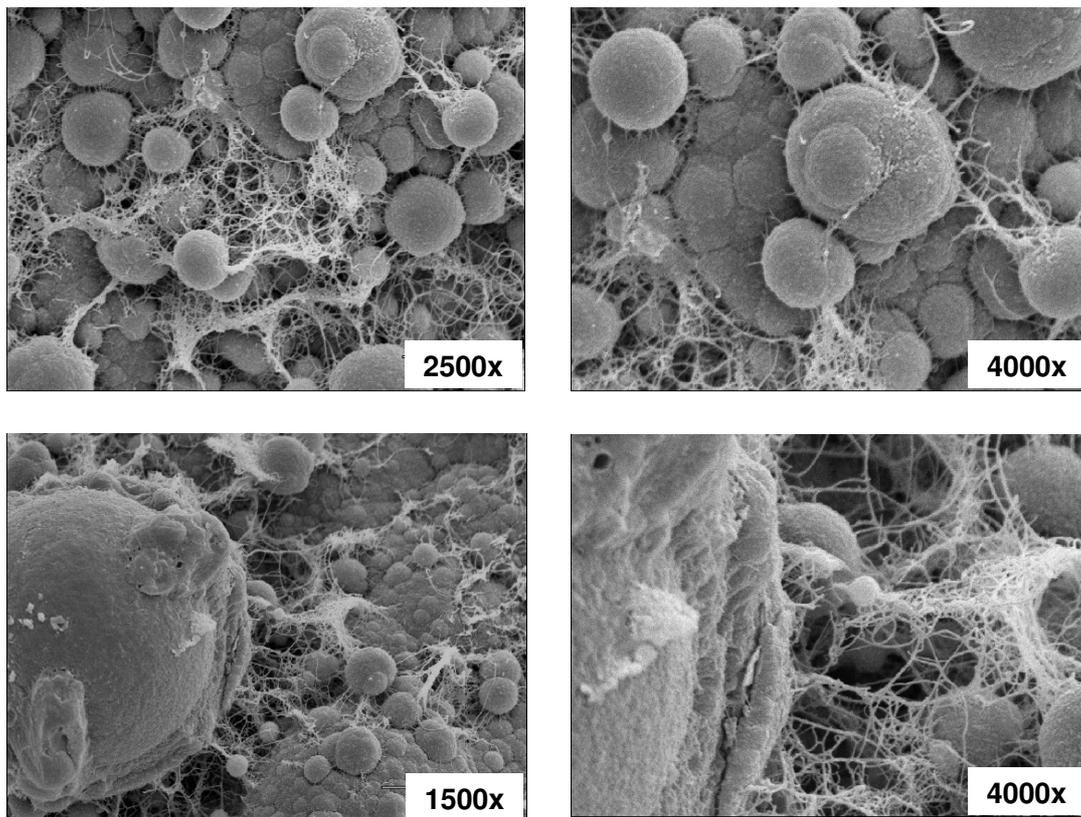


Figura 14: MEV de cultura de células do tipo fibroblastos após 24h de cultivo sobre tubos de DN. As imagens apresentam a síntese de componentes da matriz extracelular indicando ótima interação com os tubos DN.

4. Discussão

A ausência de reações inflamatórias e o crescimento tecidual na interface entre o implante e o tecido hospedeiro é de vital importância para o bom desempenho de próteses, já que estabiliza e minimiza perdas ósseas. A ausência de reações na região do implante favorece a fixação e sobrevivência dos implantes [1].

Neste estudo foram avaliadas as interações de cultura de células em contato com o diamante CVD, reproduzindo o ambiente existente no modelo experimental “*in vivo*” a partir de ensaios “*in vitro*”, que reproduzem de certa forma a região de contato implante-osso.

Foi utilizada uma cultura de células do tipo fibroblasto, sendo que esta escolha foi determinada principalmente pelo fato de que essas células estão presentes normalmente nos locais de aplicações de implantes ortopédicos na prática médica durante o processo de cicatrização [16]. Além do mais, o contato inicial dos fibroblastos com a superfície do material é um evento importante para a osteointegração do mesmo [28-29]. O uso de células do tipo fibroblastos possibilitou avaliar a compatibilidade necessária ao material de implante, que deve permitir as funções celulares de adesão, viabilidade e proliferação sem qualquer tipo de interferência dos materiais sobre o ciclo celular.

Este trabalho demonstra a biocompatibilidade de tubos de diamante produzidos a partir da técnica CVD em reator de filamento quente. Foram avaliadas neste estudo duas diferentes formas do diamante CVD: Nanocristalino e Microcristalino, ambos com características físico-químicas que conferem a este material grande potencial para serem utilizados como materiais de implantes. Dentre as suas principais características destaca-se

sua extrema dureza, alta condutividade térmica, baixo coeficiente de atrito e inércia química, que são propriedades ideais para este tipo de aplicação [21-23].

Os tubos de diamante CVD foram avaliados em culturas de células do tipo fibroblastos oriundos de rim de macaco verde africano a partir de Ensaio de Citotoxicidade Indireta e Direta desenvolvidas por um período de 24 e 48 horas. Para tanto, foi utilizado o Teste de Viabilidade Celular pelo método do MTT e posterior observação das células vivas em contraste de fase após avaliação citoquímica. Para realização do ECI os tubos de diamante foram macerados e colocados em meio Ham F10 por 24 horas. Após o período de cultura, as células do tipo fibroblastos receberam o extrato obtido pela maceração e imersão dos tubos de diamante e permaneceram nestas condições por 24 horas, sendo este tempo suficiente para avaliar qualquer interferência do extrato das amostras sobre a adesão e proliferação celular. O resultado obtido demonstrou que não houve interferência na adesão e proliferação celular após o contato da cultura de células com o extrato do diamante. Este resultado indicou que não houve liberação de substâncias nocivas nas duas composições do diamante CVD, não alterando o desenvolvimento celular. Estes resultados foram comparados com o CNT. O CNT foi produzido através da adição do extrato de poliestireno que não oferece nenhuma interferência ao desenvolvimento celular. Após a leitura de absorbância observamos o número de células viáveis para as duas composições do diamante e comparou-se ao CNT, sendo estes resultados semelhantes entre si. Porém, os dados demonstram que existe uma pequena diferença no desenvolvimento celular mediante as duas composições do diamante, sendo mais intenso na presença de DN. A análise citoquímica mostra que não houve alterações morfofuncionais aparentes nas células que cresceram na presença dos extratos das amostras de diamante CVD.

No ECD, que foi realizado a partir da deposição de cultura de células do tipo fibroblasto em contato direto com a superfície dos tubos de diamante, também foi obtido como resultado boa interação celular com os materiais analisados, caracterizando-os como biologicamente compatíveis. Observamos adesão, proliferação e confluência celular nas duas composições do diamante, sendo mais intensa nas amostras de DN. Estas amostras apresentaram uma confluência celular mais exuberante quando comparada às amostras de DM. Curiosamente, notamos através das imagens de MEV a síntese de componentes da matriz extracelular, provavelmente material fibroso devido à sua morfologia. Os dados obtidos pelo Teste de Viabilidade Celular com o MTT corroboram estes achados, pois baseado nas leituras de absorbância, o número de células sobre as amostras de DN e DM é superior ao número de células obtidas no CPT (fenol).

Estes resultados sugerem, portanto, boa biocompatibilidade dos tubos de diamante CVD. As duas formas do Diamante analisadas permitiram desenvolvimento celular adequado mediante os dois ensaios “*in vitro*”, porém as amostras de DN apresentaram maior número de células viáveis no ECI, formação exuberante de camadas celulares além de ter estimulado a síntese de componentes da matriz extracelular visualizadas no ECD.

Estes resultados podem estar associados com o aspecto superficial dos materiais analisados. Através de micrografias eletrônicas sabe-se que a superfície do DM e DN possuem características próprias e diferentes entre si. A superfície dos tubos de diamante CVD é composta a partir da junção de pequenos grãos de diamante que são formados durante o processo de deposição química em reator de filamento quente. No DM estes grãos possuem formato triangular com ápice piramidal, sendo este aspecto mantido uniformemente por toda a sua extensão. Já o DN, conforme descrito na literatura, é composto por grãos de diamante com acabamento arredondado e aspecto semelhante a uma

couve-flor, sendo este acabamento superficial ocasionado pela composição gasosa contendo Argônio usado para sua síntese.

Diversos fatores podem influenciar as respostas celulares que são desencadeadas na presença do material de implante, tais como sua composição, propriedades físico-químicas, propriedades mecânicas, rugosidade de sua superfície, técnica cirúrgica e modelo do implante [30-32].

Segundo ROSENGREN et al [33], há relação entre o modelo do implante e as reações que ocorrem aos tecidos adjacentes. Estes autores demonstraram por meio de seus estudos que diferentes reações inflamatórias são induzidas aos tecidos e que estas reações variam de acordo com o modelo de implante utilizado. Estes achados foram evidenciados a partir do estudo de dois diferentes modelos de implantes. O primeiro possuía a forma de bastão com a extremidade perfurante e, o segundo, em forma de disco, ambos compostos por titânio. Estes materiais foram implantados na parede abdominal de ratos e após 03, 10 e 30 dias de seguimento foram sacrificados, onde foi observado em todos os intervalos de tempo maior número de células, encapsulamento e maior concentração de macrófagos ao redor dos implantes perfurantes.

Quando biomateriais são implantados dentro do tecido humano, a sua biocompatibilidade vai depender não somente de propriedades físico-químicas adequadas, mas também da reação inicial das células sobre a superfície do material. A rugosidade da superfície está diretamente relacionada à osteointegração dos implantes. EISENBARTH et al [34] estudaram a adesão de fibroblastos sobre ligas de Ti6Al4V com diferentes graus de rugosidade. Depois de dois dias de incubação celular sobre as ligas, foi observado que a adesão aumenta nas superfícies mais rugosas. DELIGIANNI et al [35] observaram maior concentração de células da medula óssea aderidas na superfície rugosa de ligas de Ti6Al4V

após duas horas de crescimento celular e influencia significativa na resposta de células ósseas mediante ligas de Ti rugosa. ANSELME [36] afirmou que culturas de células de osteoblastos aderem preferencialmente à superfícies com rugosidade relativamente alta.

No presente estudo, onde se avaliou as interações celulares com o DN e DM mediante cultura de células do tipo fibroblastos, os resultados obtidos apresentaram maior desenvolvimento celular, formação de camadas confluentes e exuberantes, além da síntese de matriz extracelular frente as amostras de DN. Estes achados evidenciam as diferenças topográficas existentes entre os materiais analisados podendo ter em seu acabamento superficial um fator determinante para maior proliferação celular e indução de síntese de matriz extracelular.

5. Conclusões

Os ensaios “*in vitro*” realizados de forma direta e indireta na presença de células do tipo fibroblastos mostraram que:

- as duas composições do diamante CVD denominados de DN e DM podem ser consideradas não citotóxicas por apresentaram o mesmo desempenho obtido pelas partículas de poliestireno (CNT);
- os DN estimularam mais fortemente a proliferação dos fibroblastos e inclusive a sua produção de matriz extracelular.

6. Referências Bibliográficas

- [1] Anselme K. Osteoblasts adhesion on biomaterials. *Biomaterials*. 2000; (21): 667-681.
- [2] Evans EJ, Thomas IT. The in vitro toxicity of cobalt-chrome-molybdenum alloy and its constituent metals. *Biomaterials*. 1986; (7): 25-29.
- [3] Pohler OE. Unalloyed titanium for implants in bone surgery. *Injury* 2000; (31): 7-13.
- [4] Schmidt C, Ignatius AA, Claes LE. Proliferation and differentiation parameters of human osteoblasts and titanium and steel surfaces *Journal Biomedical Materials Research*. 2001; (54): 209-215.
- [5] Krause A, Cowles EA, Gronowicz G. Integrin-mediated signaling in osteoblasts on titanium implant materials. *Journal Biomedical Materials Research*. 2000; (52): 738-747.
- [6] Thierry B, Tabriziam M, Savadogo O, Yahia L. Effects of sterilization processes on NiTi alloy surface characterization. *Journal Biomedical Materials Research*. 2000; (49): 88-98.
- [7] Assad M, Lemieux N, Rivard CH, Yahia L. Comparative in vitro biocompatibility of nickel titanium, pure nickel, pure titanium, and stainless steel: genotoxicity and atomic absorption evaluation. *Biomedical Materials Engineering*. 1999; (9): 1-12.
- [8] Howlett CR, Zreiqat H, Wu Y, McFall DW, Mckenzie DR. Effect of ion modification of commonly used orthopedic materials on the attachment of human bone-derived cells *Journal Biomedical Materials Research*. 1999; (45): 345-354.
- [9] Josset Y, Oum'Hamed Z, Zarrimpour A, Lorenzato M, Adnet J.J, Laurent-Maquin D. In vitro reactions of human osteoblasts in culture with zirconia and alumina ceramics. *Journal Biomedical Materials Research*. 1999; (47): 181-493.
- [10] Shanbhag AS, Jacobs JJ, Nlack J, Galante JO, Glant TT. Macrophage/particle

interactions: effect of size, composition and surface area. *Journal Biomedical Materials Research*. 1994; (28): 81-90.

[11] Cooper LF, Masuda T, Yliheikkila PK, Felton DA. Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration Part II. In vitro studies. *International Journal Oral Maxillofacial Implants*. 1998; (13): 163-174.

[12] Ziats NP, Miller KM, Anderson JM. In vitro and in vivo interactions of cells with biomaterials. *Biomaterials*. 1998; (9): 5-13.

[13] Jauregui HO. Cell adhesion to biomaterials. The role of several extracellular matrix components in the attachment of non-transfected fibroblasts and parenchymal cells. *ASALO Trans*. 1987; (33): 66-74.

[14] Harmand MF, Bordnave L, Duphil R, Jeandot R, Ducassou D. Human differentiated cell cultures: in vitro models for characterizations of cell/biomaterials interface. In: Christel P. et al., editors. *Biological and biochemical performances of biomaterials*. Amsterdam: Elsevier. 1986; 361-366.

[15] Evans EJ. Cell damage in vitro following direct contact with fine particles alloy and CoCrMb alloy. *Biomaterials*. 1994; (9): 713-719.

[16] Bordji K, Jouzeau JY, Mainard D, Payan E, Netter P, Rie KT, et al. Citocompatibility of Ti-6Al-4V and Ti-5Al-2.5Fe alloys according to three surface treatments, using human fibroblasts and osteoblasts. *Biomater*. 1996; (17): 929-940.

[17] Morrison C, Macnair R, MacDonald C, Wykman A, Goldie I, Grant M.H. In vitro biocompatibility testing of polymers for orthopedic implants using cultured fibroblasts and osteoblasts. *Biomaterials* 1995; (16): 987-992.

[18] Najy A, Harmand LA. Study of the effect of the surface state on the citocompatibility of Co-Cr alloy using human osteoblasts and fibroblasts. *Journal Biomedical Materials*

Research. 1990; (24): 861-871.

[19] Ya J, Cs-Szabo' G, Jacobs JJ, Kuettner KE, Glant TT. Suppression of osteoblasts function by titanium particles. J. Bone Jt Surg Am. 1997; (79): 107-112.

[20] Haynes DR, Rogers SD, Hay S, Percy M.J, Howie DW. The differences in toxicity and release of bone resorbing mediators induced by titanium and cobalt-chromium-alloy wear particles. Journal Bone Joint Surg Am. 1993; (75): 835-844.

[21] Angus JC, Hayman CC. Low-pressure, metastable growth of diamond and "diamond like" phases. Science. 1998; (241): 913-919.

[22] Muller R, Adamschik M, Steidl D, Kohn E, Thamasett S, Stiller S, Hanke H, et al. Application of CVD-diamond for catheter ablation in the heart. Diam and Rel Mat 2004; (13):1080-1083.

[23]Trava-Airold VJ, Corat EJ, Leite NF, Nono MC, Baranauskas V, et al. CVD diamond burrs-development and applications. Diamond and Related Materials. 1996; (5): 857-860.

[24] Kirkpatrick CJ. Biological testing of materials and medical devices - A critical view of current and proposed methodologies for biocompatibility testing: cytotoxicity *in vitro*. Regulatory Affairs. 1992; (4): 13-32.

[25] Sjogren G, Sletten G, Dahl JE. Cytotoxicity of dental alloys, metals and ceramics assessed by Millipore filter, agar overlay and MTT tests. Journal Prosthetic Dentist. 2000; (84); 229-236.

[26] ISO 10993-5 I 1992 (E) Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods.

[27] Lison L Histochemie et Cytochemie Animales – Principes et Methodes. Gauthier Villars, Paris, France. 1960.

[28] Coelho MJ, Cabral AT, Fernandes MH. Human bone cell cultures in biocompatibility

testing. Part I: osteoblastic differentiation of serially passaged human bone marrow cells cultured in alpha-MEM and in DMEM. *Biomaterials* 2000; (21): 1087-1094.

[29] Coelho MJ, Fernandes MH. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, betaglycerophosphate and dexametasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials*. 2000; (21): 1095-1102.

[30] Anderson JM. Inflammatory response to implants. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*. 1998; (34): 101-107.

[31] Branemark PI. Osseointegration and its experimental background. *J Prostet Dentist*. 1983; (50): 186-211.

[32] Salthouse TN. Cellular enzyme activity at the polymer-tissue interface: a review. *Journal Biomedical Materials Research*. 1976 (10): 197-229.

[33] Rosengren A, Daneilsen N, Bjursterm LM. Inflammatory reaction dependence on implant localization in rat soft tissue models. *Biomaterials* 1997; (18): 979-987.

[34] Eiseberth E, Meyle J, Nachtigall W, Breme. Influence of the surface structure of titanium materials on the adhesion of fibroblasts. *Biomaterials*. 1996; (17): 1399-1403.

[35] Deligianni DD, Katsala N, Sotiropolou D, Amedee J, Missirlis YF. Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption. *Biomaterials*. 2001; (22): 1241-1251.

[36] Anselme K, Bigerelle M, Noel B. Effect of grooved titanium substratum on human osteoblastic cell growth. *Journal Biomedical Materials Research*. 2002; (60): 529-540.

Capítulo III

Estudo da interface óssea de tubos de diamante microestruturado e nanoestruturado implantados na região femoral de ratos da linhagem wistar

1. Introdução

Atualmente os materiais de implante empregados na prática médica têm apresentado falhas ao longo do período de sua utilização. Metais e ligas têm sido os principais materiais utilizados na fabricação de próteses articulares, implantes para tratamento de fraturas e implantes odontológicos [1-2]. Esses materiais, em sua grande maioria ligas de titânio e aço inoxidável, geram reações inflamatórias mínimas logo após o implante que, entretanto, não causam alterações significativas aos tecidos, sendo este comportamento ideal para essas aplicações [3]. Porém, após determinado período de permanência eles apresentam sinais de corrosão que leva à liberação de partículas, deposição de íons metálicos ao redor do implante e, conseqüentemente, promoção da reabsorção óssea, comprometendo significativamente a durabilidade das próteses [4-7].

De acordo com o “National Institutes of Health Consensus Statement”, mais de 120.000 próteses são implantadas anualmente nos Estados Unidos (EUA), com índices de aproximadamente 10% de revisões cirúrgicas de todos os implantes efetuados. Considerando o aumento de procedimentos primários e as revisões de implantes realizados, os dados anuais indicam aumento no número de indivíduos com implantes e, conseqüentemente, de problemas associados à liberação de partículas e reabsorção óssea.

Essas ocorrências, de acordo com os dados constatados, vêm comprometendo a longevidade das próteses, diminuindo efetivamente a sua função [8-10].

Devido aos problemas descritos, torna-se necessário o desenvolvimento de novos materiais que ofereçam uma ótima interação com o tecido receptor a curto, médio e longo prazo. Esses materiais devem ser totalmente inertes aos tecidos biológicos e fluidos corpóreos para não alterar suas propriedades físico-químicas e, assim, manter sua morfologia ao longo do período de sua utilização e não liberar nenhuma substância nociva ao organismo.

Na década de 1970, um material com as mesmas características físico-químicas de um diamante natural foi produzido a partir de uma técnica denominada “Chemical Vapor Deposition” (CVD). O diamante obtido a partir dessa técnica possui excelentes propriedades físico-químicas, como extrema dureza, alta condutividade térmica, baixo coeficiente de atrito e inércia química [11-12]. A partir da constatação de suas propriedades, houve crescente interesse em toda a comunidade científica em desenvolver produtos compostos por diamante CVD para diversas aplicações [13].

Desde então, inúmeros estudos foram realizados utilizando o diamante CVD e, graças aos avanços obtidos, hoje em dia é possível produzir o mesmo material com diferentes formas e acabamentos superficiais, potencializando sua utilização em diversos seguimentos. A variabilidade de formas e a pureza do material se devem ao substrato adotado e o acabamento superficial pode ser programado de acordo com a diluição com gases nobres empregada durante sua síntese, obtendo-se um acabamento superficial diferenciado. Desta forma, este material pode ser sintetizado com características específicas para cada tipo de aplicação [13].

O diamante CVD foi alvo de inúmeros estudos descritos na literatura devido às suas propriedades, que lhe assegura aplicabilidade em diferentes áreas [14-15] e, apesar de ter sido assunto de grande interesse por muito tempo, só agora foram sinalizados como úteis para aplicações biológicas [16-17].

Especificamente como material de implante, este material pode vir a oferecer soluções promissoras aos atuais problemas identificados na prática médica. TANG et al [17] descrevem que as propriedades do diamante CVD são superiores, quando comparadas aos metais e ligas utilizados atualmente. Segundo os autores, o diamante CVD, quando comparado ao titânio e aço inoxidável, apresenta notável superioridade. Esses achados indicam que os materiais diamantíferos possuem os adjetivos necessários para fabricação e revestimento de implantes, conforme pode ser visto na Tabela 02.

Tabela 02: Comparação das propriedades entre: diamante CVD, titânio e Aço Inoxidável. (TANG et al, 1995)			
Propriedades	Diamante CVD	Titânio	Aço Inoxidável 316
Dureza (Kg mm ⁻²)	10 000	230	210
Modulo de Elasticidade (GPa)	1000	120.2	215.3
Modulo de Compressão (GPa)	442	108.6	166
Condutividade Térmica (Wm ⁻¹ K ⁻¹)	20	0.21	0.16
Expansão térmica (x10 ⁻⁶ K ⁻¹)	1.1	8.8	17.2

Baseado nessas evidencias, alguns estudos vêm sendo desenvolvidos e visam à utilização do diamante CVD para aplicações biomédicas. No entanto, poucas análises

referentes à sua biocompatibilidade e aplicações como material de implante foram demonstrados até o presente momento.

Um material adequado para o desenvolvimento de implantes ortopédicos não deve ser apenas biocompatível, mas também resistente ao desgaste e quimicamente estável e, de acordo com as propriedades do diamante CVD, já descritas no capítulo anterior, este material possui os adjetivos necessários para estas aplicações, sendo esta a principal razão para o desenvolvimento de ensaios “*in vivo*”. Deve-se ainda considerar que o revestimento dos implantes ortopédicos articulares com diamante CVD pode melhorar a qualidade dos implantes, já que a inexistência de metais evita a corrosão e problemas associados aos implantes metálicos. Além disso, a extrema dureza dos materiais diamantíferos pode assegurar também baixos níveis de desgaste e, conseqüentemente, ausência de resíduos nos tecidos adjacentes ao implante.

O objetivo do presente estudo foi caracterizar e analisar a interação de tubos de Diamante Nanoestruturado (DN) e de Diamante Microestruturado (DM) com o tecido ósseo de ratos da linhagem Wistar, reconstituindo a interface implante-osso.

2. Material e Métodos

O protocolo nº 848-1 intitulado “Avaliação da interface óssea de tubos de diamante (CVD) implantados na região femoral de Ratos da Linhagem Wistar” para uso de animais está de acordo com os princípios éticos na Experimentação Animal regulamentados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Este protocolo foi aprovado em 08 de Junho de 2005 pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) do IB da UNICAMP (Apêndice A).

2.1 Material

2.1.1 Tubos de Diamante CVD

Foram utilizados tubos DN, tubos de DM e tubos de aço inoxidável 316L (AI) com as dimensões de 10mm x 1,2mm. Os tubos de diamante utilizados neste estudo foram desenvolvidos no LANADIA do DSIF da FEEC da UNICAMP e os tubos de AI foram fornecidos pela empresa Engiplam.

2.1.2 Animais utilizados

Foram utilizados 23 ratos machos brancos, da linhagem Wistar, com 20 semanas de idade e com peso aproximado de 300g, fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP. Durante o período de seguimento adotado neste estudo os animais foram mantidos em gaiolas de plástico com tampa de metal e maravalha e alimentados com ração industrializada e água de torneira fornecida “*ad libitum*”. As caixas com os animais permaneceram isoladas em área restrita a animais de experimentação, localizada no Biotério do NMCE da FCM da UNICAMP.

2.2 Métodos

2.2.1 Grupos Experimentais

Os 23 animais foram divididos em 05 grupos onde foram implantados tubos de DN, tubos de DM e tubos AI, sendo este último o grupo controle. O tempo de seguimento estabelecido foi de 04 e 08 semanas, conforme descrito na Tabela 03.

Tabela 03: Grupos experimentais divididos em função do tempo de seguimento e material implantado					
Grupo	Nº de Animais	Data Experimento	Data Sacrifício	Material Implantado	Tempo de seguimento
1	5	02/09/2005	28/10/2005	DN	08 semanas
2	5	02/09/2005	28/10/2005	DM	08 semanas
3	4	02/09/2005	30/09/2005	DM	04 semanas
4	4	02/09/2005	30/09/2005	DN	04 semanas
5	5	03/04/2006	29/05/2006	AI	08 semanas

2.2.2 Procedimento Cirúrgico

Os animais foram anestesiados via endovenosa caudal com Hypinol na concentração de 30ml/kg. Foi realizada tricotomia da pata posterior esquerda e anti-sepsia do local com solução alcoólica de iodo. Com auxílio de bisturi um acesso de aproximadamente 1 cm foi feito ao longo da face lateral do fêmur (Figura 15).



Figura 15: Incisão de 1 cm efetuada acima do fêmur da pata posterior esquerda

Os feixes musculares expostos após a incisão foram divulsionados pelo plano intermuscular com auxílio de afastadores acessando a face lateral da diáfise do fêmur (Figura 16).

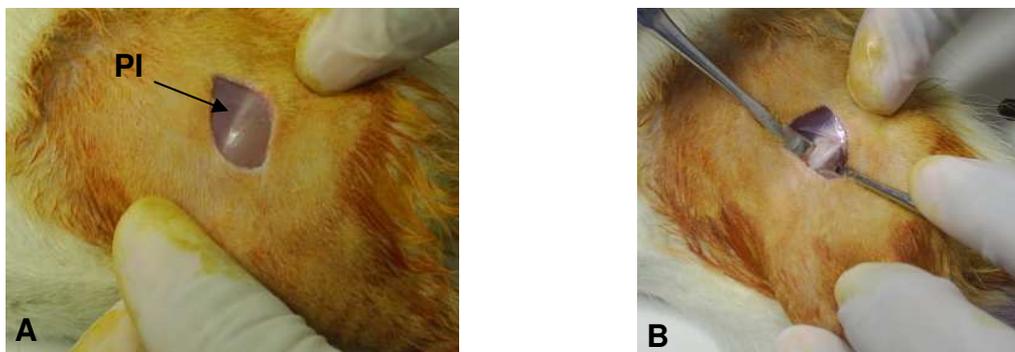


Figura 16: A) Localização do Plano Intermuscular (PI) e B) Utilização de afastadores para divulsionar os feixes musculares e expor a face lateral da diáfise do fêmur

Em seguida uma perfuração oblíqua a 45° aproximadamente em relação ao longo do eixo da diáfise foi feita utilizando uma Furadeira Bosch de baixa rotação com broca helicoidal de 10mm x 1,2mm até atingir a cavidade medular (Figura 17).

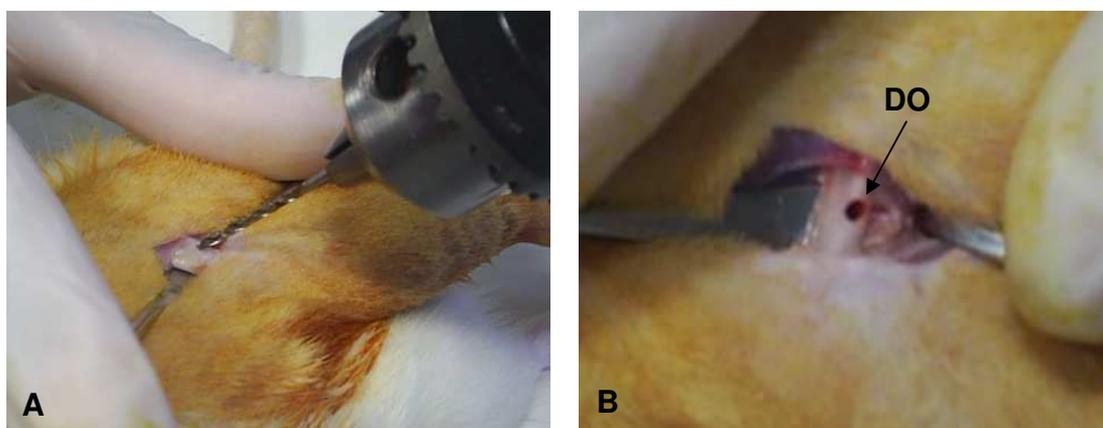


Figura 17: A) Perfuração da face lateral da diáfise do fêmur com utilização de furadeira de baixa rotação. B) Imagem do defeito ósseo (DO).

O local foi previamente irrigado com solução fisiológica para a retirada de fragmentos ósseos onde os tubos de DN, DM e AI com as mesmas dimensões do defeito

ósseo foram imediatamente implantados permanecendo a sua ponta pouco saliente na diáfise (Figura 18). Em seguida os afastadores foram removidos e os feixes musculares recobriram a região do implante. A pele foi suturada com fio Mononylon 3.0 Ethycon.



Figura 18: Imagem do tubo de diamante CVD sendo implantado no defeito ósseo

2.2.3 Sacrifício

Decorrido o tempo de seguimento previsto de 04 e 08 semanas respectivamente, os animais foram pesados e sacrificados através do aprofundamento da anestesia através da mesma via citada no item “2.2.2 Procedimento Cirúrgico”. Para retirada dos fêmures que continham os tubos de DN, DM e AI implantados foi feita uma incisão ao longo do fêmur onde a porção proximal e distal foi desarticulada com auxílio de bisturi. Logo em seguida os fêmures foram avaliados através de AM e imediatamente fixados em solução de Formaldeído a 10% por 24 horas para manter as estruturas da porção óssea para as análises posteriores.

2.2.4 Avaliação dos espécimes

Após a retirada os fêmures foram submetidos à AM com auxílio de máquina digital e Lupa Estereoscópica para captura de imagens. Após a obtenção das imagens foi dado início aos procedimentos histológicos para análise em MOC, descritos a seguir.

2.2.5 Análise Macroscópica (AM)

A AM da superfície dos fêmures foi feita com auxílio de Máquina Fotográfica Digital Samsung Digimax 401-4.0 e de Lupa Estereoscópica Zeiss STM-11 com câmera digital Canon Power G5 acoplada disponível no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas (HC) da FCM da UNICAMP.

2.2.6 Microscopia Óptica Convencional (MOC)

Após a fixação em Formaldeído 10% os fêmures foram submetidos a um período de descalcificação de 15 dias em Ácido Nítrico 7%. Este procedimento possibilita a retirada do cálcio presente abundantemente no tecido ósseo, promovendo a perda da rigidez e conseqüente remoção dos tubos de DN, DM e AI para posterior análise de sua superfície por MEV.

Os espécimes ósseos sem os implantes foram submetidos a um processo de desidratação progressiva, que consiste em banhos sucessivos de Etanol em concentrações crescentes (70%, 80%, 90%, 95% e 100%). Em seguida o Etanol foi substituído por Xilol e os espécimes foram posteriormente mergulhados em parafina fundida a 60°C para a obtenção de blocos. Estes foram mantidos em temperatura ambiente para solidificação, a fim de se obter blocos resistentes a cortes em Micrótomo Leica modelo RM 2155 com 4µm de espessura.

Os cortes obtidos foram tratados com corantes específicos, de modo a tornar seus componentes visíveis e destacados um do outro, etapa esta indispensável para análise em MOC. Os métodos de colorações adotados neste trabalho foram os de Hematoxilina Eosina (HE) e Tricrômico de Masson (TM) para posterior análise em Microscópio Óptico Leica modelo DM500 com programa Leica Qwin para captura e análise de imagem disponível no LABIMO do NMCE da FCM da UNICAMP.

A dupla coloração de HE é a técnica mais difundida e se presta à coloração dos componentes aniônicos como os ácidos nucléicos, corados pela Hematoxilina, e componentes catiônicos como as proteínas e glicoproteínas, corados pela Eosina.

O TM é formado por três corantes e permite distinguir nitidamente o núcleo, corado pela Hematoxilina, o citossol, corado pela Eosina e matriz extracelular que se cora em azul pelo corante Azul de anilina.

2.2.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Após a retirada dos espécimes ósseos descalcificados os tubos de DN, DM e AI foram desidratados progressivamente em banhos sucessivos de Acetona em concentrações crescentes (70%, 80%, 90%, 95% e 100%). Em seguida os tubos foram submetidos aos processos referentes à secagem com utilização de Equipamento de Ponto Crítico Balzers CTD-030. Após a realização do Ponto Crítico os tubos foram metalizados a ouro em Sputerr Coater SCD-050 e observados em Microscópio Eletrônico Low Vacuum JEOL 5800 no LNLS para analisar a adesão de tecidos sobre a superfície dos tubos.

Esta análise é de fundamental importância para verificar o crescimento e a adesão do tecido neoformado sobre a superfície dos tubos que permaneceram em contato com os

fluidos e tecidos biológicos presentes no local do implante após período de seguimento pré-determinado.

3. Resultados

Nos tópicos seguintes encontram-se descritos os resultados obtidos a partir dos Ensaio de Biocompatibilidade “*in vivo*”, na qual as duas formas do diamante, DN e DM e tubos de AI foram submetidas a análises.

3.1 Análise Macroscópica

3.1.1 Análise Macroscópica - Máquina Digital

A Análise Macroscópica da superfície dos fêmures foi feita inicialmente utilizando Máquina Fotográfica Digital. A figura 19 apresenta o aspecto encontrado sobre a superfície dos fêmures dos animais com tempo de seguimento de 04 semanas (Figura 19A) e 08 semanas (Figura 19B), ambos com tubos de DN implantados. A Figura 20 apresenta os fêmures dos animais com tubos de DM e tempo de seguimento de 04 semanas (Figura 20A) e 08 semanas (Figura 20B).

Na superfície dos fêmures dos animais com tubos de DN implantados notou-se após período de seguimento de 04 semanas o recobrimento da extremidade dos tubos por tecido biológico neoformado, sendo este aspecto observado em todos os animais pertencentes a este grupo (Figura 19A). Os fêmures com tubos de DN implantados e período de seguimento de 08 semanas apresentaram um crescimento tecidual exuberante cobrindo totalmente a extremidade do tubo de DN (Figura 19B).



Figura 19A: Superfície do fêmur com implante de DN e tempo de seguimento de 04 semanas. Extremidade do tubo de DN após 04 semanas já se apresentou recoberta por tecido neoformado



Figura 19B: Superfície do fêmur com implante de DN e tempo de seguimento de 08 semanas. Extremidade do tubo de DN foi totalmente recoberta.



Figura 20A: Superfície do fêmur com implante de DM após período de seguimento de 04 semanas. Extremidade do tubo DM permaneceu exposta.



Figura 20B: Superfície do fêmur com implante de DM após período de seguimento de 08 semanas onde notou-se o recobrimento da extremidade do tubo

Nos animais com tubos de DM implantados notou-se que a extremidade do tubo permaneceu exposta após o contato com os tecidos e fluídos do organismo, após 04 semanas de seguimento (Figura 20A). Verificou-se a ausência de adesão de tecido neoformado não recobrimdo desta forma a extremidade do tubo de DM. Nos animais com tubos de DM implantados e período de seguimento igual a 08 semanas notou-se o recobrimento da extremidade dos tubos de DM conforme pode ser observado na Figura 20B.

No grupo controle, onde foram implantados tubos de AI verificou-se, após período de seguimento de 08 semanas, adesão tecidual moderada não recobrimdo totalmente a extremidade tubo. Na figura 21 notamos que a extremidade do tubo de AI se manteve

exposta sendo esta característica preservada em todos os animais pertencentes ao grupo controle.



Figura 21: Superfície do fêmur com implante de AI após 08 semanas de seguimento. Extremidade do tubo permaneceu exposta.

Os animais pertencentes a todos os grupos experimentais com períodos de seguimento de 04 e 08 semanas apresentaram, sem exceção, no momento do sacrifício ótima cicatrização do tecido epitelial e ausência de processo inflamatório nos tecidos adjacentes. Os tubos de DN, DM e AI permaneceram no local de implante não sendo registrado nenhuma intercorrência, como por exemplo, migração das amostras.

A partir destas análises foi possível constatar que os tubos de DN apresentaram, nos dois períodos de seguimentos adotados neste estudo, o recobrimento de sua extremidade por tecido biológico indicando ótima interação dos tubos de DN com os tecidos ao seu redor. Esta característica sinaliza uma interface implante-osso propícia a aplicações de DN como material de implante. Estes resultados sugerem que a diluição do diamante em 65% de Argônio incite também no modelo animal uma remodelação óssea mais rápida e intensa quando comparado aos resultados obtidos nos grupos com tubos de DM implantados e com o mesmo período de seguimento. Estes achados confirmam os resultados observados no ECD “in vitro” onde notou-se desenvolvimento celular intenso frente aos tubos de DN, com síntese de matriz extracelular.

Os implantes de DM apresentaram na AM ótima interação, pois não causaram nenhuma modificação significativa ao tecido receptor, caracterizando boa tolerância dos tecidos aos tubos de DM implantados. Estes resultados demonstram que ambos os diamantes analisados possuem comportamento adequado para aplicações como materiais de implante. Porém notou-se que existe uma diferença significativa entre eles. Os tubos de DN estimularam um crescimento tecidual ao seu redor produzindo uma camada de tecido neoformado exuberante. Esta camada recobriu totalmente a extremidade dos tubos de DN, sendo este comportamento observado nos dois períodos de seguimento e em todos os animais pertencentes a estes grupos. O mesmo crescimento não foi observado frente às amostras DM que obtiveram o recobrimento de sua extremidade somente no período de seguimento de 08 semanas, conforme pode ser comparado nas Figuras 20A e 20B.

O grupo controle, que contou com tubos de AI, apresentou adequada interação com os tecidos adjacentes, não provocando alterações significativas no mesmo. Os animais apresentaram no momento do sacrifício ótima cicatrização e não foi observado processo inflamatório. Os tubos de AI permaneceram expostos, não sendo identificado crescimento ou adesão tecidual significativa, conforme observado na Figura 21.

3.1.2 Análise Macroscópica - Lupa

A partir da constatação dos resultados obtidos através da AM com utilização de máquina digital foi feita a análise da superfície dos fêmures com utilização de Lupa com sistema de aquisição de imagens integrado.

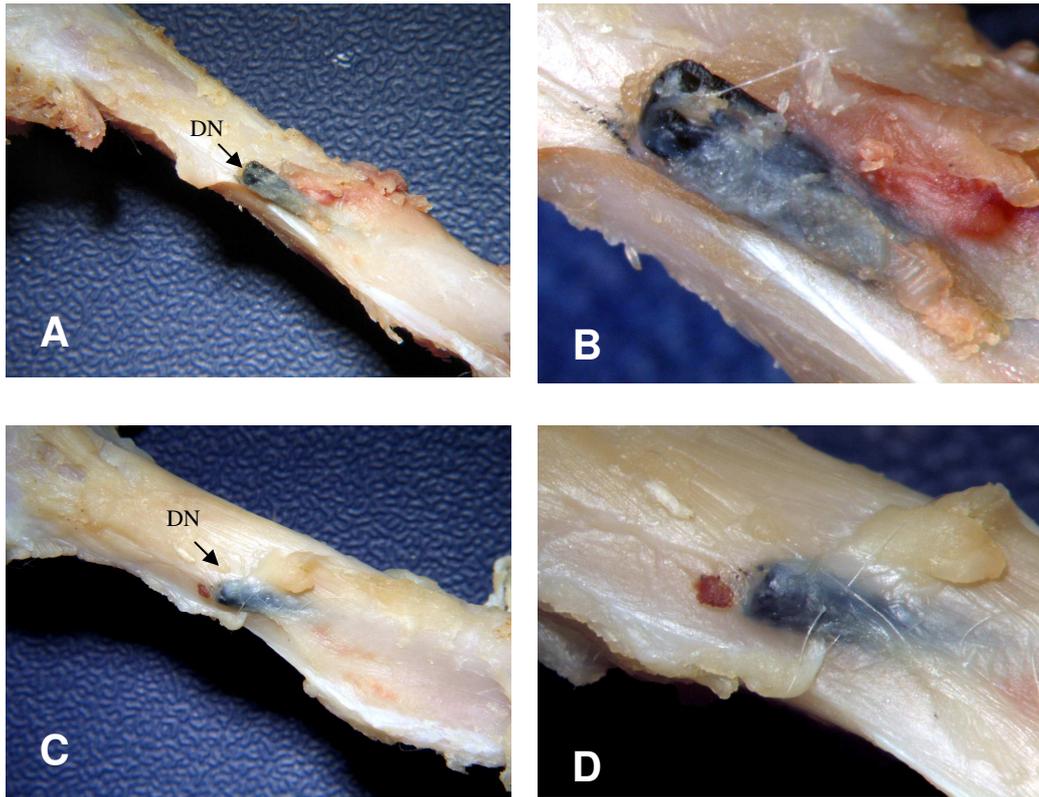


Figura 22: (A e B) Implantes de DN com tempo de seguimento de 04 semanas onde nota-se tecido aderido em toda a extremidade do tubo. (C e D) Implantes de DN com tempo de seguimento de 08 semanas onde observou-se recobrimento exuberante de tecido neoformado em toda a extremidade do tubo de DN.

Nas imagens obtidas notou-se claramente nos fêmures com tubos de DN implantados e tempo de seguimento de 04 semanas adesão de tecido neoformado sobre a extremidade do tubo (Figura 22A e 22B). Nos fêmures com tubos de DN implantados e tempo de seguimento de 08 semanas identificou-se um crescimento tecidual intenso, cobrindo de forma exuberante a extremidade do tubo conforme pode ser visualizado na Figura 22C e 22D.

Os fêmures que continham tubos de DM implantados e com tempo de seguimento de 04 semanas não apresentaram aderência de tecidos sobre a extremidade do tubo que se manteve exposta em todos os animais pertencentes a este grupo (Figura 23A e 23B).

Já nos fêmures com tubos de DM implantados e período de seguimento de 08 semanas observou se um crescimento de tecido biológico moderado próximo a extremidade do tubo, não sendo este crescimento mantido por toda sua extensão (Figura 23C e Figura 23D).

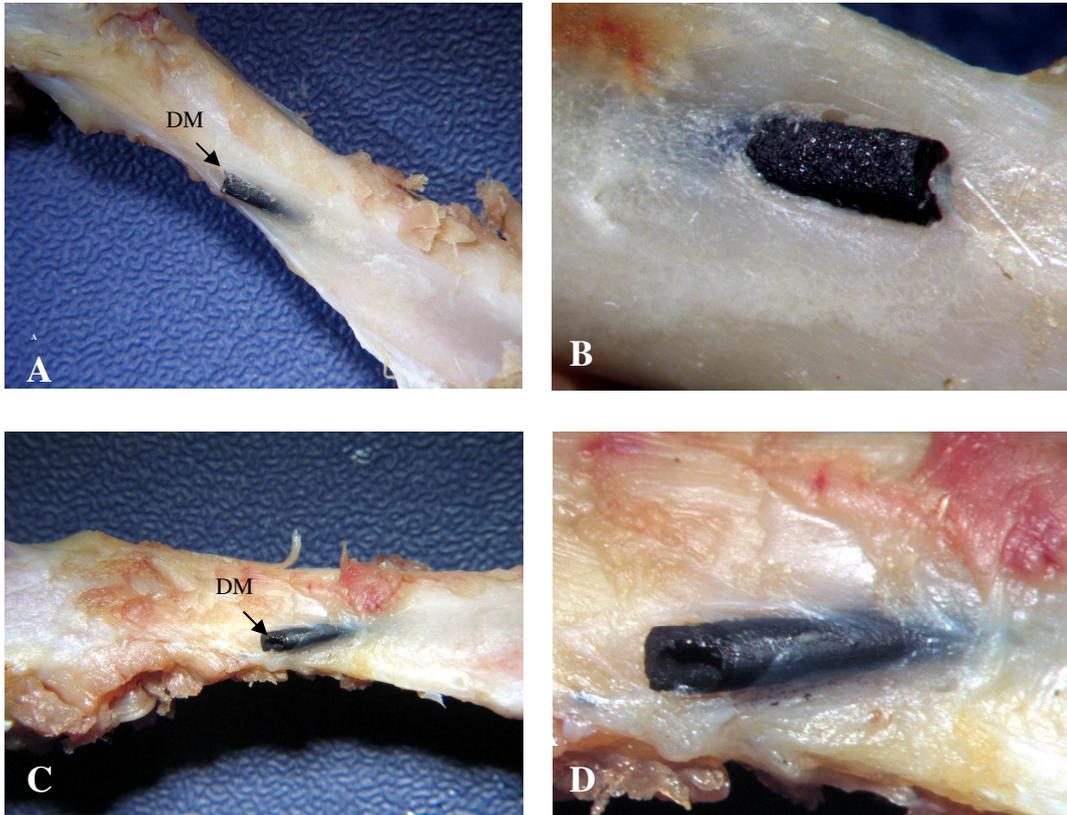


Figura 23: (A e B) Implantes de DM com tempo de seguimento de 04 semanas. (C e D) Implantes de DM com tempo de seguimento de 08 semanas. Nota-se nos dois períodos de seguimento a extremidade dos tubos exposta

Foi possível através destas análises obter informações referentes a região de implante-diamante osso e superfície dos tubos de DN e tubos de DM. Notamos claramente a presença de tecido de recobrimento nas amostras de DN nos dois períodos de seguimento evidenciando a diferença entre as duas formas do diamante CVD analisadas.

3.2 Variação de Massa

Avaliando-se a massa dos animais com tubos de DN e DM implantados na data do experimento e após o período de seguimento determinado por grupo, notou-se um aumento na massa final em todos os animais conforme pode ser observado na Tabela 04.

Tabela 04: Tabela de Variação de massa dos animais com tubos de DN e DM após 04 e 08 semanas de seguimento				
Animais	Tempo de seguimento	Material Implantado	Massa Inicial (g)	Massa Final (g)
R1	08 semanas	DN	425	452
R2			360	482
R3			470	533
R4			410	456
R5			370	410
R6	08 semanas	DM	470	530
R7			426	435
R8			428	469
R9			420	459
R10			412	432
R11	04 semanas	DM	448	460
R12			400	408
R13			391	404
R14			484	493
R15	04 semanas	DN	413	431
R16			500	515
R17			506	522
R18			410	432

Notou-se um maior aumento de massa corporal entre os animais pertencentes aos grupos com período de seguimento mais longo e menor índice de aumento de massa corporal nos animais pertencentes aos grupos de menor tempo de seguimento. As proporções destas variações podem ser observadas na Tabela 05 onde nota-se um aumento de massa significativa nos animais pertencentes aos grupos com tubos de DN implantados.

Tabela 05: Valores médios das massas corporais e porcentagem de aumento após cada procedimento experimental

Grupo/ tempo de seguimento	Material Implantado	Média Massa Inicial (g)	Média Massa Final (g)	% aumento de massa (g)
01 08 semanas	DN	407	466,6	14,65
02 08 semanas	DM	431,2	465	7,84
03 04 semanas	DM	344,6	353	2,44
04 04 semanas	DN	365,8	380	3,89

A partir destes achados observou-se que os animais com tubos de DN implantados e com tempo de seguimento de 08 semanas apresentaram um aumento de massa corporal de 14,65% enquanto os animais com tubos de DM com o mesmo tempo de seguimento apresentaram um aumento de 7,84%. Da mesma forma comparou se os animais com tubos de DN e DM com período de seguimento de 04 semanas e notou-se um aumento de massa corporal de 3,89% e 2,44%, respectivamente. Mais uma vez os animais com tubos de DN implantados apresentaram um maior aumento de massa corporal.

Estas variações de massa podem ser observadas nas figuras 24, 25, 26, 27 e 28 sendo apresentado na figura 24 as variações de massa dos animais com tubos de DN implantados após 08 semanas de seguimento. A figura 25 apresenta as variações de massa dos animais com tubos de DM implantados após 08 semanas de seguimento. Já nas figuras 26 e 27 apresentam as variações de massa dos animais com implantes de DM e DN após 04 semanas de seguimento, respectivamente. A figura 28 apresenta as variações de massa de todos os grupos.

Gráfico DN 08 semanas

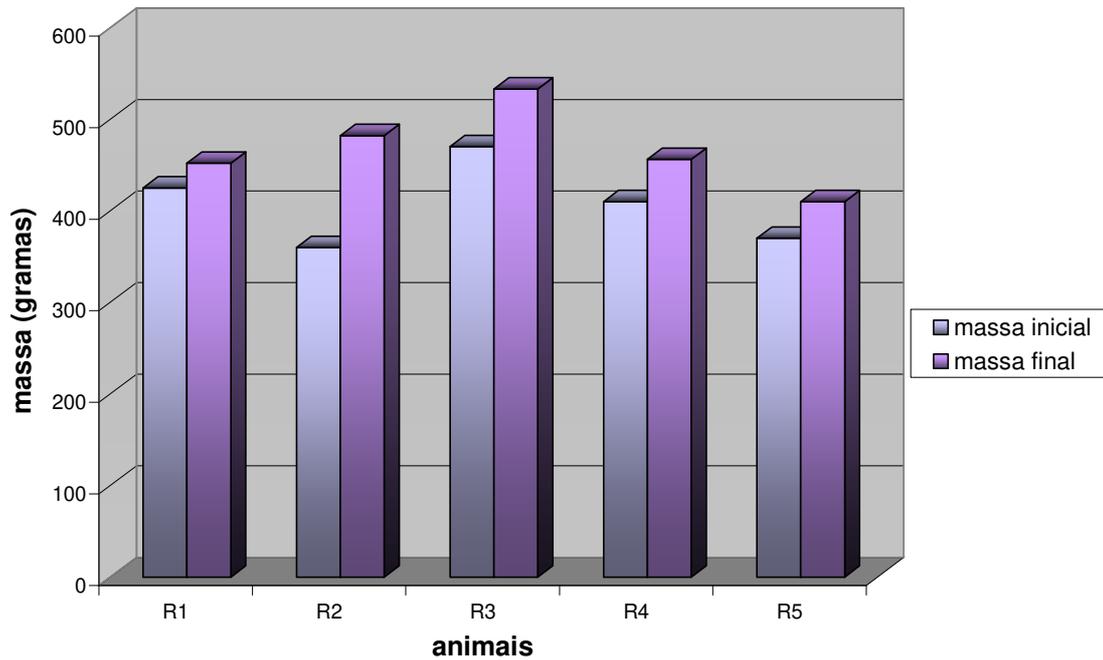


Figura 24: Valor da massa corporal inicial e final dos animais com implantes de DN e período de seguimento de 08 semanas

Gráfico DM 08 semanas

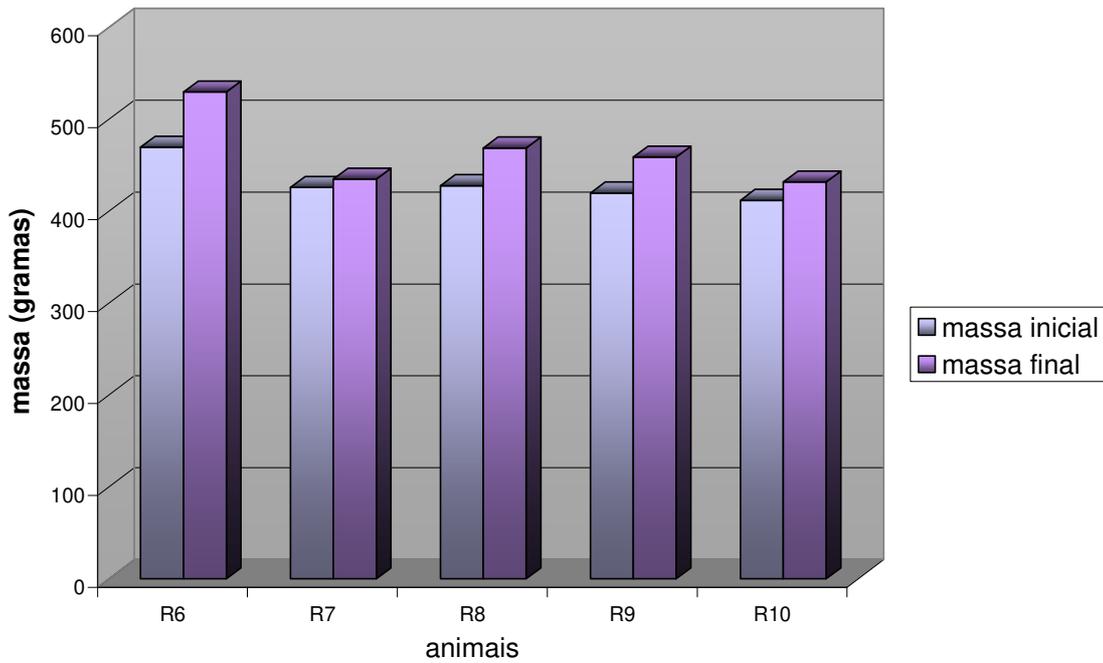


Figura 25: Valor da massa corporal inicial e final dos animais com implantes de DM e período de seguimento de 08 semanas

Gráfico DM 04 semanas

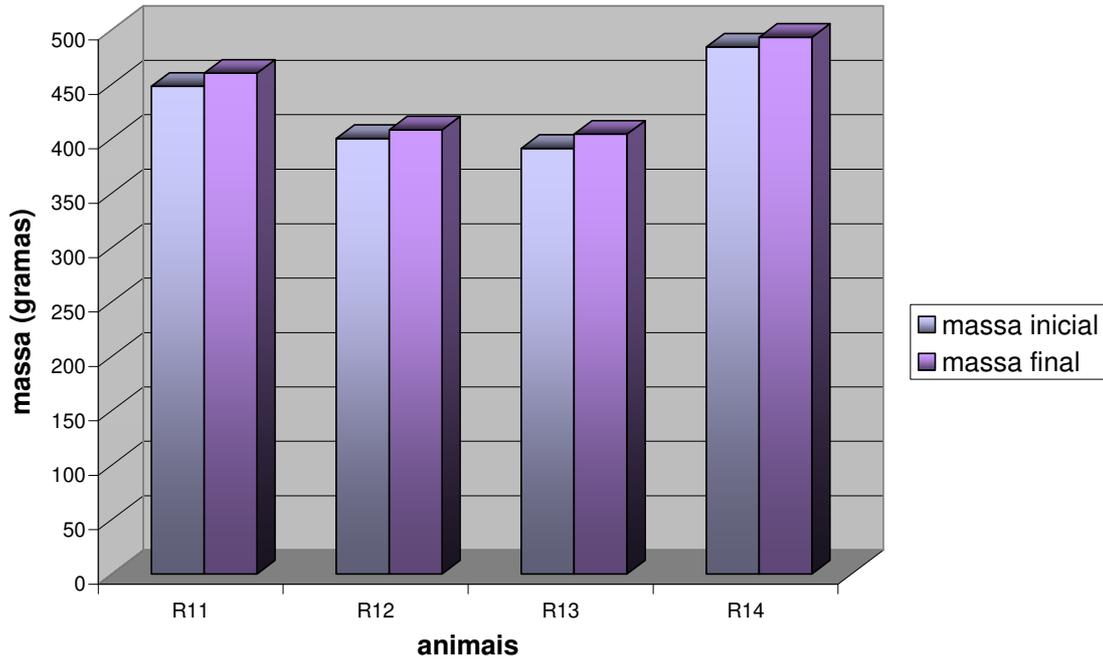


Figura 26: Valor da massa corporal inicial e final dos animais com implantes de DM e período de seguimento de 04 semanas

Gráfico DN 04 semanas

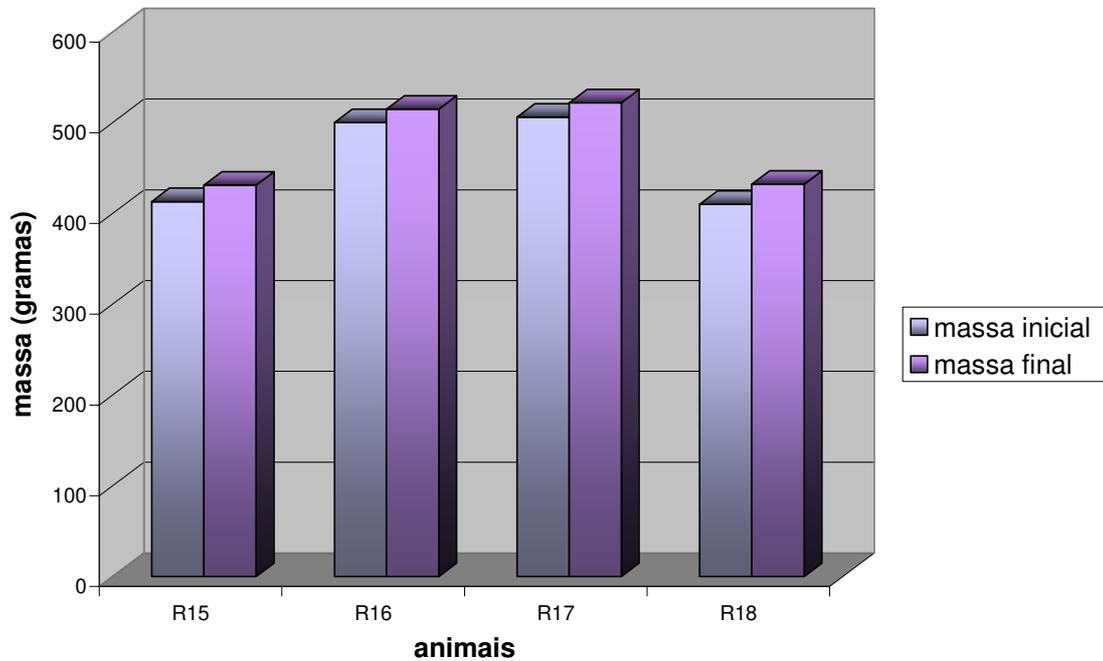


Figura 27: Valor da massa corporal inicial e final dos animais com implantes de DN e período de seguimento de 04 semanas

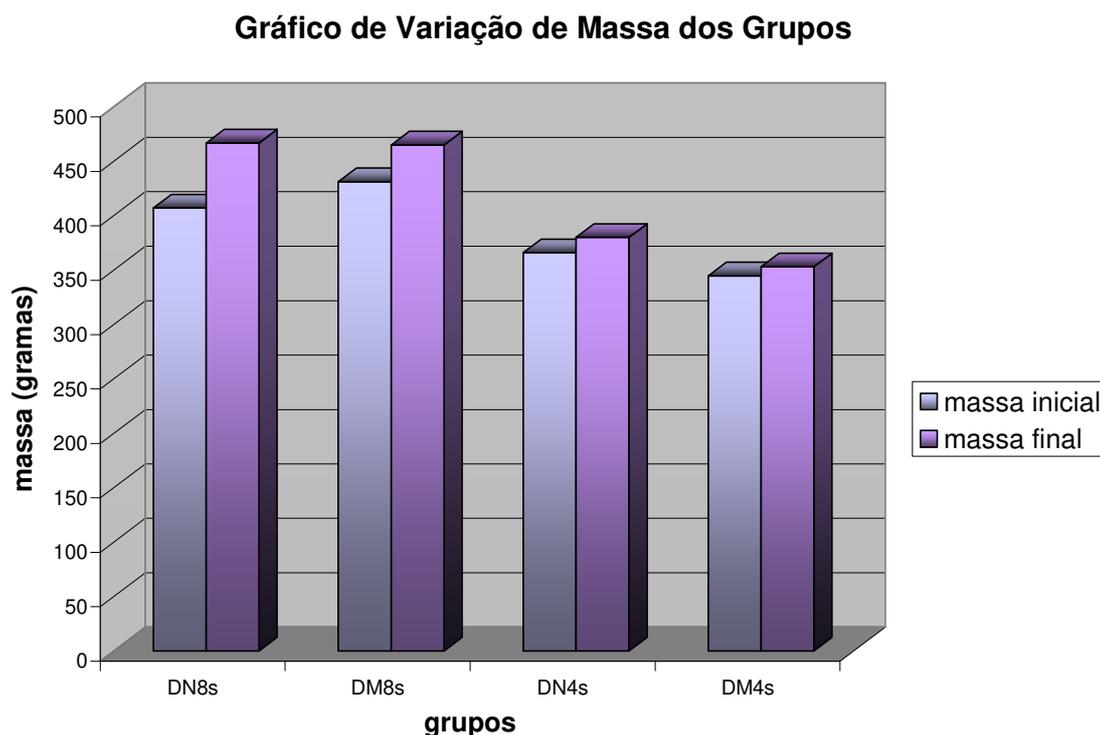


Figura 28: Valores médios das massas corporais dos animais com implantes de DM e DN após 04 e 08 semanas

3.3 Microscopia Óptica Convencional (MOC)

Através da MOC pode-se observar o crescimento de tecido ósseo na interface implante-osso. Notou-se ao redor dos tubos de DN, DM e AI a presença de tecido ósseo neoformado e ausência de tecido fibroso ou processo inflamatório.

No grupo com tubos de DN implantado e período de seguimento de 04 semanas notou-se na interface diamante-osso a presença de tecido ósseo neoformado e ausência de tecido fibroso ou processo inflamatório (Figura 29A e 29B). Nestas imagens notou se a organização do tecido ósseo neoformado circundando inteiramente o tubo de DN após 04 semanas de implante, sendo esta formação contínua, espessa e bem definida ao redor dos tubos.

No grupo com tubos de DN implantado e tempo de seguimento de 08 semanas observou-se além do crescimento de tecido ósseo, ausência de processo inflamatório e uma

melhor organização do tecido ósseo neoformado ao redor do tubo de DN (Figura 29C e 29D).

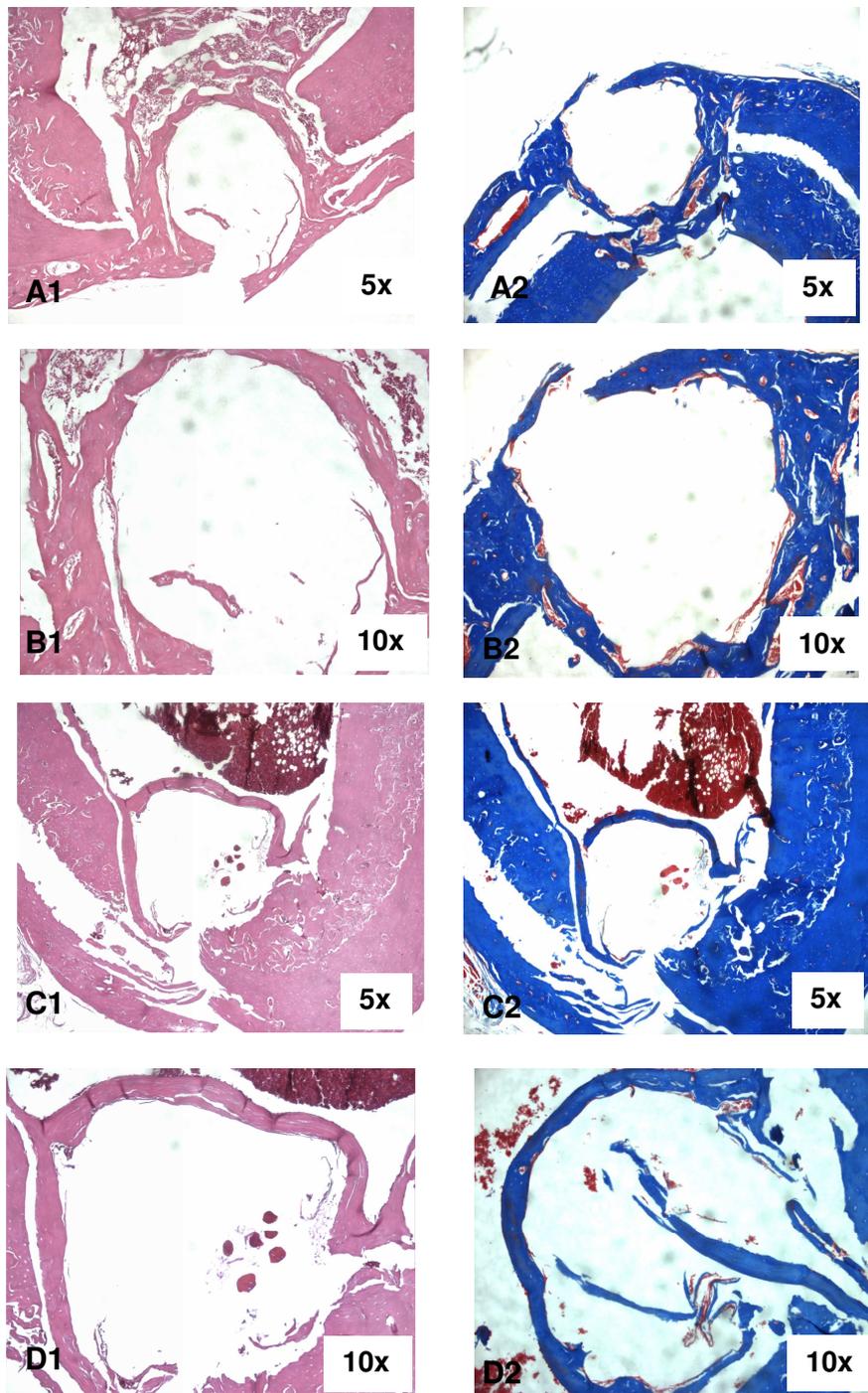


Figura 29: Imagens dos grupos com tubos de DN implantados. (A e B) DN com 04 semanas. (C e D) DN com tempo de seguimento de 08 semanas. De A1 até D1 coloração HE. De A2 até D2 coloração TM.

No grupo com tubo de DM implantado e tempo de seguimento de 04 semanas notou-se a presença de tecido ósseo neoformado, ausência de tecido fibroso e processo inflamatório. Neste grupo observou-se um crescimento desorganizado de tecido ósseo ao redor do tubo, não circundando de forma nítida o local de interface. Este crescimento se apresentou de forma irregular quando comparado ao grupo com tubo de DN e com o mesmo período de seguimento (Figura 30A e 30B).

No grupo com tubos de DM implantado e tempo de seguimento de 08 semanas notou-se a formação de tecido neoformado mais organizada ao redor dos tubos delimitando nitidamente a região de interface. Contudo, notou-se que, apesar de mais organizado, este crescimento tecidual se apresentou frágil e irregular quando comparado ao grupo com tubos de DN com o mesmo período de seguimento (Figura 30C e 30D).

O grupo controle, com tubos de AI implantado após 08 semanas apresentou tecido ósseo neoformado, ausência de processo inflamatório. Assim como no grupo de DN com o mesmo período de seguimento, o tecido ósseo neoformado se apresentou bem organizado ao redor dos tubos de AI circundando e delimitando a região de interface implante-osso. Neste grupo notou-se um maior espessamento do tecido ósseo ao redor do implante mantendo este aspecto em todo o grupo controle (Figura 31).

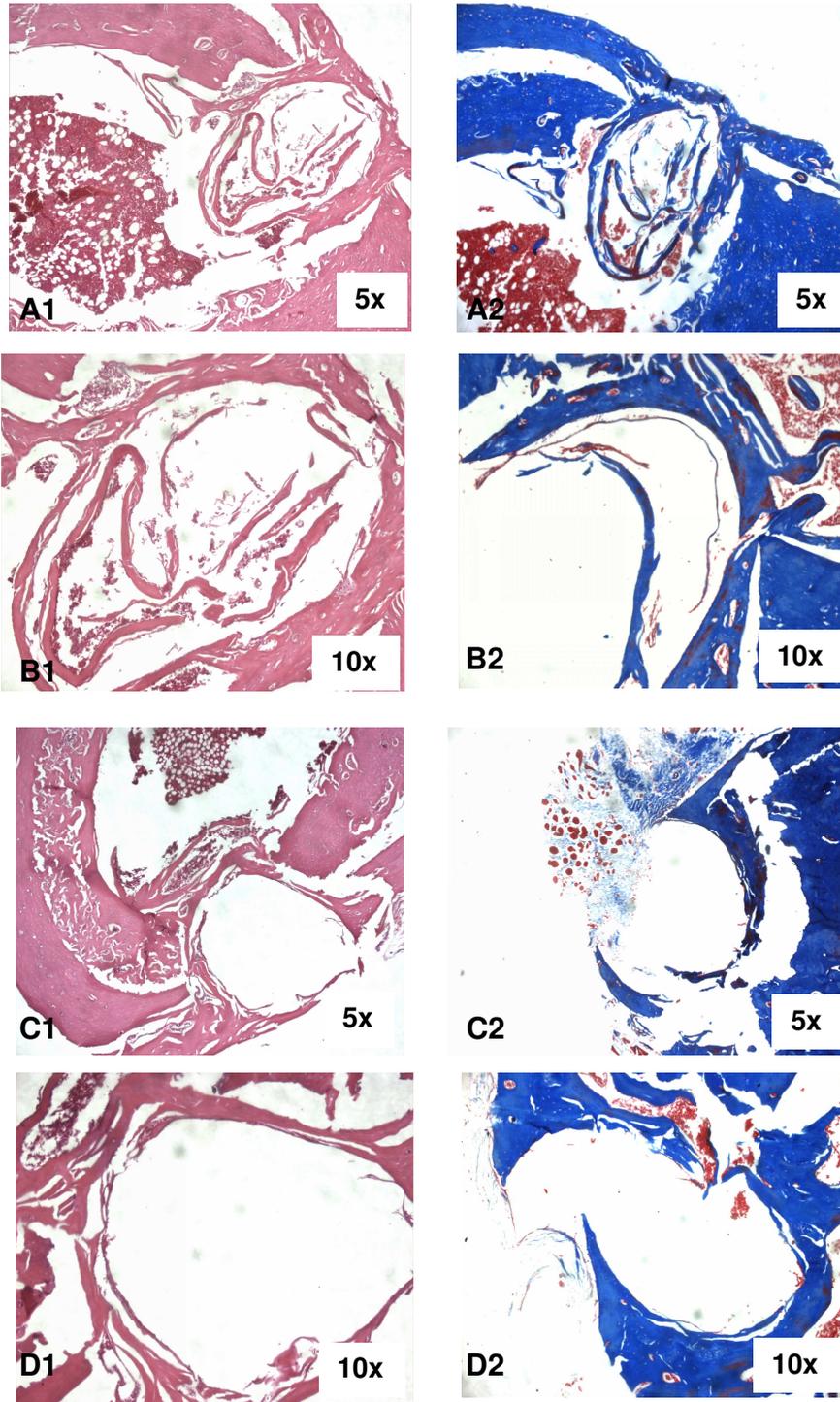


Figura 30: Imagens dos grupos com tubos de DM implantados. (A e B) DM com tempo de seguimento de 04 semanas. (C e D) DM com tempo de seguimento de 08 semanas. De A1 até D1 coloração de HE. De A2 até D2 coloração TM.

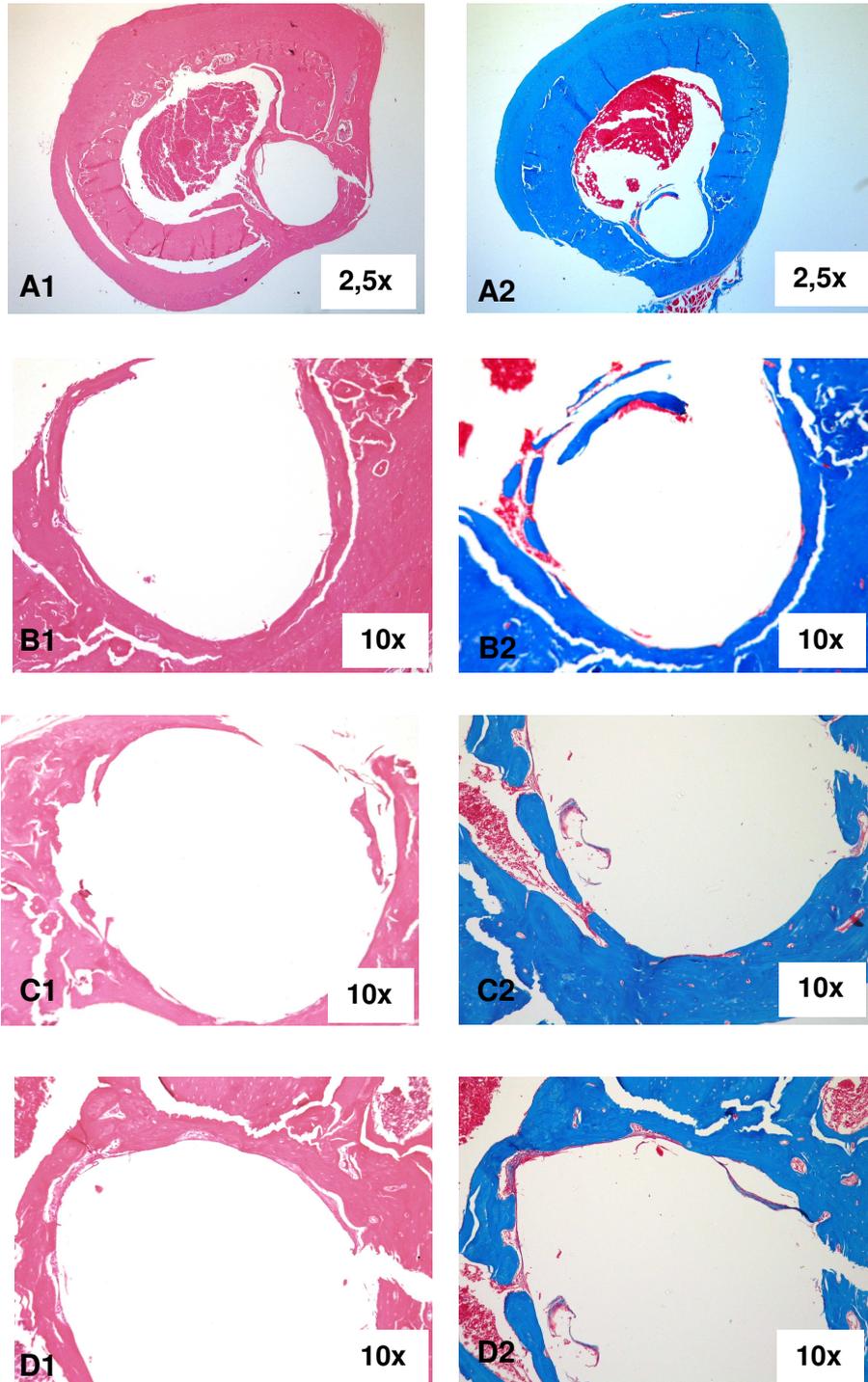


Figura 31: Imagem do grupo com implante de AI e tempo de seguimento de 08 semanas. De A1 até D1 coloração de HE. De A2 até D2 coloração de TM.

3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Através das imagens obtidas por MEV observou-se a adesão dos tecidos que se encontram presentes sobre os tubos de DN, DM e AI durante os períodos de 04 e 08 semanas de seguimento.

Sobre a superfície dos tubos de DN que permaneceram implantados por 04 semanas avaliou-se a adesão do tecido biológico presente em toda a superfície dos tubos. Este aspecto foi observado em todos os tubos de DN que permaneceram nestas condições experimentais. Observou-se um crescimento intenso, exuberante e uniforme sendo este aspecto mantido por toda a extensão dos tubos (Figura 32). O mesmo comportamento foi identificado sobre os tubos de DN que permaneceram em contato com os fluidos e tecidos biológicos por um período de 08 semanas. Neste grupo, além da adesão e crescimento tecidual exuberante, observou-se também a síntese de material de origem fibrosa devido a sua morfologia (Figura 33).

Sobre os tubos de DM implantados por 04 semanas notou-se apenas em alguns pontos da superfície do tubo, preferencialmente nas extremidades, adesão de tecido biológico mantendo desta forma toda a extensão do tubo de DM exposta (Figura 34). O mesmo aspecto foi identificado sobre os tubos de DM implantados por 08 semanas. Após 08 semanas notou-se pouca adesão tecidual, sendo esta adesão irregular e predominantemente nas extremidades do tubo (Figura 35).

Nos tubos de AI implantados por 08 semanas notou-se sobre suas extremidades pouca adesão de tecido. Este aspecto foi observado na maioria dos tubos analisados que permaneceu livre de tecidos e com aspecto muito semelhante ao observado no momento do implante (Figura 36).

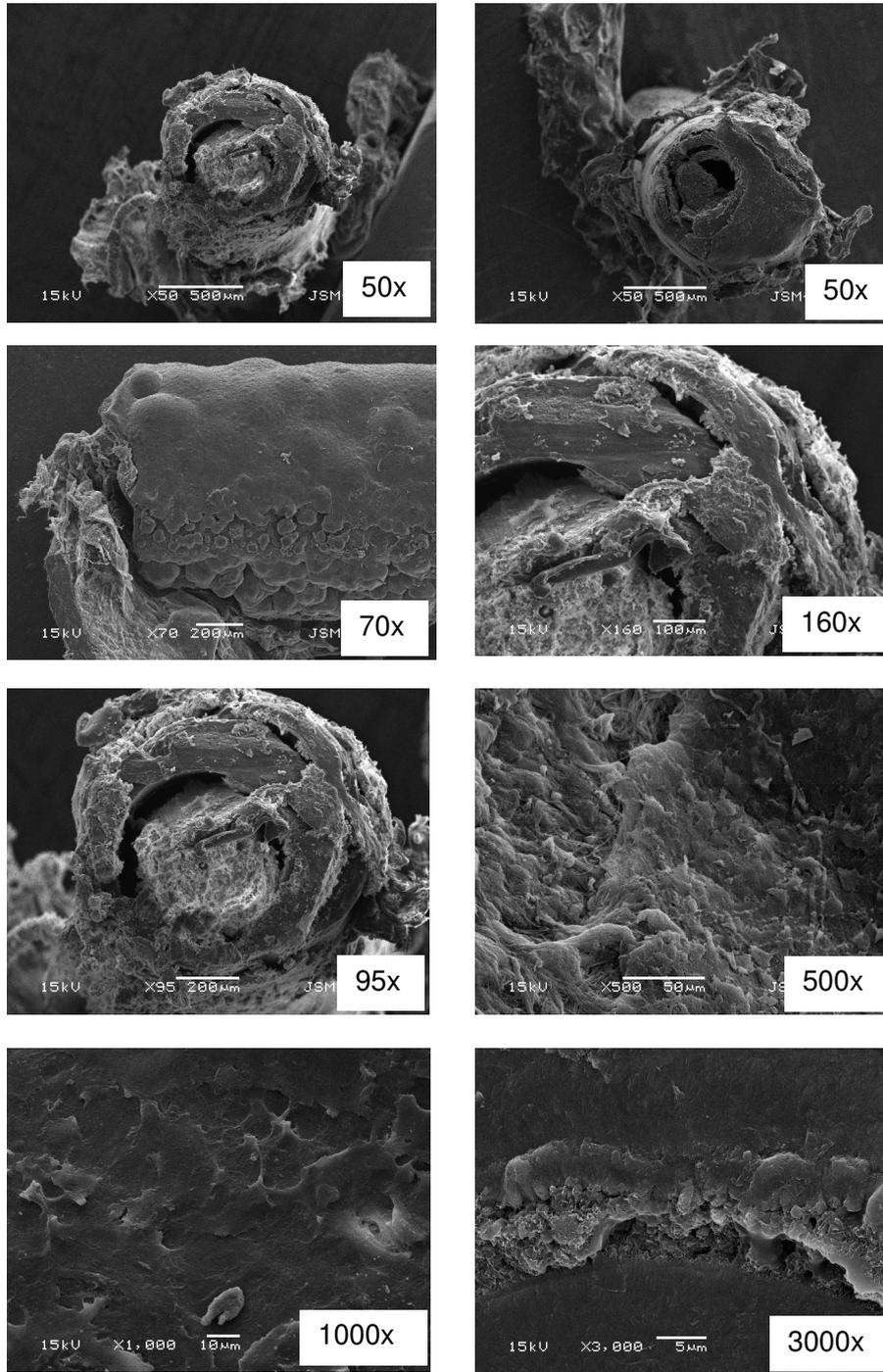


Figura 32: Microscopia Eletrônica de Varredura dos tubos de Diamante Nanoestruturado (DN) após 04 semanas de implante.

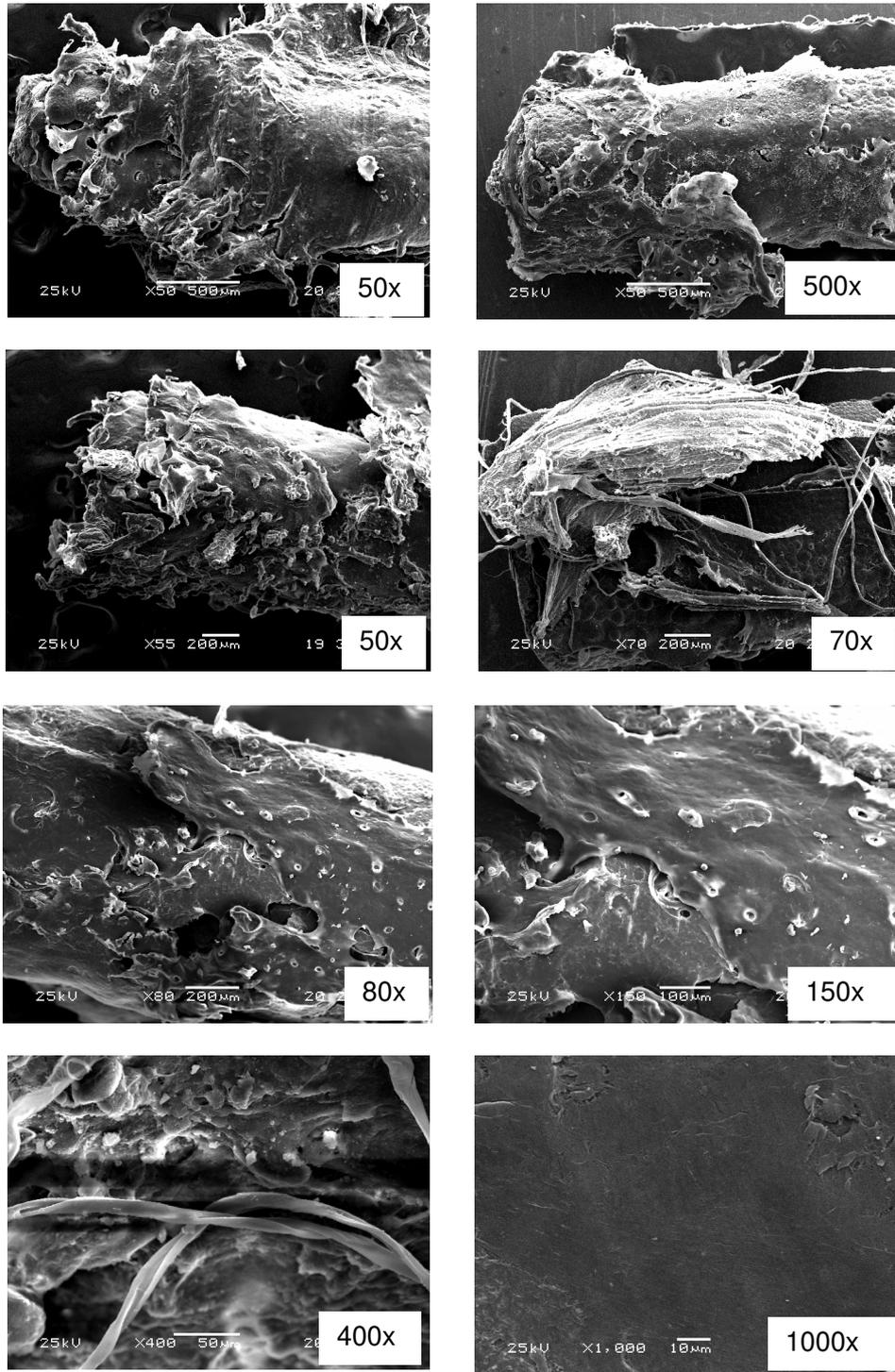


Figura 33: Microscopia Eletrônica de Varredura dos tubos de Diamante Nanoestruturado (DN) após 08 semanas de implante

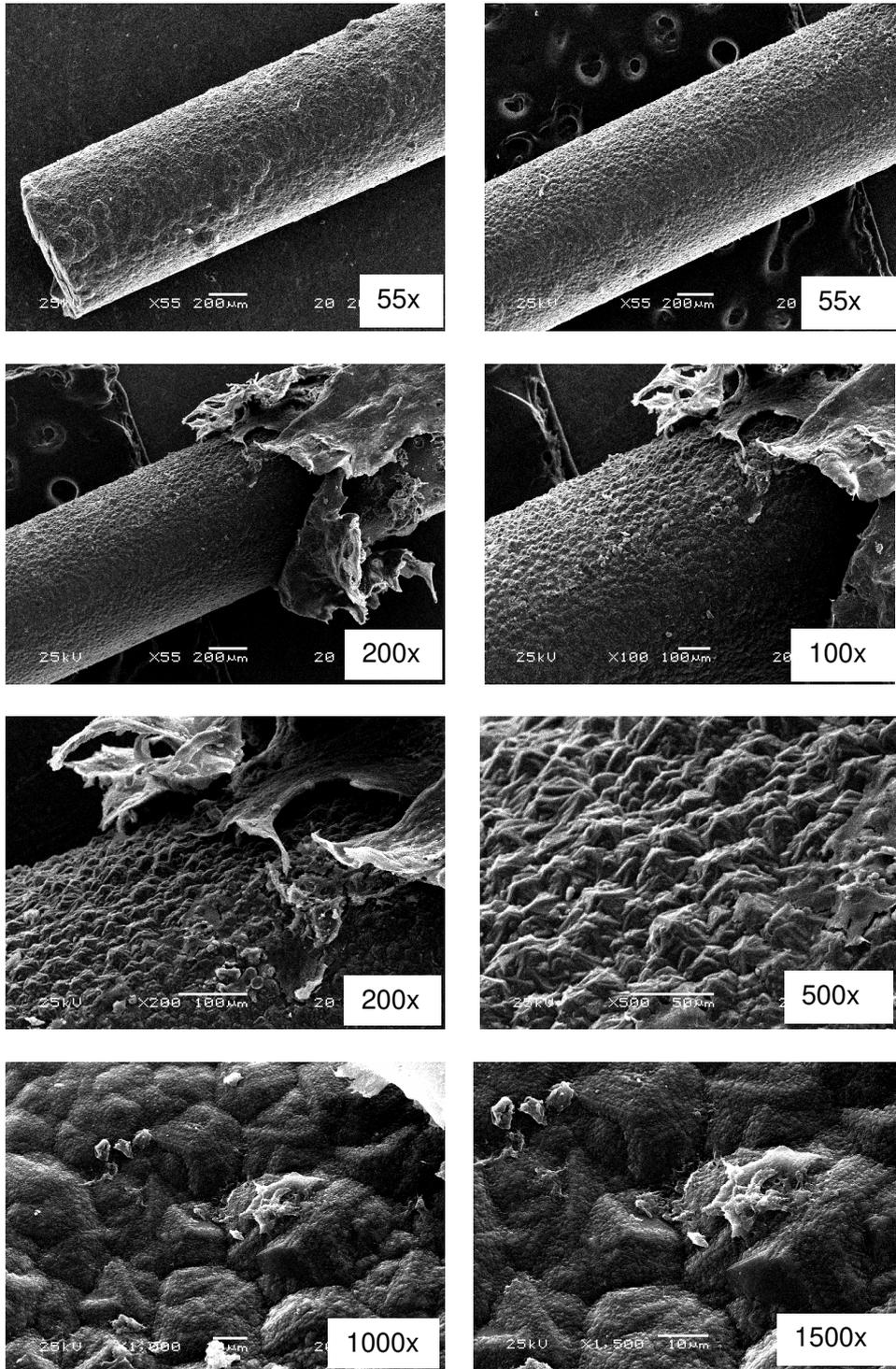


Figura 34: Microscopia Eletrônica de Varredura dos tubos de Diamante Microestruturado (DM) após 04 semanas de implante

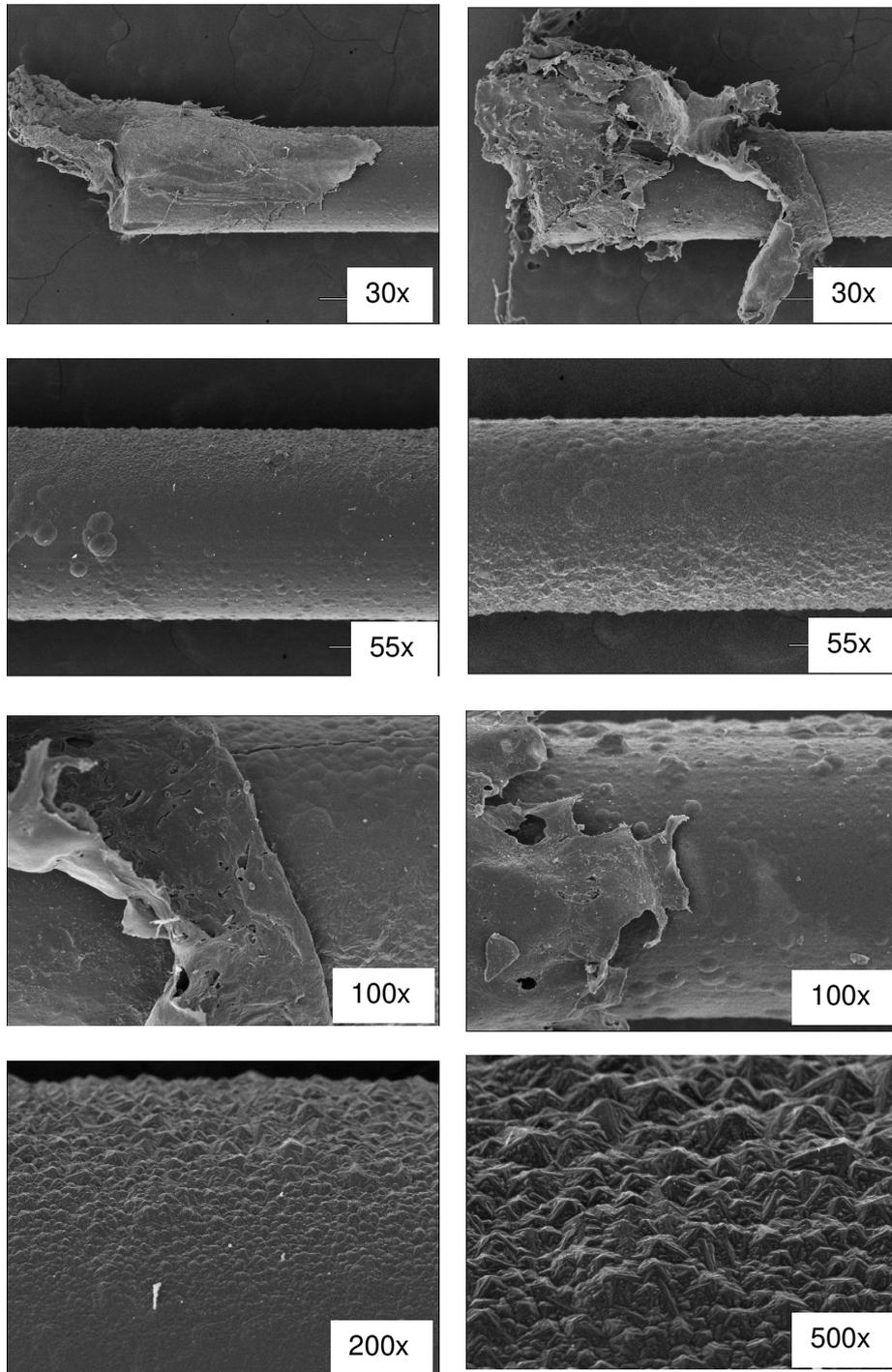


Figura 35: Microscopia Eletrônica de Varredura dos tubos de Diamante Microestruturado (DM) após 08 semanas de implante

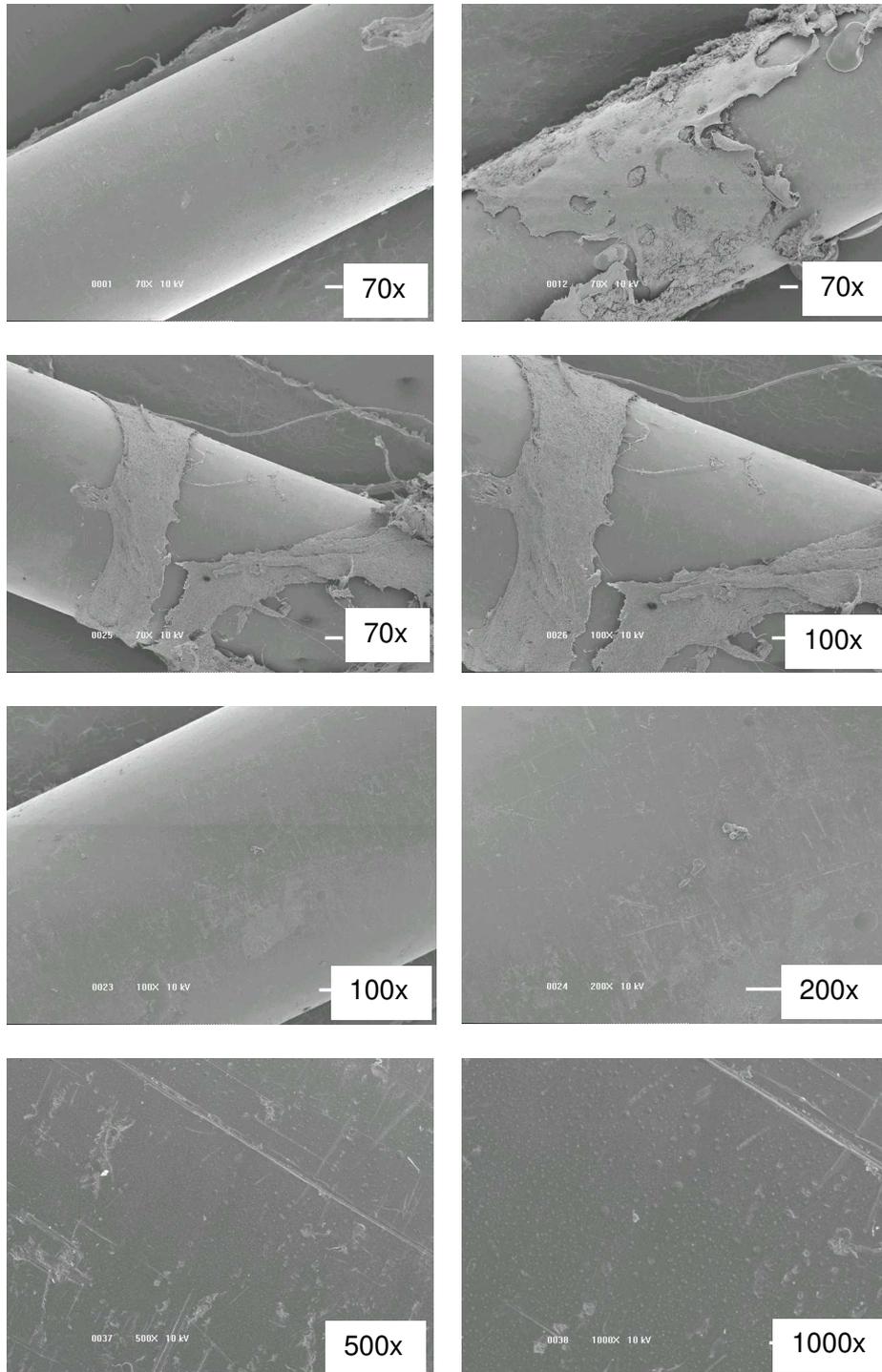


Figura 36: Microscopia Eletrônica de Varredura dos tubos de Aço Inoxidável (AI) após 08 semanas de implante

4. Discussão

No presente estudo avaliamos o desempenho biológico de tubos de Diamante CVD Microestruturado (DM) e tubos de diamante CVD nanoestruturado (DN) após implante no fêmur de ratos da linhagem Wistar. As duas formas do diamante CVD foram sintetizadas através da técnica de CVD onde os tubos foram produzidos com dimensões de 10 mm x 1,2 mm e implantados em uma lesão cirúrgica provocada na face lateral da diáfise do fêmur. Objetivando a caracterização do desempenho de tubos de DM e DN frente ao tecido ósseo observou-se a região de interface após períodos de implante pré-determinados de 04 e 08 semanas através de Análise Macroscópica, de Microscopia Óptica Convencional e de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Através dos resultados obtidos observou-se a adesão superficial de tecido sobre os tubos de DM e DN. A partir das imagens da AM e de MEV notou-se a adesão e crescimento de tecido sobre a superfície das duas formas do diamante CVD, sendo mais intensa nos tubos de DN. Estas apresentaram adesão tecidual mais exuberante, presente em toda a extensão do tubo, além da síntese de material fibroso presente nos tubos com período de seguimento de 08 semanas. O mesmo crescimento não foi observado sobre os tubos de DM que apresentou crescimento de tecido delgado e irregular sobre o tubo.

Constatou-se maior aumento de massa corporal nos animais pertencentes aos grupos com tubos de DN nos dois períodos de seguimento com aumentos de 14,7% e 3,89% respectivamente. Já nos grupos com tubos de DM notou-se uma variação de peso menor nos dois períodos de seguimento com aumentos de 7,84% e 2,44%.

A partir dos resultados obtidos através da MOC notou-se nas duas formas do diamante CVD analisadas crescimento de tecido neoformado ao redor dos tubos, ausência de tecido fibroso e processo inflamatório. Observou-se um crescimento menos intenso de

tecido ao redor dos tubos de DM com 04 semanas de seguimento e crescimento de tecido mais organizado, porém frágil, ao redor dos tubos de DM com 08 semanas de seguimento. Observou-se mais uma vez, através desta análise, um desenvolvimento tecidual menos intenso e irregular quando comparado aos grupos com tubos de DN e com os mesmos períodos de seguimento. Estes achados corroboram com os resultados obtidos através das AM e de MEV onde se evidenciou um maior crescimento e adesão de tecido sobre a superfície dos tubos de DN.

Estes resultados podem estar associados à topografia diferenciada das duas formas do diamante CVD analisadas, pois através de MEV é possível identificar no DM um acabamento superficial piramidal com ápice pontiagudo e, portanto pouco irregular, oferecendo aos tecidos uma superfície mais lisa. Já o DN possui uma topografia irregular com aspecto superficial semelhante a uma couve-flor.

As interações dos tecidos e fluidos biológicos com os biomateriais, assim como a qualidade destes, influenciam a capacidade de proliferação e diferenciação. A primeira fase dessa interação dos tecidos com os materiais de implante é a adesão a sua superfície, a qual é influenciada pelas características superficiais dos materiais, tais como a topografia, energia superficial, rugosidade, entre outras.

No primeiro contato do implante com o organismo, sua superfície é imediatamente recoberta por sangue e proteínas do soro [18]. Diversas destas proteínas, tais como a fibronectina e vitronectina, são responsáveis por prover sítios de adesão para as células [19-20]. Um fator que afeta a adsorção de proteínas sobre a superfície de materiais de implante é a rugosidade do mesmo. LAMPIN et al [21], descreveram a adesão celular em polimetilmetacrilato (PMMA) com diferentes níveis de rugosidade superficial, onde demonstrou-se que a adesão aumentou significativamente com a rugosidade. Nesse estudo, a

adesão celular aumentou com a rugosidade, pois segundo estes autores esta deve estimular as células a secretarem proteínas extracelulares, as quais permitem uma melhor ancoragem ao substrato.

Como as duas formas do Diamante CVD utilizadas neste estudo são quimicamente semelhantes entre si, suas características superficiais podem ter influenciado o desempenho biológico dos tubos de DM e DN frente à região de interface.

5. Conclusões

Podemos concluir após os ensaios “in vitro mediante AM, MOC e MEV que:

- os materiais analisados (DN e DM) permitiram crescimento de tecido ósseo ao seu redor após 04 e 08 semanas de implante;
- as amostras de DN apresentaram maior crescimento de tecido neoformado em ambos períodos de seguimento frente à AM e de MOC;
- houve recobrimento exuberante da superfície dos implantes de DN nos dois períodos de seguimento identificada através da MEV

A partir destas análises podemos concluir que tanto o DM quanto o DN são biocompatíveis, sendo que o último proporcionou maior adesão e recobrimento de tecido neoformado sobre a sua superfície

6. Referências Bibliográficas

- [1] Larektsson T. A multicenter report on osseointegrated oral implants. *Journal Prosthetic Dentist*. 1988; (60): 71-84.
- [2] Mcgeachie J, Smith E, Roberts P, Grounds M. Reaction of skeletal muscle to small implants of titanium or stainless steel: a quantitative histological autoradiographic study. *Biomaterials*. 1992; (13): 562-568.
- [3] Albrektson T, Branemark P, Hansson HA, Lindstron J. Osseointegration titanium implants: requirements for ensuring a long lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthopedic Scand*. 1986; (52): 155-170.
- [4] Brown SA, Simpson JP. Crevice and fretting corrosion of stainless steel plates and screws. *Journal Biomedical Materials Research*. 1981; (15): 867-878.
- [5] Colangelo VJ, Greene ND. Corrosion and fracture of type 316 SMO orthopedics implants. *Journal Biomedical Materials Research*. 1969; (3): 247-265.
- [6] Emneus H, Stenman U. Metal implants in the human body. *Acta Orthopedic Scand*. 1965; (36): 115-126.
- [7] Emneus H. Experimental investigation of corrosion of stainless steels used in bone surgery. *Acta Orthopedic Scand*. 1961; (44B): 1-62.
- [8] Wang ML, Sharkey PF, Tuan RS. Particle bioreactivity and wear-mediated osteolysis. *The Journal of Arthroplasty*. 2004; (19): 1028-1038.
- [9] Scmalzried TP, Callaghan JJ. Wear in total hip and knee replacements. *Journal Bone Joint Surg American*. 1999; (81): 115-125.

- [10] Raut VV, Siney PD, Wroblewski BM: Cemented revision for aseptic acetabular loosening: A review of 387 hips. *Journal Bone Joint Surg American*. 1995 (77): 357-368.
- [11] Baranauskas V, Ceragioli HJ, Peterlevitz AC. Growth of self-supported diamond tubes in the hot filament chemical vapor deposition. *Diamond Related Materials*. 2003; (12): 346- 349.
- [12] Angus JC, Hayman CC. Low-pressure, metastable growth of diamond and “diamondlike” phases. *Science*. 1988; (241): 913-923.
- [13] Kohmura N, Sudoh K, Sato K, Hirakuri KK, Miyake K, Friedbacher G. Diamond growth on the high purity iron substrate using hot-filament CVD method. *Diamond Related Materials*. 2005; (14): 283-287.
- [14] Shimada Y, Mtsukura N, Machi Y. *Journal Applications Physics* 1992; (31): 1958.
- [15] Hupert M, Muck A, Wang R, Stotter J, Cvackova Z, Haymond S, Show Y, Swain GM. Conductive diamond thin-films in electrochemistry. *Diamond Related Materials*. 2003; (12): 1940-1942.
- [16] Hamers RJ, Butler JE, Lasseter T, Nichols BM, Russel JNJ, Tse K, et al. Molecular and biomolecular monolayers on diamond as an interface biology. *Diamond and Related Materials*. 2005; (14): 661-668.
- [17] Tang L, Tsai C, Gerberich WW, Kruckeberg L, Kania DR, Biocompatibility of chemical-vapor deposited diamond. *Biomaterials*. 1995; (16): 483-488.
- [18] Puleo DA, Huh WW. Acute toxicity of metal ions in cultures of osteogenic cells derived from bone marrow stromal cells. *J Appl Biomaterials*. 1995; (6): 109-116.

[19] Jacobs JJ, Gilbert JL, Urban RM. Corrosion of metal orthopaedic implants. *Journal Bone Joint Surg American*. 1998; (80): 168-282.

[20] Lhotka C, Szekeres T, Steffan I, Zhuber K, Zweymuller K. Four-year study of cobalt and chromium blood levels in patients managed with two different metal-on-metal total replacements. *Journal Orthop Research*. 2003; (21): 189-195.

[21] Lampin M, Warocquier-Clérout R, Legris C, Degrange M, Sigot-Luizard MF. Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion and cell migration. *Journal Biomedical Materials Research*. 1997; (36): 99-108.

Capítulo IV

Considerações Finais

Demonstramos através dos ensaios adotados neste estudo as interações do Diamante CVD Nanoestruturado (DN) e Diamante CVD Microestruturado (DM) em contato com células fibroblásticas (ensaio “*in vitro*”) e implantados em fêmur de ratos da linhagem Wistar (ensaio “*in vivo*”).

A partir dos resultados obtidos caracterizamos o comportamento das duas diferentes formas do diamante como biocompatíveis, pois ambos apresentaram ótima interação frente à cultura celular e tecidos associados aos implantes. Foi possível através das análises verificar que há diferença significativa no desempenho do DN, pois permitiu um desenvolvimento celular mais intenso com síntese de matriz extracelular, crescimento de camadas celulares exuberantes, maior adesão e crescimento de tecido neoformado frente às análises “*in vitro*” e “*in vivo*”.

Estes resultados sugerem que ambos os materiais analisados são biologicamente compatíveis e apresentam comportamento adequado para aplicações como materiais de implante, sendo indicado o DN para aplicações que se necessite uma resposta celular mais intensa.

Devido aos resultados obtidos sugerimos para trabalhos futuros o desenvolvimento de análises mais específicas para verificar o comportamento do diamante frente à cultura de células de osteoblastos já que estas se encontram presentes abundantemente no local de implante. Quanto a análise “*in vivo*” sugerimos da mesma forma análises específicas para

se quantificar o crescimento de tecido ósseo na interface diamante-osso. Estes dados podem ser obtidos através da utilização de marcadores fluorocromáticos como a tetraciclina (Tetrex) ou oxi-tetraciclina (Terramicina). Sabe-se que a tetraciclina quando introduzida no organismo via oral ou endovenosa, se deposita no tecido ósseo formando com este tecido um complexo fluorescente amarelo-ouro. Desta forma será possível quantificar o crescimento ósseo na região de interface, pois a deposição da tetraciclina ocorre preferencialmente em tecido ósseo em desenvolvimento podendo ser analisadas posteriormente em microscópio a partir da obtenção de espécimes ósseos não descalcificados já que a fluorescência é removida durante o processo de descalcificação.

Gostaria que estas considerações finais estimulassem outros pesquisadores a se dedicar ao desenvolvimento de estudos voltados a esta área, mas não poderia deixar de agradecer aqui aos pesquisadores, professores e estudantes que me auxiliaram a chegar até estes resultados.

Apêndices

Apêndice A: Certificado da comissão de ética na experimentação animal

 UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas Instituto de Biologia	 CEEA-IB-UNICAMP
--	--	--

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP**

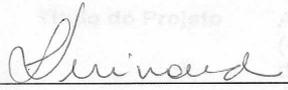
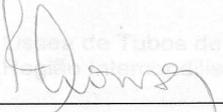
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **848-1**, sobre "**AVALIAÇÃO DA INTERFACE ÓSSEA DE TUBOS DE DIAMANTE (CVD) IMPLANTADOS NA REGIÃO INTERCONDILIANA DE RATOS LINHAGEM WISTAR**" sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Vitor Baranauskas / Willian Dias Belangero** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 08 de junho de 2005.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **848-1**, entitled "**EVALUATION OF THE INTERFACE DIAMANTE PIPES (CVD) IMPLANTED IN RATS**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on June 8, 2005.

Campinas, 08 de junho de 2005.

 _____ Prof. Dra. Liana Verinaud Presidente - CEEA/IB/UNICAMP	 _____ Fátima Alonso Secretária - CEEA/IB/UNICAMP
---	--

<small>UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE BIOLOGIA CIDADE UNIVERSITÁRIA ZEFERINO VAZ CEP -13.081-970 - CAMPINAS - SP - BRASIL</small>	<small>TELEFONE 55 19 3788-6359 FAX 55 19 32893124</small>
---	--

Lista de Abreviaturas

AI	Aço Inoxidável
AM	Análise Macroscópica
AT	Azul de Toluidina
CEEA	Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
CNT	Controle Negativo de Toxicidade
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CPT	Controle Positivo de Toxicidade
Cr-Co	Cromo-Cobalto
Cr-Co-Mo	Cromo-Cobalto-Molibdênio
CVD	Chemical Vapor Deposition
DM	Diamante Microestruturado
DN	Diamante Nanoestruturado
DSIF	Departamento de Semicondutores, Instrumentos e Fotônica
ECD	Ensaio de Citotoxicidade Direta
ECI	Ensaio de Citotoxicidade Indireta
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
FEEC	Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação
HE	Hematoxilina Eosina
IB	Instituto de Biologia
LABIMO	Laboratório de Biomecânica Ortopédica
LANADIA	Laboratório de Nanoengenharia e Diamante
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Sincrotron
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MOC	Microscopia Óptica Convencional
NMCE	Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental
SFB	Soro Fetal Bovino
TM	Tricrômico de Masson
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
XP	Xylidine Ponceau