

BIOCOMPATIBILIDADE DE CERÂMICAS MACROPOROSAS: UMA AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA OSTEOINTEGRAÇÃO

C. Ribeiro*, O. M. M. Araújo*, K. B. Violin** e A. H. A. Bressiani**

*Universidade Federal do ABC, Centro de Engenharia, Modelagem e Ciências Sociais Aplicadas, Santo André, SP, Brasil

** Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Centro de Ciência e Tecnologia de Materiais, São Paulo, SP, Brasil

e-mail: christiane.ribeiro@ufabc.edu.br

Resumo: É fortemente recomendável que materiais de uso clínico, após aprovação por experimentação *in vitro*, devam ser avaliados *in vivo*, principalmente, em termos de osteointegração quando se trata de biomateriais macroporosos para reparação óssea. O conhecimento sobre os mecanismos que determinam uma osteointegração efetiva ainda é limitado, tornando necessárias novas investigações para melhor compreensão dos eventos que determinam a cinética de reparação e a qualidade do novo tecido formado. O objetivo principal deste trabalho é avaliar histologicamente de maneira qualitativa o comportamento de diferentes cerâmicas (bioinertes e bioativas) macroporosas, com potencial osteogênico para fins de reparação. Biocerâmicas de alumina, zircônia, hidroxiapatita e biovidro obtidas pela técnica de consolidação de espumas foram inseridas, sob formato cilíndrico, em tíbias de coelhos. Para auxiliar na investigação do metabolismo ósseo e tempo de reparação, foram introduzidos marcadores ósseos fluorescentes: tetraciclina, calceína e alizarina. As lâminas obtidas foram caracterizadas por microscopia de fluorescência, e com auxílio do programa (ImagePro Plus 5.1) analisou-se qualitativamente a reparação tecidual de cada implante. As fases de atuação da resposta tecidual ocorreram de forma diferente para cada material. O primeiro marcador (tetraciclina) pode ser observado em todas as amostras, predominando mais intensamente para os defeitos que receberam os implantes de biovidro. Nenhum dos implantes apresentou característica inibitória frente a reparação óssea.

Palavras-chave: cerâmicas macroporosas, avaliação *in vivo*, microscopia de fluorescência, osteointegração.

Abstract: It is highly recommended that materials for clinical use after its approval by *in vitro* experiments should be *in vivo* evaluated, particularly in terms of osseointegration when it comes to macroporous biomaterials for bone repair. Knowledge about the effective osseointegration mechanisms is still limited, requiring further research to understand better the events that determine the repair kinetics and quality of new tissue formed. The main objective of this study was to qualitative and histologically evaluate the behavior of different ceramic (bioinert and bioactive)

macroporous with osteogenic potential for repair. Bioceramics of alumina, zirconia, hydroxyapatite and bioglass obtained by consolidating foams technique were implanted in the cylindrical shape in tibia of rabbits. Fluorescent bone markers: tetracycline, calcein and alizarin were introduced to assist in the investigation of bone metabolism and repair time. Slides obtained were characterized by fluorescence microscopy and with assistance of the program (ImagePro Plus 5.1) the tissue repair towards each implant was qualitatively analyzed. Tissue repair phases occurred differently for each material. The first marker (tetracycline) can be observed in all samples, higher for defects that received bioglass implants. None of the implants showed inhibitory characteristic to bone repair.

Keywords: macroporous ceramics, "in vivo" evaluation, fluorescence microscopy.

Introdução

Em função da diversidade de biomateriais pertencentes a uma mesma classe, como as variadas biocerâmicas, dependendo da natureza, microestrutura e características como a topografia e forma do material que constitui o implante, diferentes intensidades e tempo de respostas podem ser induzidas. Como consequência destas características, é formada um tipo de interface para o desenvolvimento e manutenção de uma estabilidade biomecânica. Uma das alternativas para melhorar este quesito de estabilidade pode ser alcançada com a utilização de estruturas porosas tridimensionais, capazes de induzir uma efetiva osteointegração [1].

Cada espécie de biomaterial pode proporcionar a ocorrência de uma sequência de eventos que envolvem a adesão, migração e diferenciação celular, desencadeando reações ao redor do implante, típicas para cada espécie de material [1]. Sendo assim, fica evidente a necessidade de estudos de biocompatibilidade *in vivo* que avaliem mecanismos que direcionam para uma reparação mais tardia ou acelerada de maneira eficaz, e caracterize o comportamento diferenciado desses materiais antes da sua utilização em seres humanos, comprovando clinicamente a eficiência de uma osteointegração, por exemplo.

Uma das formas de avaliar histologicamente os eventos celulares relacionados aos mecanismos de reparação tecidual que induzem uma melhor osteointegração é utilizando marcadores ósseos fluorescentes (tetraciclina, alizarina e calceína) que podem ser visualizados por técnica de microscopia. Assim, é possível visualizar o crescimento ósseo nas diferentes fases que acompanham a administração desses marcadores, definindo colorações específicas para cada um deles, em diferentes porções ósseas em função do tempo. Estas informações permitem inferir os estágios de crescimento com base no marcador ósseo predominante e analisar o remodelamento perante diferentes fases de reparação, verificando o caráter de osteointegração e penetração do tecido ósseo pelos canais interconectados de microestruturas porosas [2].

Neste trabalho foi analisada a biocompatibilidade *in vivo* do comportamento de osteointegração de diferentes cerâmicas macroporosas, além de verificar a influência da natureza de cada cerâmica, mantendo mesmo tipo de microestrutura, na resposta biológica produzida pelo tecido. Esse tipo de avaliação, mesmo que qualitativa, serve como uma ferramenta de grande valia para o estudo comparativo de biomateriais e suas diferentes variações de biocompatibilidade.

Materiais e Métodos

Cerâmicas de natureza bioinerte (alumina- Al_2O_3 e zircônia – ZrO_2) e bioativa (hidroxiapatita - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e biovidro - 45% SiO_2 , 24,5 % CaO , 24,5% Na_2O e 6,0% P_2O_5) foram confeccionadas em formato cilíndrico (3mm de diâmetro e 7-8 mm de altura) a partir da técnica de consolidação de espumas [3], com porosidade média entre 60-70%, em volume, seguidas de sinterização e esterilização por radiação gama, dose de 25 KGy (Co60, Gammacell modelo 220-IPEN).

As amostras (4 espécimes de cada cerâmica) foram inseridas em tíbias de coelhos machos adultos (espécie albino, Nova Zelândia), pesando aproximadamente 3,0 kg e tendo como controle, a aloja de um defeito. Toda experimentação animal foi realizada no biotério do IPEN e seguiu os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) com aprovação da Comissão de Ética e Experimentação no uso de Animais (Projeto nº.25/08 - CEUA-IPEN/SP). A partir do 14º dia pós-cirurgia, foram introduzidos marcadores ósseos fluorescentes policromáticos na forma de injeções subcutâneas a cada 2 semanas: tetraciclina (Cloridrato de oxitetraciclina 500mg, Terramicina®, Pfizer), calceína (Labsynth produtos para laboratórios LTDA) e alizarina (Labsynth produtos para laboratórios LTDA), respectivamente. A eutanásia dos animais foi realizada 8 semanas após a cirurgia, com altas doses de sedativos, correspondendo a 5 vezes a dose terapêutica, seguido da remoção de suas tíbias. Após a dissecação dos tecidos moles, os blocos ósseos contendo os implantes foram removidos e fixados, em sequência, por meio de solução neutra 10% de formalina por um

período de 45 dias, de acordo com a literatura [4,5].

Posteriormente, foram realizadas as etapas de desidratação e inclusão em resina acrílica (Technovit® 7200 VCL - Kultzer & Co, Wehrhein - Alemanha) para obtenção das lamínulas de cada amostra. Foi realizado o desgaste dos cortes histológicos, em politriz metalográfica (Struers, DP 10), até a espessura de 30 μm para a avaliação das lamínulas por análise de microscopia de fluorescência (Nikkon Eclipse – E1000) acoplado a câmera digital Nikkon DXM 1200F.

Após excitação com comprimento de luz ultravioleta adequado, foram observadas as diferentes colorações para cada fluoróforo em diferentes porções ósseas que cresceram com o tempo de reparação. As colorações observadas foram respectivamente: marrom-alaranjado para tetraciclina, verde para calceína, amarelo-ocre para alizarina. Cada imagem foi fotografada e com auxílio do programa (ImagePro Plus 5.1) foi possível selecionar os três marcadores teciduais utilizados por meio da diferença da intensidade dos "pixels". Definiu-se uma classe correspondente para cada marcador, adotando ajuste manual de tons: tetraciclina - classe cor azul, calceína - classe cor verde e alizarina - classe cor vermelha para conseguir maior contraste nas imagens. Em seguida, estas classes foram associadas às colorações relacionadas aos marcadores teciduais obtidas nas imagens.

Resultados

Os marcadores da remodelação óssea, aplicados em diferentes períodos de tempo, foram identificados por microscopia de fluorescência de acordo com as regiões especificadas, como exemplificado nas imagens da Figura 1, referente ao controle (sítio de defeito sem a presença do implante). As imagens mostram a região analisada e esta mesma região associada ao dicionário de cores, respectivamente. Observa-se também a coloração magenta nas imagens tratadas, atribuída a região de sobreposição onde se encontram os 3 marcadores.

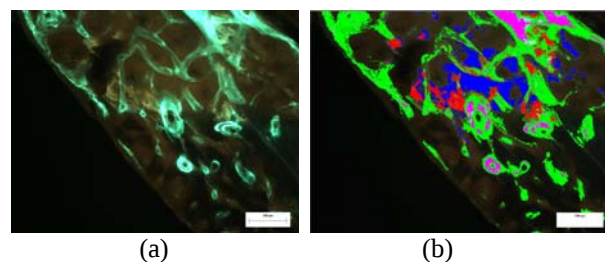
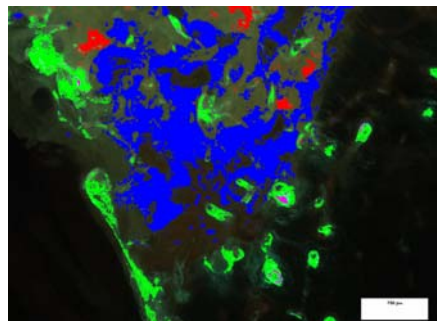


Figura 1: Imagem do corte histológico do controle (somente o defeito) da região da cortical oposta da tíbia; (a) imagem gerada por microscopia de fluorescência e (b) imagem associada ao dicionário de cores gerada pelo programa ImagePro Plus 5.1.

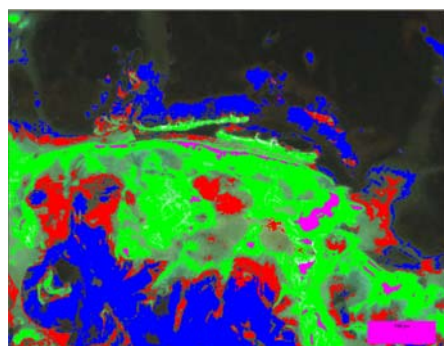
Foi constatado que existem outras regiões não demarcadas nas imagens apresentadas, que representam a associação da sobreposição de 2 marcadores diferentes,

necessitando de filtros especiais para identificação fiel destas regiões.

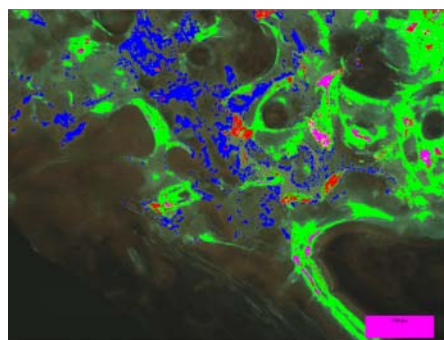
Na Figura 2 (a), (b), (c) e (d), estão apresentadas imagens típicas dos implantes, obtidas por microscopia de fluorescência, para a hidroxiapatita, biovidro, ZrO_2 e Al_2O_3 , respectivamente.



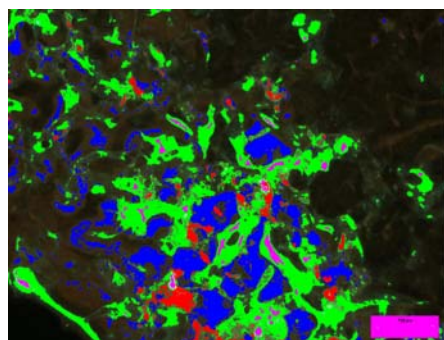
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 2: Imagens dos cortes histológicos gerados a partir dos implantes de: (a) hidroxiapatita, (b) biovidro, (c) ZrO_2 e (d) Al_2O_3 , para região da cortical oposta.

Para todos os implantes foi possível observar regiões que não foram coloridas pelo programa Image Pro Plus 5.1, que indicam áreas de grande extensão onde são encontrados dois marcadores. Tais regiões podem ser denominadas áreas de transição onde dois marcadores diferentes puderam ser agregados ao tecido em crescimento.

As imagens relativas aos implantes bioinertes (Figura 2 - c e d) exibem um padrão diferente de marcação quando comparado as cerâmicas bioativas.

Para as bioinertes pode-se constatar intensa marcação da calceína (verde) em maior área, além de uma predominância da alizarina (vermelho) para os implantes de alumina quando comparados aos de zircônia, marcador correspondente ao último período de reparação. Este fato pode estar relacionado à baixa atividade de remodelamento ósseo da zircônia no último período. Outro fato evidenciado para a zircônia, associada à baixa agregação da tetraciclina quando comparada a alumina de natureza também bioinerte, pode ser decorrente da maior presença de tecido não mineralizado, associado às primeiras fases da reparação óssea para este material.

Para as cerâmicas bioativas, foi observado que para o biovidro (Figura 2-b) houve uma predominância de marcação da calceína quando comparada aos implantes de HAp, no entanto, as duas cerâmicas bioativas exibiram menor marcação para a alizarina, aparecendo na cortical e interior do implante de forma mais tênue. Este fato permite inferir que a resposta de osteointegração na interface osso/implante não foi contínua em toda a extensão e ocorreu em períodos diferentes.

Discussão

No interior dos implantes, foi observada com maior intensidade a coloração verde, representada pela calceína. Este período, no qual este fluoróforo foi aplicado, é identificado pelo processo de condução e penetração do tecido ósseo pelos canais interconectados. Desta forma, é possível evidenciar o caráter de osteocondução, mesmo para os implantes de natureza bioinerte. Este comportamento está associado a configuração dos poros obtidos, inerente a técnica de processamento, permitindo a nutrição e manutenção necessária para a sobrevivência das células, comprovando que os poros e canais formaram uma rede de alta interconectividade, independente da composição das cerâmicas [3, 4].

Foi observada a presença de tetraciclina ao redor das áreas azuis e em regiões marginais em algumas imagens, tal comportamento pode estar associado ao fato de que as semanas que foram administradas as doses de calceína (segundo marcador), abrange uma segunda fase de crescimento, dando suporte para a primeira fase representada pelas áreas azuis. Além disso, este é o período no qual é incitado o mecanismo inicial para estabilização do implante e do tecido ósseo [4].

Analisando as imagens, constatou-se que grande parte do processo de reparo ósseo ocorre no primeiro

período de reparação, principalmente para as amostras de natureza bioativa, no entanto, este processo foi contínuo, já que houve também a marcação com os demais fluoróforos. Esta característica representa uma remodelação ininterrupta dos tecidos pela microestrutura porosa dos implantes. Pela avaliação da interface osso/implante, infere-se que as situações em que há as três colorações, a resposta de formação óssea estendeu-se por todos os estágios de reparação do pós-operatório [4 -6].

A marcação com a alizarina, em vermelho, foi bastante tênue, em grande parte das amostras analisadas, não havendo crescimento exuberante nesta última fase em que foi aplicada. Desta forma, a partir da 5ª e 6ª semana, o remodelamento ósseo constante, apresentou-se menos intenso em relação as duas fases iniciais, comportamento que pode estar associado a presença de osso mais consolidado, dificultando a agregação da alizarina que tem afinidade pela matriz osteóide (não-mineralizada) [5].

De maneira geral, foi observado que o marcador ósseo administrado na 3ª. e 4ª. semana (calceína) revelou um consistente padrão de osteogênese, mostrando a cortical interna e a região interfacial como áreas ativas de mineralização para os diferentes implantes. Os implantes de hidroxiapatita, zircônia e alumina seguiram o comportamento do controle no estágio final de análise (alizarina), mantendo baixa atividade óssea nesta fase de reparação, sendo o implante de biovidro, o qual apresentou atividade mais intensa de remodelamento durante os diferentes períodos investigados.

É importante ressaltar, que dados mais conclusivos podem ser obtidos somente após a análise estatística dos dados quantitativos da avaliação morfométrica dos implantes [5-6].

Diante dos resultados apresentados concluiu-se que a microestrutura macroporosa das amostras e configuração interconectada de poros podem favorecer o crescimento ósseo, evidenciando o processo de osteointegração e remodelação em todos os implantes. O período de maior reparação óssea decorre após as 2 primeiras semanas, ou seja, existe um período latente de remodelamento e uma continuidade do processo de osteocondução/osteointegração na segunda fase de reparação óssea. Aparentemente, o implante de biovidro apresentou uma resposta mais favorável à reparação, comparado aos demais implantes, e uma atividade óssea menos intensa foi verificada para os implantes bioinertes.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Dra. Pilar A. Sepulveda pelo aprendizado quanto a preparação das amostras e ao CNPq e FAPESP, pelo apoio financeiro.

Referências

[1] Legeros RZ, Craig RG. Strategies to affect bone

remodeling: osteointegration. J Bone Miner Res. 1993; 8 (2): 583-96.

[2] Ellingsen JE, Lyngstadaas SP. Bio-Implant Interface. New York: CRC Press, 2003. p. 448.

[3] Sepulveda P, Bressiani AHA, Bressiani JC, Meseguer LO, König JrB. In Vivo Evaluation of Hydroxyapatite Foams. Journal of Biomedical Materials Research, 2002; 62 (4): 587-592.

[4] Ribeiro C, Goia TS, Violin KB, Bressiani JC, Bressiani AHA. Osseointegration and Biocompatibility Study of Macroporous Biphasic Calcium Phosphate (BCP) Ceramics Obtained by Consolidation Using Albumin. Advances in Science and Technology. 2010; (76): 66-71.

[5] Goia TS. Implantes porosos à base de titânio: avaliação *in vitro* e *in vivo*. [tese] São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares; 2012.

[6] Violin KB, Ribeiro C, Goia TS, Bressiani JC, Bressiani AHA. Lectin histochemistry Evaluation of Rabbit s Tibia Implanted with Macroporous Biphasic Ceramic Implants. Key Engineering Materials, 2013; (530): 331-336.