

## AVALIAÇÃO DA OSTEOINTEGRAÇÃO EM ESPUMAS CERÂMICAS À BASE DE ALUMINA E ZIRCÔNIA

Christiane Ribeiro<sup>1</sup>, Marcelo Carbonari<sup>1</sup>, Pilar Sepúlveda<sup>1</sup>, Bruno König Jr.<sup>2</sup>, Jose C. Bressiani<sup>1</sup>, Ana Helena A. Bressiani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>IPEN - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, CCTM - 05508-000 - São Paulo, SP, Brasil

<sup>2</sup>ICB III - Instituto de Ciências Biomédicas III - Departamento de Anatomia - USP

E-mail: cribeiro@ipen.br

**Resumo.** A busca de biomateriais com propriedades mecânicas mais eficientes tem estimulado o uso de diferentes cerâmicas, inclusive as bioinertes, como alumina e zircônia. Uma alternativa para tornar estas biocerâmicas mais atrativas quanto a resposta biológica e promover estrutura qualificada para o crescimento do tecido ósseo empregando uma rede permeável de poros. Com este objetivo, nesse trabalho foram preparadas cerâmicas porosas de alumina e zircônia pela metalurgia do "gelcasting" de espuma. Esta técnica permitiu a geração de corpos de prova com porosidade interconectada. Amostras cilíndricas de alumina e zircônia com dimensões de 3mm de diâmetro e 7mm de altura foram esterilizadas por radiação gama e em seguida, inseridas em tíbias de coelhos. A partir do 14<sup>o</sup> dia pós-cirurgia foram aplicados a cada 2 semanas, marcadores ósseos fluorescentes: tetraciclina, calcema e alizarina, respectivamente, para tornar possível a avaliação da osteointegração. Após 8 semanas da cirurgia os coelhos foram sacrificados com altas doses de sedativos. O metabolismo ósseo foi investigado por microscopia de fluorescência, verificando que a maior atividade ocorre após 4 - 5 semanas da cirurgia, período correspondente a aplicação da calcema.

**Palavras-chave:** Alumina, Zircônia, Gelcasting, Espumas cerâmicas, Osteointegração

### 1. INTRODUÇÃO

O uso de diferentes implantes tem estimulado não só a busca de materiais com características mais promissoras, mas também o desenvolvimento de novas tecnologias, explorando os materiais já disponíveis para obtenção de formas estruturais mais adequadas ao propósito de recuperação acelerada do paciente. Este propósito pode ser satisfeito pela utilização de implantes com alta área de superfície específica e porosidade adequada, podendo levar a uma rápida adesão de proteínas e macromoléculas, melhorando a capacidade de osteointegração e remodelamento ósseo. Uma estrutura deste tipo pode ser obtida a partir de um retículo poroso constituído de cerâmicas que apresentam boas propriedades mecânicas, como a alumina e a zircônia, já investigadas na área médica para fins estruturais (Hench, 1993). O conjunto de características como: boa estabilidade química e física, resistência mecânica, dureza e módulo de Young's da mesma ordem de grandeza das ligas de aço, tornam estas cerâmicas, materiais com potencial para reparo de porções ósseas em regiões sujeitas a altas solicitações mecânicas, locais pouco recomendados para o uso de cerâmicas como hidroxiapatita, por exemplo (Picom et al., 1999; Hench, 1993).

Sabe-se que cerâmicas à base de alumina e de zircônia, após sinterização adequada, possuem altas densidades e microestruturas controladas, tornando-se qualificadas para garantir alto desempenho mecânico e estabilidade às paredes celulares dos implantes que apresentam uma rede permeável de poros (Lopes et al., 1996; Sepúlveda, 1997). Esta

11229

porosidade pode ser garantida pela estrutura particular que uma espuma apresenta, como por exemplo, as espumas cerâmicas obtidas a partir da técnica do "gelcasting" de espuma, já testada com sucesso na obtenção de espumas bioativas de hidroxiapatita e biovidro de diferentes porosidades.

Nesse trabalho, cerâmicas porosas com alto poder de sustentação mecânica (alumina e zircônia) obtidas por "gelcasting" de espuma são investigadas quanto ao processo de osteocondução baseado na porosidade e composição de cada material.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Cerâmicas macroporosas a base de alumina e zircônia foram obtidas pela técnica do "gelcasting" de espuma, de acordo com a metodologia proposta por Sepulveda, (1997). A geração da espuma é provocada pela agitação vigorosa da suspensão aquosa constituída do pó cerâmico, monômeros e agente dispersante em contato com um surfactante não iônico, sendo também necessária a adição de um iniciador e catalisador para promover a polimerização *in situ*. Esta etapa é realizada em um sistema fechado (caixa de luvas), isento de oxigênio para assegurar uma reação de polimerização mais efetiva, garantindo maior estabilidade as células. As espumas obtidas de alumina e zircônia foram sinterizadas e caracterizadas quanto à distribuição de tamanho de poros e quanto à microestrutura, por microscopia eletrônica de varredura.

Para verificar a osteointegração deste material, amostras cilíndricas (3mm de diâmetro e 7-8 mm de altura) das espumas sinterizadas foram confeccionadas e esterilizadas por radiação gama e a seguir inseridas em tibias de coelhos adultos, albino Nova Zelândia, pesando aproximadamente 3,0 kg de acordo com o protocolo n° 099.2001 aprovado pela CEEA. Para investigar os mecanismos que atuam no metabolismo ósseo, a partir do 14º dia pós-cirurgia, foram aplicados a cada 2 semanas, marcadores ósseos fluorescentes: tetraciclina (laranja escuro), calceína (verde) e alizarina (amarelo ocre), respectivamente. Os coelhos foram sacrificados 8 semanas após a cirurgia com altas doses de sedativos, seguido da remoção de suas tibias. A deposição óssea e o remodelamento foram analisados com base nas imagens obtidas de lâminas polidas originadas de cada porção óssea por microscopia de fluorescência e análise histomorfométrica, usando microscópio NIKKON ECLIPSE E1000 acoplado a câmera digital (MIDIA CYBERNETICS) e programa Image Pro Plus V 4.5.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A configuração dos poros (tamanho, forma e distribuição) representa um dos fatores mais relevantes na avaliação da qualidade do reticulado, visando uma osteointegração mais significativa. O reticulado poroso, Figura 1, obtido a partir da metodologia do "gelcasting" de espuma apresentou característica promissora para osteointegração, identificada pela esfericidade dos poros, geometria que não compromete o metabolismo ósseo, pelas paredes das células com presença de microporos que tendem a facilitar a drenagem de líquidos e principalmente pela interconexão dos macroporos presentes em todas as amostras. A avaliação da estrutura porosa pode ser acompanhada pela análise da topografia das espumas cerâmicas por microscopia eletrônica de varredura na Fig. 1.

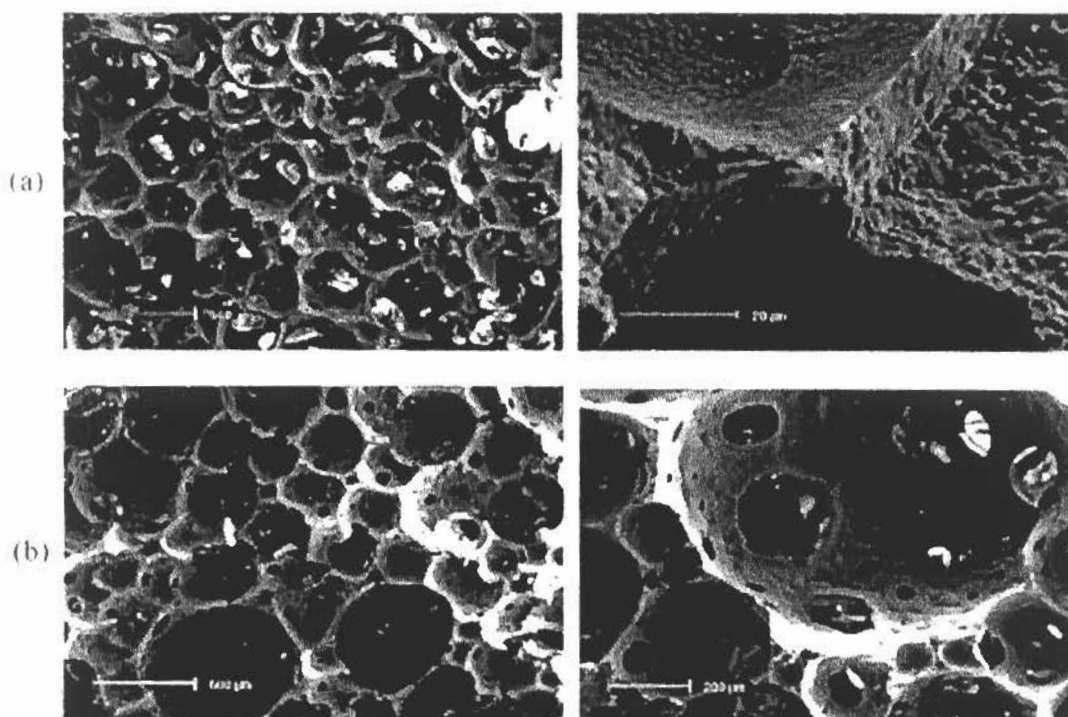


Figura 1 Micrografias obtidas por MEV das espumas cerâmicas: (a) alumina e (b) zircônia.

A obtenção de uma estrutura porosa para implante ósseo exige um balanço entre o diâmetro de poro e desempenho mecânico, este último mais relacionado a natureza intrínseca do material de partida ( $\text{Al}_2\text{O}_3$  ou  $\text{ZrO}_2$ ). Observa-se que para as duas amostras as espumas apresentaram paredes de boa densidade após sinterização e os macroporos presentes na estrutura apresentaram dimensões variadas, característica da técnica adotada que não permite total controle do tamanho de poros, porém o uso de dessecador a vácuo amenizou esta diferença, uniformizando a macroporosidade detectada na amostra.

Os resultados revelaram uma porosidade no intervalo de 85-90% em volume. Este nível de porosidade é atingido pelo rearranjo das células durante a expansão da espuma em dessecador a vácuo.

Alguns trabalhos têm relatado diferentes informações sobre a macro e microporosidade e quanto ao tamanho ideal de poro (Navarro et al., 2004; Chang et al., 2000). Os valores sugeridos pela literatura são bastante variados, sendo que a maioria indica que poros maiores que  $150\ \mu\text{m}$  são ótimos para facilitar o crescimento do tecido (Chang et al., 2000; Daculsi et al., 1990). Visto que o tamanho das osteonas é aproximadamente  $223\ \mu\text{m}$ , Holmes, (1979) tem sugerido um tamanho de poro ideal entre  $200$  e  $400\ \mu\text{m}$ . Apesar das controvérsias, diferentes trabalhos concordam que a porosidade ideal depende fortemente da natureza do material adotado como implante.

O potencial osteocondutivo das cerâmicas de alumina e zircônia foi avaliado e comparado. Na Figura 2 são apresentadas micrografias dos implantes, representando uma porção selecionada da cortical óssea. As colorações laranja escuro, verde e amarelo ocre somente são visíveis em decorrência da formação de um novo tecido mineralizado ao longo

do implante, associada aos três marcadores: tetraciclina, calceína e alizarina, respectivamente.

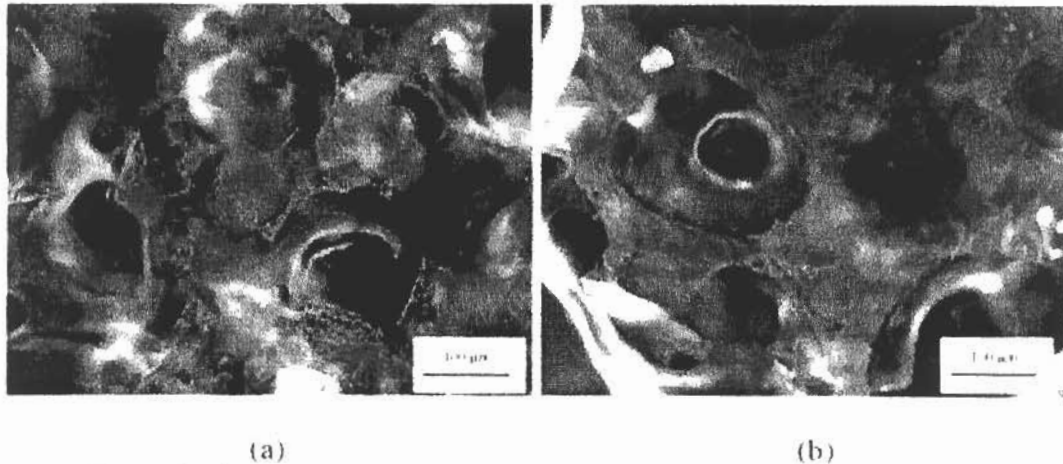


Figura 2 - Imagens da região cortical cirúrgica dos implantes: (a) alumina, (b) zircônia obtidas por Microscopia de Fluorescência.

Na Figura 3 é exemplificada a metodologia para análise histomorfométrica das amostras, baseada nas diferentes colorações correspondentes a cada marcador, associados ao dicionário de cores do programa Pro Plus 4.5, sendo: tetraciclina → vermelho, calceína → verde e alizarina → amarelo.

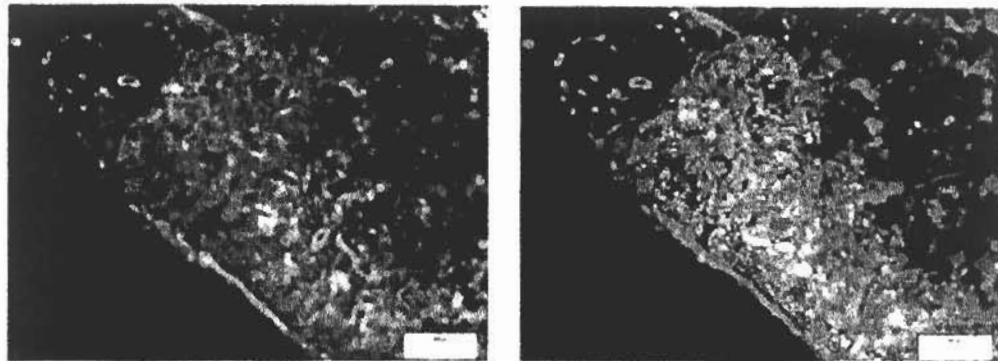


Figura 3 - Micrografia de fluorescência da imagem utilizada para contagem, apresentando as 3 colorações demarcadas que correspondem aos 3 marcadores.

Esta análise é empregada para estimar o tempo de deposição óssea após cirurgia, pela demarcação das áreas onde se observa coloração característica de cada marcador ósseo utilizado.

Normalmente, o sucesso do implante depende da deposição de uma matriz mineralizada ao seu redor. Este processo envolve diferentes etapas como a proliferação de osteoblastos, diferenciação celular, formação de matriz extracelular e mineralização (Chang et al., 2000). Verificou-se que estes mecanismos de remodelamento ósseo processaram-se de maneira semelhante para as duas amostras, não sendo observadas diferenças significativas apesar da osteocondução ser variável de acordo com a composição de cada

material. Verificou-se também deposição óssea, inclusive no retículo interno das duas espumas. Com isto pode-se deduzir que a osteointegração foi desempenhada em função da porosidade, independente da natureza bioinerte das cerâmicas.

A deposição óssea foi reduzida nas primeiras semanas logo após a cirurgia, pois pequena quantidade de tetraciclina (1<sup>o</sup> marcador) pode ser detectada. Neste período, o metabolismo está mais voltado às reações de corpo estranho que tendem a se tornar mais ou menos intensas de acordo com a biocompatibilidade do material; reações desta natureza podem persistir por longo prazo, período de até 8 semanas pós cirurgia, por exemplo (Lu et al., 1998). Como as amostras apresentam caráter bioinerte, possivelmente estas reações são predominantes no estágio inicial; a coloração amarela também pode estar relacionada a formação de tecido fibroso ou de cartilagem sobre os implantes, reação natural do organismo na presença de materiais bioinertes. O metabolismo ósseo tornou-se mais significativo após 4-5 semanas da cirurgia, estágio que são observadas formações de anéis concêntricos, similar a estrutura das osteonas, como observadas em tecidos corticais; esta constatação indica a ocorrência da maturação do tecido ósseo durante o período de aplicação da calceína (quarta e quinta semana pós-cirurgia) para os dois tipos de amostras.

Existem diferentes fatores que também podem interferir na osteointegração como: estabilidade, intensidade de micro movimentos entre implante e osso, presença de vazios entre implante e superfície do osso e natureza do osso de contato (trabecular ou cortical) (Cornell et al., 1998), diferença também observada neste trabalho, onde é acusado um metabolismo mais rápido na região cortical em relação a medular. De maneira geral, as micrografias sugerem uma formação óssea mais evidente na região cortical, geralmente na porção medular as reações teciduais são caracterizadas por uma osteogênese mais fraca, mesmo para cerâmicas bioativas (Lu et al., 1998).

Para uma melhor avaliação da qualidade do tecido ósseo formado nas diferentes porções do implante são necessárias análises complementares para estudo do metabolismo nas regiões cortical e medular que diferem na quantidade de líquidos, irrigação sanguínea e nível de tensão.

#### 4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados pode-se concluir que:

- A estrutura macroporosa forneceu arranjo espacial apropriado para o crescimento ósseo
- A porosidade das cerâmicas foi determinante no processo de osteointegração, sendo observada a deposição óssea em todas as regiões que permeiam o implante, havendo maior deposição durante a quarta e quinta semana pós-cirurgia.
- Não foram observadas diferenças comportamentais no processo de remodelamento ósseo entre as duas cerâmicas

#### Agradecimentos

Os autores agradecem a Fapesp e ao CNPq pelo apoio financeiro e aos Drs. Sérgio Allegrini Júnior e Marcelo Yoshimoto pela realização das cirurgias.

## Referências

- Chang, B.S e Lee, C. K. e Hong, K. S. e Youn, H.J e Ryu, H.S e Park, K.W. (2000). "Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations". *Biomaterials*, 21, 1291-1298
- Cornell, C. N. e Lane, J. M. (1998). "Current understanding of osteoconduction in bone regeneration". *Clin Orthop*, 355 S 267-73
- Daculsi, G. e Passuti, N. (1990). "Effect of the macroporosity for osseous substitution of calcium phosphate ceramics". *Biomaterials*, 11, 86-7
- Hench, L.L. e Wilson, J. (1993). *Introduction to Bioceramics*. World Scientific Publishing Co., Ltd
- Holmes, R. E. (1979). "Bone regeneration within a coralline hydroxyapatite implant". *Plast. Reconstr Surg*, 63, 626-633
- Lopes, R. A. e Segadães, A.M. (1996). "Microstructure, permeability and mechanical behaviour of ceramic foams". *Materials Science and Engineering A209*, 149-153
- Lu, J.X. e Gallur, A. e Flautre, B. e Descamps, M. e Hardouin, P. (1998). "Comparative study of tissue reactions to calcium phosphate ceramics among cancellous, cortical and medullar bone sites in rabbits". *J Biomed Mater Res*, 42, 357-367
- Navarro, M. e Dell Valle, S. e Martínez, S. e Planell, J. A. e Ginebra, M. P. (2004). "New macroporous calcium phosphate glass ceramic for guided bone regeneration". *Biomaterials*, 25, 18, 4233-4241
- Piconi, C. e Maccauro, G. (1999). "Review Zirconia as a ceramic biomaterial". *Biomaterials*, 20, 1- 25
- Sepulveda, P. A. (1997). "Gelcasting foams for porous ceramics". *The Am Ceram Soc Bull*, 76, 10, 61- 65

## EVALUATION OF THE OSSEOINTEGRATION IN ALUMINA AND ZIRCONIA BASED CERAMIC FOAMS

Christiane Ribeiro<sup>1</sup>, Marcelo Carbonari<sup>1</sup>, Pilar Sepulveda<sup>1</sup>, Bruno König Jr.<sup>2</sup>, José C. Bressiani<sup>1</sup>, Ana Helena A. Bressiani<sup>1</sup>

<sup>1</sup> IPEN - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, CCTM - 05508-000 São Paulo, SP - Brasil

<sup>2</sup> ICB III - Instituto de Ciências Biomédicas III - Departamento de Anatomia - USP

E-mail: cribeiro@ipen.br

**Abstract.** *The searching of biomaterials with more efficient mechanical properties had stimulated the use of different materials, including bioceramics, such alumina and zirconia. An alternative for become these bioceramics more attractive for biological responses is the promotion of a qualified permeable porous network microstructure to allow bone tissue ingrowth. With this objective, in this work alumina and zirconia based porous ceramics were prepared by gelcasting foam method. This technique allowed the obtention of bodies with interconnected porosity. Cylindrical samples of alumina and zirconia ceramics measuring: 3mm in diameter and 7 mm in length were sterilized by gamma radiation and subsequent installed in rabbit tibias. After 1<sup>st</sup> day surgery were injected every 2 weeks, fluorochrome bone labels, tetracycline, calcein and alizarin, respectively to evaluate the osseointegration process. After 8 weeks surgery the rabbits were euthanized by an overdose of sedatives. The bone metabolism was investigated by fluorescence microscopy and was observed that the more intense activity occurs after 4-5 weeks surgery that corresponds calcein application period.*

**Keywords:** Alumina, Zirconia, Gelcasting, Ceramic Foams, Osseointegration.