

ADIÇÃO DE COMPLEXO VITAMÍNICO EM DUAS BIOCERÂMICAS E SEU EFEITO NA REGENERAÇÃO ÓSSEA.

R. S. Beolchi, T. S. Goia, L. A. Genova,
Av. Lineu Prestes 2242 - Cidade Universitária - CEP: 05508-000 - São Paulo - SP
BRASIL (+55) (11) 3133-9235 – CCTM/IPEN
e-mail: rafael.beolchi@usp.br

RESUMO: *Com o objetivo de promover a regeneração óssea, duas cerâmicas sintéticas têm sido largamente utilizadas: a hidroxiapatita (Hap) e o beta-fosfato tricálcico (β -TCP). Em muitas situações é desejável que a velocidade de absorção destes materiais pelo organismo seja compatível com a velocidade de crescimento ósseo, e para tanto, uma alternativa é o emprego da mistura destas duas fases. A absorção e o crescimento ósseo são processos bioquímicos e fisiológicos complexos, afetados pela resposta inflamatória da região cirúrgica. Neste trabalho, duas cerâmicas foram implantadas em fêmures de ratos: β -TCP ou a mistura bifásica 60:40% β -TCP:Hap. O crescimento ósseo foi avaliado com marcadores ósseos fluorescentes. Além disso, avaliou-se o efeito da presença de um complexo vitamínico, moderador do processo inflamatório. Conclui-se que o β -TCP puro foi melhor absorvido quando comparado a mistura β -TCP-Hap, e que a presença do composto vitamínico mediu de forma favorável a neoformação óssea.*

Palavras-chave: biocerâmicas, implante in-vivo, osteocondução.

INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um dos mais dinâmicos tecidos do corpo humano, sendo altamente vascularizado e apresentando enorme capacidade de auto-reparação, devido à sua característica de "remodelação óssea. Além disso, é um dos poucos tecidos que apresentam a capacidade de regeneração (substituição do tecido lesado por um tecido idêntico ao anterior, com as mesmas funções fisiológicas e metabólicas)⁽¹⁾.

Casos como extirpação de tumores, enfermidades causadoras de danos irreversíveis, defeitos congênitos com perdas funcionais e atrofia com perda gradual de tecidos são exemplos da necessidade do uso de biomateriais. Nesse universo, duas cerâmicas sintéticas, à base de fosfato de cálcio, têm sido largamente utilizadas na substituição, reparo ou reconstituição de tecidos ósseos: a hidroxiapatita e o beta fosfato tricálcico.

Tanto a hidroxiapatita (Hap) como o beta fosfato tricálcico (β -TCP) são materiais osteocondutores, ou seja, permitem o crescimento ósseo por meio de aposição do osso adjacente, portanto na presença obrigatória de células mesenquimais primitivas, que se diferenciam em células osteogênicas⁽²⁾. Podem ser encontradas comercialmente em diversas texturas e tamanhos de partículas, por exemplo, em blocos ou grânulos, podendo ser porosos ou densos⁽³⁾.

Entretanto, a hidroxiapatita é resistente à reabsorção, que ocorre numa taxa de 1 a 2% por ano⁽⁴⁾. Em casos em que a regeneração óssea é necessária, essa característica pode ser indesejável, já que grânulos não absorvidos desse material podem ficar envoltos pela matriz óssea neoformada.

A reabsorção do β -TCP é bem mais rápida quando comparada à reabsorção da hidroxiapatita. Estudos investigativos⁽⁵⁾ demonstraram o uso potencial de cerâmicas de β -TCP como substratos para técnicas de regeneração tecidual e como veículo de drogas. A reabsorção desse material se dá via dissolução após um período de 6 a 18 meses. Infelizmente, a substituição do β -TCP por osso não ocorre de maneira uniforme, ou seja, pode haver menor volume ósseo do que o volume de β -TCP reabsorvido. Devido a isso, e conforme discutido anteriormente, o uso desse material tem sido associado a outros materiais menos reabsorvíveis, como a Hap⁽⁶⁾.

Outra questão importante, quando se trata de neoformação óssea, refere-se ao metabolismo ósseo reparador. Sempre que houver agressão ao tecido, ocorrerá o fenômeno da inflamação. A resposta inflamatória desencadeia uma série complexa de eventos que, tanto quanto possível, cicatriza e/ou regenera o tecido lesado. O reparo começa durante a fase ativa da inflamação, e atinge o seu término após a influência lesiva ter sido neutralizada⁽⁷⁾.

Entretanto, há casos em que o processo inflamatório torna-se exacerbado, levando a uma produção excessiva de radicais livres ou espécies reativas de

oxigênio decorrente do brusco aumento do metabolismo celular, o que aumenta o estresse oxidativo dos tecidos circunvizinhos. O ataque dos radicais livres aos lipídios tem uma natureza propagante, levando a uma degeneração da membrana celular, chamada de peroxidação lipídica⁽⁸⁾.

Um material que mediasse a resposta inflamatória, melhorando tanto a cicatrização quanto a quantidade de neoformação óssea no local da cirurgia, seria um ótimo aliado nos casos em que a utilização de enxerto autógeno é dificultada ou contra-indicada.

Salles⁽⁹⁾ desenvolveu um composto vitamínico cuja função primordial é a mediação da inflamação, controlando o estresse oxidativo e incentivando a proteção de membrana das células da região submetida à cirurgia. Um sítio cirúrgico com inflamação mediada melhora as condições para a cicatrização óssea.

Os objetivos deste trabalho foram 1) Avaliar a cicatrização óssea de sítios cirúrgicos em fêmures de ratos Wistar submetidos à implantação de β -TCP puro e da mistura de Hap e β -TCP, na proporção de 60:40 em massa; 2) Acrescentar aos materiais de implante dos grupos experimentais, o composto vitamínico desenvolvido por Salles⁽⁹⁾, na proporção de 35% em relação ao peso do material cerâmico, comparando a resposta óssea dos grupos experimentais e do grupo controle; e 3) Verificar possíveis diferenças quanto à velocidade, taxa e qualidade de neoformação óssea entre os grupos experimentais e controle por meio de microscopia de luz.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para este estudo foram utilizadas duas composições diferentes de fosfatos de cálcio sintéticos: beta fosfato tricálcico (β -TCP) puro, e uma mistura bifásica (MB) de hidroxiapatita (Hap) e de β -TCP, na proporção de 60:40 em massa, ambos fabricados pela Degradable Solutions AG (Schlieren, Suíça). Essas composições foram fornecidas na forma de grânulos de tamanho médio de 315 a 500 μ m.

Para a produção dos corpos de prova que foram implantados nos fêmures dos ratos, além das duas composições cerâmicas, (β -TCP e MB), foi utilizado

também colágeno bovino (cuja função é a de aglutinante ou ligante), e o complexo vitamínico.

As proporções em que esses componentes foram misturados são apresentadas na Tabela 1, que indica também a especificação dos 5 grupos experimentais nos quais os animais foram divididos. Observa-se que os animais do Grupo I, de controle, não tiveram nenhum material implantado.

Tabela 1. Composição dos materiais de implante e respectivos grupos experimentais.

	Especificação	Mat. Cerâmico	Composto	Colágeno
Grupo I	Controle	--	--	--
Grupo II	β -TCP+Composto	2.0g β -TCP (55%)	0,8g (22%)	0,8g (22%)
Grupo III	MB+Composto	2.0g MB (55%)	0,8g (22%)	0,8g (22%)
Grupo IV	β -TCP	2.0g β -TCP (70%)	--	0,8g (30%)
Grupo V	MB	2.0g MB (70%)	--	0,8g (30%)

Os componentes foram misturados em almofariz, com a adição de algumas gotas de água, de modo a se obter uma mistura na forma de pasta com consistência e plasticidade adequadas para a conformação das peças de implante. A pasta resultante foi então aplicada em um molde metálico bipartido, de modo a se conformar corpos de prova cilíndricos com 2 mm de diâmetro e 30 mm de altura. Os corpos cilíndricos conformados, ainda dentro do molde, foram mantidos por 10 minutos entre 2 e 6° C para que o colágeno gelificasse e fornecesse a resistência a verde adequada às etapas seguintes. Os corpos foram então seccionados com estilete, em diversos cilindros com altura de 5 mm, removidos do molde e acondicionados em frascos separados individuais. Todo material a implantar utilizado foi esterilizado por radiação Gama, com intensidade de 25 KGy em temperatura ambiente.

Cirurgia

A experimentação animal seguiu os preceitos da norma internacional para utilização de animais em experimentos. Foram utilizadas trinta ratas adultas, com aproximadamente 3 meses de idade, brancas, da raça Wistar e com peso aproximado de 250 a 300 g. Os animais foram mantidos no biotério do Instituto de

Pesquisas Energéticas e Nucleares e foram divididos aleatoriamente nos cinco grupos, de acordo com o apresentado na Tabela 1.

Os fármacos utilizados para a obtenção da anestesia dos animais foram: Rompun i.m. (cloridrato de (2–2,6-xilidino) - 5,6 - dihidro - 4H - 1,3 – tiazina), sedativo analgésico e relaxante muscular em concentração de 5mg/kg, e Ketalar i.m. (cloridrato de ketamina), anestésico geral em concentração de 35mg/kg. De forma complementar, utilizou-se também a lidocaína (anestésico local) a 3% com epinefrina

Os animais foram isolados em gaiolas distintas, de acordo com o grupo experimental a quem pertenciam e receberam sem restrições, água e ração seca adequada (NUVILAB) sob temperatura ambiente constante de 21^o C.

O sítio cirúrgico escolhido foi a porção proximal dos fêmures esquerdo e direito de cada animal. Após a tricotomia e anti-sepsia, foi realizada exérese da pele expondo as fáscias musculares. A exposição do fêmur foi obtida com o rebatimento dos músculos vasto lateral e bíceps femoral até o periósteo, que foi deslocado com objetivo de proporcionar o acesso e visão à área operatória.

Defeitos ósseos com 2mm de diâmetro por aproximadamente 5 mm de altura foram criados com o auxílio de brocas acopladas a um contra-ângulo com redução de 16:1, movido por um motor elétrico com velocidade de 1.000 rpm e 30 N/cm² de torque, sob constante irrigação (solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9%) (Figura 1-a). Com auxílio de espátulas, o implante foi colocado em cada um dos fêmures do rato. (Figura 1-b) Os animais do grupo controle (I) tiveram os fêmures perfurados, mas não receberam qualquer material de implante. Cada fêmur dos ratos dos grupos experimentais II a V foi capaz de acomodar apenas um implante.

Após a inserção dos materiais, foi realizada a sutura muscular e a sutura da pele, utilizando fios de sutura mononylon agulhado (3/8 CR - 3,0cm).

Assim, após o período de cicatrização de quatro semanas, os animais foram sacrificados, e após a dissecação dos tecidos moles, os fêmures foram removidos com bisturi e, depois de agrupados, foram fixados por imersão em solução neutra de formalina a 4,0%, durante um período de 30 (trinta) dias.

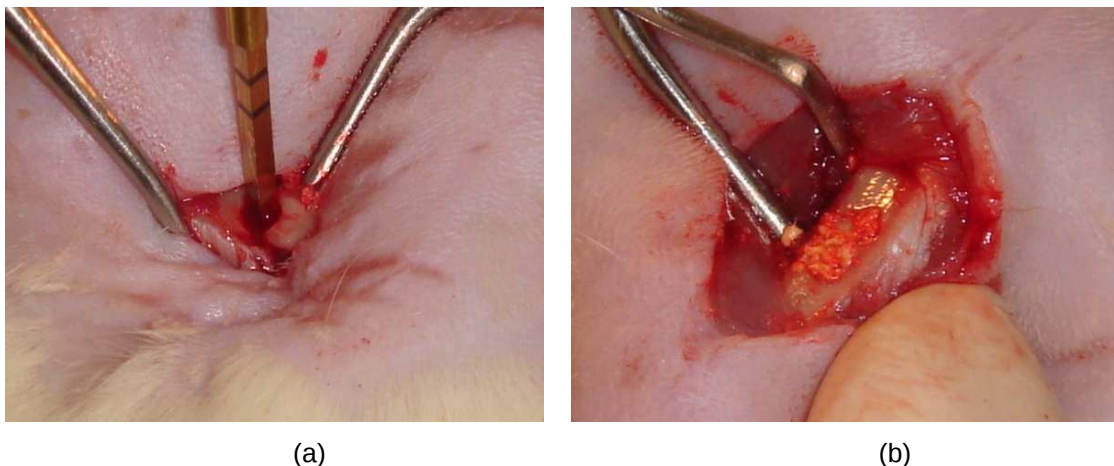


Figura 1: Perfuração do fêmur (a) e inserção do implante cerâmico (b).

Preparo das amostras

Após o período de imersão em formalina, as amostras foram lavadas em água corrente durante 12 horas, e desidratadas por meio de uma série de misturas de Etanol absoluto e água destilada. Ao fim desse processo, as amostras ficaram imersas em etanol absoluto por 48 horas.

De acordo com o protocolo de Donath⁽¹⁰⁾, as amostras foram então agrupadas e imersas em recipientes próprios para a inclusão, contendo resina plástica Technovit 7200 VCL (Kultzer & Co, Wehrhein, Alemanha) com a inclusão de 1% de BPO (peróxido de benzoíla) dissolvido em álcool absoluto (Etanol) em diversas concentrações seriadas. A sequência e o tempo de imersão nas diferentes soluções permitem a substituição periódica do álcool etílico pela resina glicolmetacrilato. Ao final da sequência de embebição, as amostras foram colocadas em formas de inclusão, preenchidas com a resina Technovit® 7200 VLC a 100%. A polimerização da resina foi obtida com um fotopolimerizador calibrado com tempos de polimerização adequados.

O conjunto osso-implante embutido em resina foi fixado com o auxílio de um porta-amostra em uma máquina de corte (Isomet 2000) de modo que o disco diamantado com espessura de 0,2mm ficasse posicionado transversalmente ao longo eixo do osso. Foi utilizada uma carga de 100g a uma velocidade de corte de 2000 RPM. Foram obtidas não mais do que dois cortes por fêmur. Cada corte teve aproximadamente 600 µm de espessura, e foram colados individualmente

em lâminas de acrílico utilizando uma gota de cianoacrilato (SuperBonder®, Loctite, Brasil).

Posteriormente, o polimento foi obtido com a utilização de uma sequência de lixas de granulação 1200, 2.400 e 4.000 mesh, sob pressão constante em uma máquina de polimento, modelo Panambra DP9U. O objetivo era o de atingir cortes que fornecessem lâminas com superfícies polidas e de espessura de 20-30 μm , de forma a poderem ser examinadas em microscopia óptica.

Lâminas representativas de cada grupo foram coradas pelo método de coloração de Tricrômico de Masson⁽¹¹⁾ (TM) e foram então analisadas por microscopia óptica de luz transmitida. O Tricrômico de Masson cora em verde a queratina e as fibras musculares (não presentes neste estudo), em azul o colágeno e tecido ósseo, em vermelho brilhante ou rosa o citoplasma, e em castanho escuro a preto os núcleos das células. Essa técnica ajuda a diferenciar o tecido ósseo antigo (observado em cor azul escuro) do tecido ósseo neoformado (observado em cor azul claro), assim como o tecido ósseo não mineralizado (observado em cor vermelha).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No grupo controle, em que não houve colocação de implante cerâmico, é possível perceber pela análise microscópica corada pelo método de Tricrômico de Masson que ocorreu neoformação óssea na região cirúrgica, porém incompleta (Figura 2-a, seta escura). Esse fato fica patente quando se observa a rarefação e relativa desorganização do tecido ósseo neoformado sobre a região da ferida cirúrgica, quando comparado ao restante do osso (Figura 2-b, seta escura). É possível perceber na região de cortical óssea remodelações do osso que está se adaptando às novas forças depois de agredido (seta branca).

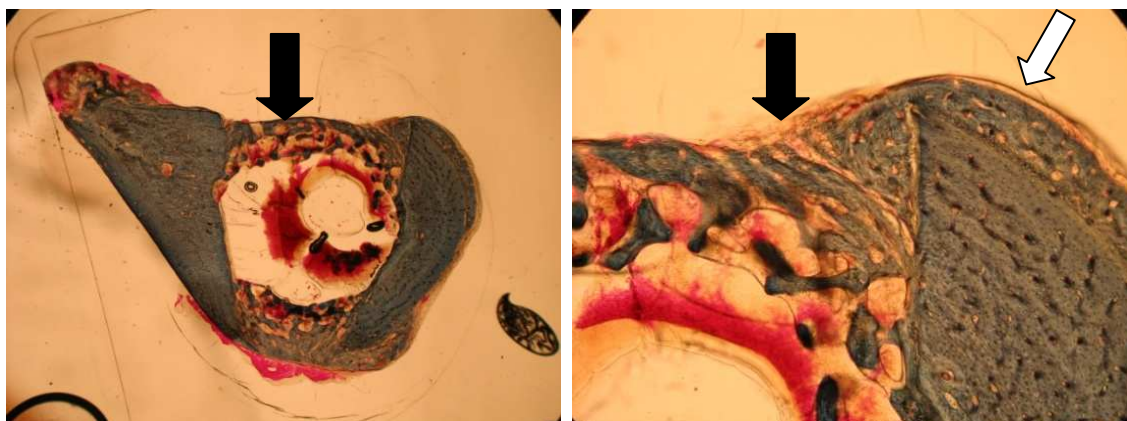


Figura 2: Grupo I (controle), coloração TM, aumento de 25X (a) e aumento de 100X (b)

No grupo II, que recebeu implantes de β -TCP adicionado do composto vitamínico, observa-se um crescimento ósseo mais organizado. (Figura 3-a). Em maior aumento, é possível visualizar o tecido ósseo crescendo justaposto aos materiais cerâmicos, evidência de que ocorreu osteointegração e osteocondução (Figura 3-b, setas brancas).

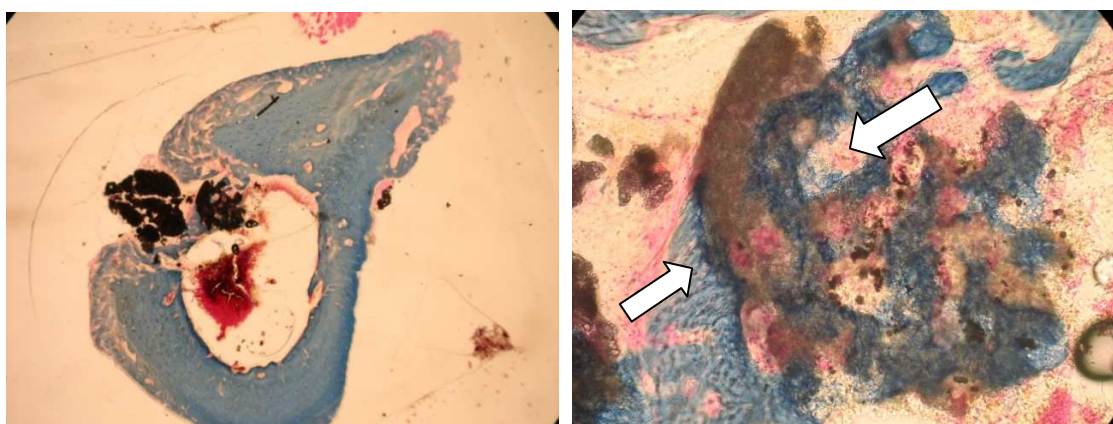


Figura 3: Grupo II (β -TCP+composto), coloração TM, aumento de 25X (a) e aumento de 200X (b)

É possível perceber também regiões de absorção do material cerâmico e sua substituição por tecido ósseo neoformado (Figura 3-b).

Comparando o grupo II com o grupo III, que recebeu a MB acrescidas do composto vitamínico, é possível perceber que os grânulos apresentam menos sinais de absorção. Isso provavelmente se deve ao fato da Hap ser mais insolúvel e, portanto, mais resistente à absorção pelo organismo (Figura 4-a). Em maior aumento, e de forma similar ao grupo anterior, é possível perceber os fenômenos

de osteointegração e osteocondução do osso neoformado em relação ao material implantado, sobretudo devido ao desvio que o osso cortical efetuou, guiando-se pela presença do material cerâmico (Figura 4-b). Além disso, de forma semelhante ao grupo anterior, é possível visualizar neoformação óssea sobre áreas de absorção de material, que provavelmente ocorreram nas regiões do material cuja fase de β -TCP, mais solúvel e absorvível, estava presente (seta branca).

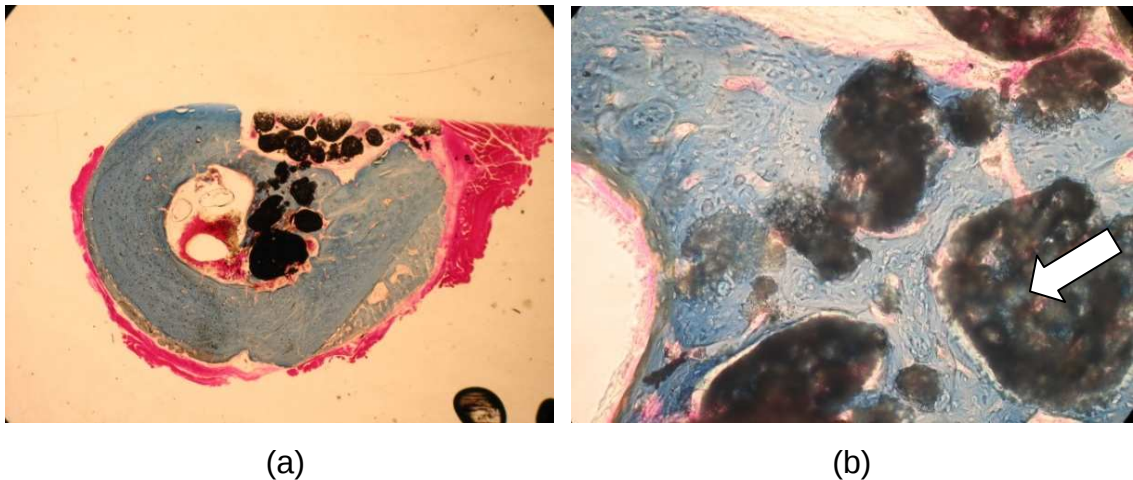
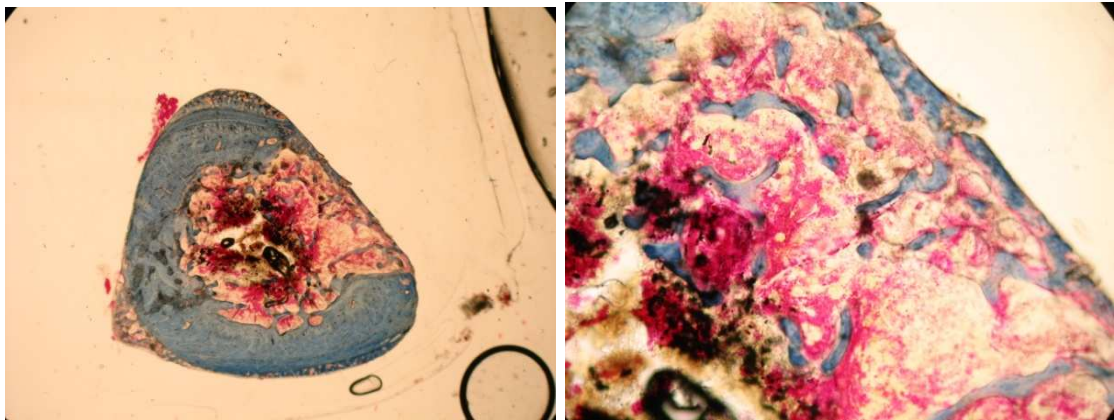


Figura 4: Grupo III (MB+composto), coloração TM, aumento de 25X (a) e aumento de 200X (b)

Nas micrografias a seguir (Figuras 5-a e 5-b) praticamente não é mais possível divisar o material cerâmico. Nesse grupo, os animais receberam implantes de β -TCP, sem adição do composto vitamínico. Percebe-se uma maior rarefação óssea, talvez devido a uma reação inflamatória exacerbada. Se isso for verdade, o aumento do pH devido ao aumento da inflamação pode ter sido o responsável pela menor quantidade de material cerâmico, já que haveria condições favoráveis para sua absorção⁽¹²⁾.

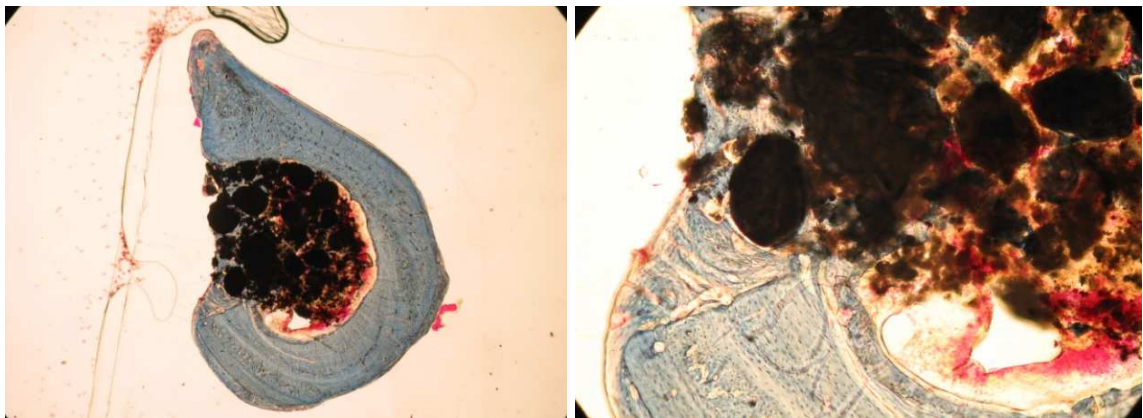
Finalmente, no grupo V, que recebeu implantes da mistura bifásica de Hap e β -TCP também sem adição do composto vitamínico, pode-se perceber de forma mais clara a integridade do material cerâmico e a relativa escassez de osso neoformado (Figura 6 a e b).



(a)

(b)

Figura 5: Grupo IV (β -TCP), coloração TM, aumento de 25X (a) e aumento de 200X (b)



(a)

(b)

Figura 6: Grupo V (MB), coloração TM, aumento de 25X (a) e aumento de 100X (b)

A baixíssima solubilidade da Hap dificultou a absorção do material pelo organismo e conseqüentemente sua substituição por novo tecido ósseo. Entretanto, de forma similar aos demais grupos, novamente é possível perceber a osteointegração e osteocondução sobre os materiais implantares.

CONCLUSÕES

O β -TCP foi mais absorvido pelo organismo do que a mistura bifásica de Hap e β -TCP, confirmando que a porção de hidroxiapatita é reabsorvida mais lentamente que o β -TCP. Entretanto, a biocompatibilidade dos dois materiais foi confirmada devido à osteocondução e osteointegração, demonstrada pelas micrografias. Além disso, no caso do β -TCP, aparentemente houve uma maior

substituição de material cerâmico por osso neoformado do que nos grupos que receberam a mistura bifásica de Hap e β -TCP. Quando comparamos os grupos que receberam o mesmo material cerâmico, variando a presença do composto vitamínico, é possível perceber indícios de que a presença deste último favoreceu uma melhor e maior regeneração de tecido ósseo. Essa diferença é melhor observada nos grupos que receberam apenas β -TCP (Grupos II e IV).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) SCHNEIDER, V.; OGANOV, V.; LeCLANC, A.; KAKMONOV, A.; TAGGART, L.; BARULIN, A.; HUNTOON, C.; GRIGORIEV, A.; VARONIN, L. Bone and body mass changes during space flight. **Acta Astronautica**, Vol. 36, nº 8-12, pp. 463-466, 1995.
- (2) ALBREKTSSON, T.; JOHNSON, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **Eur Spine J**. 2001; v.10, p. S96-S101.
- (3) MISCH, C. E. **Implantes Dentários Contemporâneos**: 2ª Edição, Santos, 2000.
- (4) CONSTANTINO, P. D.; FREIDMAN, C. D. Synthetic bone graft substitutes. **Otolaryngol. Clin. North Am**. 1994; v.27, p. 1037-73.
- (5) LeGEROS, R. Z. Calcium Phosphates in oral biology and medicine. **Basel**, 1991; p. 110.
- (6) MOORE, R. W.; GRAVES, S. E.; BAIN, G. I. Synthetic Bone Graft Substitutes. **Anz J Surg**. 2001; v.71, p. 354-361.
- (7) ROBBINS, L. S. Patologia estrutural e funcional. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 4. edição, 1991.
- (8) POMPEIA, C.; LIMA, T.; CURI, R. (Review) Arachidonic acid cytotoxicity: can arachidonic acid be a physiological mediator of cell death? **Cell Biochem Funct**. v. Jun; 21(2), p.97-104, 2003.
- (9) SALLES, M. B. **Micro-elementos funcionais alterando a biocompatibilidade do polímero de poliuretano de mamona (poliol) em enxertos ósseos: estudo desenvolvido em cães**. 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências - Anatomia) - Departamento de Anatomia Funcional Estrutura e Ultraestrutura do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

- (10) DONATH, K.; LAASS, M.; GÜNZL, H. J. The histopathology of different foreign-body reactions in oral soft tissue and bone tissue. *Virchows Archiv. A.: Pathological Anatomy and histopathology*, v.420., p.131-137, 1992.
- (11) GOIA, T. S. ***Avaliação in vitro e in vivo de ligas porosas de Ti-13Nb-13Zr obtidas por metalurgia do pó.*** 2008. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear – Materiais) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo.
- (12) LeGEROS, R. Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. ***Adv Dent Res.*** 1988; v.2, p.164-180.

EFFECTS OF BONE REGENERATION AFTER THE IMPLANTATION OF TWO BIO-CERAMICS AND A VITAMIN COMPLEX.

ABSTRACT

Two synthetic bioceramics are largely used nowadays: hydroxyapatite (Hap) and (β -TCP). In many situations, it is desirable that the rate of absorption of such materials matches the rate of bone neoformation. A valid alternative for reaching this goal is the association of both materials. Bone healing and material absorption are physiological and biochemical complex processes and may be affected by the inflammatory response. In this work, two different bioceramics were implanted on Wistar rats' femora: β -TCP or the biphasic mixture of β -TCP and Hap (40:60% by weight). It was also evaluated the effect of a vitamin complex, which regulates the inflammatory response. It was concluded that pure β -TCP was more absorbed when compared the biphasic mixture of β -TCP and Hap, and that the presence of the vitamin complex may have had a favorably influence on bone neoformation.

Key-words: bioceramics, in-vivo implant, osteoconduction.