

Efeito do fosfato tricálcio na reparação de defeito ósseo em tíbias de ratos

**Luciano Rezende da CUNHA^a, Eleny BALDUCCI-ROSLINDO^b,
Ana Maria MINARELLI-GASPAR^b**

^a*Pós-graduando em Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial,
Faculdade de Odontologia, UFU, Uberlândia - MG, Brasil*

^b*Departamento de Morfologia, Faculdade de Odontologia, UNESP,
14801-903 Araraquara - SP, Brasil*

Cunha LR, Balducci-Roslindo E, Minarelli-Gaspar AM. Effect of tricalcium phosphate in the repair of bone defect in tibiae of rats. Rev Odontol UNESP. 2007; 36(4): 293-298.

Resumo: A pesquisa de um material que possa substituir ou induzir a formação óssea é um dos desafios das áreas médica e odontológica. O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento biológico do material sintético fosfato tricálcio após implantação em tíbias de ratos. Foram utilizados 20 ratos machos, *Rattus norvegicus albinus Holtzman*, nos quais, após a anestesia e assepsia, foi realizada uma incisão de 15 mm em cada perna, expondo a região anterior da tíbia e, posteriormente, utilizando um micromotor e um disco de aço, foi realizada uma fissura longitudinal (15 x 2 mm) onde foi aplicada uma pasta de fosfato tricálcio dissolvida em solução fisiológica no grupo tratado (tíbia direita) e, no grupo controle (tíbia esquerda), nenhum material foi aplicado. Os animais foram sacrificados após 10, 20, 30 e 45 dias, as tíbias removidas e fixadas em solução de Bouin por 72 horas, descalcificadas e processadas, segundo técnica rotineira para inclusão em parafina e cortes semi-seriados de 6 µm, corados em HE. Em nenhum período, observou-se reação inflamatória nos resultados dos grupos controle ou tratado. O grupo tratado apresentou uma recuperação mais rápida no fechamento da fissura que o grupo controle; desta forma, concluiu-se que o material fosfato tricálcio apresentou biocompatibilidade, em contato direto com o tecido ósseo, e capacidade osteocondutora pela sua reabsorção e conseqüente deposição óssea.

Palavras-chave: *Fosfato tricálcio; osseointegração; osteogênese.*

Abstract: The research of a material that can substitute or induce the bone formation is one of the challenges of the medicine and dentistry. The aim of this study is to evaluate the biological behavior of the synthetic material tricalcium phosphate after its implantation in tibiae of rats. Twenty male rats, *Rattus norvegicus albinus Holtzman* were used; after anesthesia and asepsis, an incision of 15 mm was made in each rat leg, exposing the anterior region of the tibiae. Following, using a micromotor and a steel disc, a longitudinal fissure (15 x 2 mm) was made and a tricalcium phosphate paste dissolved in a physiological solution was applied in the treated side (right tibiae); no material was applied in the control side (left tibiae). The animals were killed after 10, 20, 30 and 45 days, the tibiae were removed and fixed in a Bouin solution for 72 hours, undergone a histological routine process to inclusion in paraffin and semi-serial cuts of 6 µm thick were made and stained with HE. In the analysis, it was not observed any inflammatory reaction at any time either in the control or treated groups, and the treated group showed a faster bone formation in the fissure than the control group.

Keywords: *Tricalcium phosphate (TCP); osseointegration; osteogenesis.*

Introdução

Um dos problemas mais desafiadores das áreas médica e odontológica é a pesquisa de material para substituição óssea, sendo utilizados diversos materiais biológicos e sintéticos no tratamento dos inúmeros defeitos ósseos, deformidades, lesões osteopáticas, etc. O ideal é que o material induza a osteogênese, seja biocompatível, atóxico, não-carcinogênico, de fácil obtenção no mercado e de baixo custo¹.

O tecido ósseo é um dos mais resistentes e rígidos do corpo humano. Como tecido próprio para suportar pressões, sucede à cartilagem, tanto na ontogênese quanto na filogênese; juntamente com o tecido cartilaginoso, pertence ao grupo dos tecidos conjuntivos de sustentação e é o principal constituinte do esqueleto atuando como suporte para as partes moles e protetor dos órgãos vitais contra traumas². As células que o compõem são os osteócitos, osteoblastos e os osteoclastos além do material intercelular calcificado, a matriz óssea³.

Nas fraturas ou em incisões cirúrgicas nos ossos, sempre ocorre hemorragia local pela lesão dos vasos sanguíneos do osso e do periósteo⁴. Observam-se também a destruição da matriz e a morte das células ósseas junto ao local fraturado e, para que ocorra a reparação, o coágulo sanguíneo e os restos celulares da matriz devem ser removidos; o periósteo e o endósteo próximos à área fraturada devem responder com uma intensa proliferação de seus fibroblastos e células osteoprogenitoras, que formarão um tecido rico em células, constituindo um colar ao redor da fratura e penetrando entre as extremidades ósseas rompidas. Algumas dessas células diferenciam-se em macrófagos e fagocitam os restos de tecidos e coágulo, onde posteriormente ocorrerá a neoformação óssea. Dessa forma, um material para implante ósseo deverá promover essa mesma seqüência de etapas e, de preferência, acelerá-las, segundo Harakas⁵.

Os materiais sintéticos para implantes ósseos são divididos em três grupos principais: metálicos, cerâmicos e polímeros. Dentre os materiais cerâmicos, os mais utilizados são à base de fosfato de cálcio, incluindo neste grupo a hidroxiapatita e o β -fosfato tricálcio como material de implante⁶. A hidroxiapatita, por ser o componente que constitui a maior parte mineral dos tecidos ósseos e dentes, representa um material substituto para o tecido ósseo com larga aplicabilidade⁷.

A aplicação de biomateriais apropriados para a reposição óssea é inerente às propriedades destes materiais; limitações mecânicas, físicas e químicas, assim como as propriedades biológicas, comprometem a utilização dos materiais; além disso, a dificuldade em determinar suas propriedades, bem como sua composição, tem complicado o desenvolvimento dos materiais para a substituição dos enxertos ósseos⁸.

Para o uso de um material com a finalidade de regeneração óssea, é necessário saber qual será seu desempenho in vivo.

Se o material for utilizado como substituto ósseo permanente, ele terá que desempenhar as funções protetoras e de suporte. Não é pré-requisito absoluto que este possua estrutura física ou química semelhante ao osso, mas propriedades mecânicas e físicas adequadas, estabilidade, capacidade de se incorporar ao tecido ósseo e ser de fácil manuseio clínico. Outro fator importante é que o material atue como matriz ou rede para o crescimento de um novo tecido ósseo⁷.

Outra característica que o material eleito deve ter é que seja reabsorvível e favoreça um novo remodelamento ósseo; essa reabsorção deve ser considerada nos aspectos da composição química do cristal e de sua estrutura como material. Deve-se levar em consideração que existem duas formas para que ocorra a reabsorção biológica: processo por dissolução intracelular, mediado pela solução fisiológica, e o processo de dissolução extracelular, que ocorre entre as partículas sintetizadas⁹.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do material sintético fosfato tricálcio (TCP) após implantação em tíbias de ratos.

Material e método

Foram utilizados 20 ratos machos, *Rattus norvegicus albinus Holtzman* de aproximadamente 200 g, divididos em dois grupos – controle (GC) e tratado (GT) –, sendo 10 animais/grupo. Na sala de cirurgia do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP, os animais foram anestesiados com o medicamento Francotar (0,08 mL.100 g⁻¹ do peso corporal; Virbac) associado ao relaxante muscular Virbaxyl 2% (0,04 mL.100 g⁻¹ do peso corporal; Virbac). Depois da assepsia e remoção dos pêlos na região anterior das tíbias dos animais, foi realizada uma incisão de 15 mm em cada perna, expondo a região anterior da tíbia, e, posteriormente, foi realizado o afastamento do periósteo.

Utilizando um micromotor e um disco de aço, foi realizada uma fissura longitudinal (15 x 2 mm) na qual foi colocada uma pasta à base de fosfato tricálcio (TCP), material este, sintetizado no laboratório do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, dissolvido em solução fisiológica e aplicada no GT (tíbia direita) e, no GC (tíbia esquerda), nenhum material foi aplicado. Posteriormente as incisões foram suturadas e os animais, transferidos para gaiolas isoladas. Sua recuperação foi acompanhada diariamente com as devidas condições de alimentação, água *ad libitum* e higiene. O analgésico pós-operatório utilizado foi o ácido acetil salicílico na dosagem de 120-300 mg.kg⁻¹ em dose única por via oral pós-efeito anestésico, como recomendado pela *Canadian Council on Animal Care* (CCAC). Depois de 10, 20, 30 e 45 dias os animais foram mortos, as tíbias removidas e fixadas em solução de Bouin por 72 horas. Posteriormente, as peças foram lavadas em água corrente,

descalcificadas por 60 dias em solução de Morse¹⁰ (partes iguais de citrato de sódio a 20% e ácido fórmico a 50%). Em seguida, passaram por várias lavagens em solução tampão fosfato de sódio (pH 7,0) e processadas segundo técnica rotineira para inclusão em parafina.

Foram realizados cortes semi-seriados de 6 μ m e corados em HE para a análise histológica descritiva, na qual foram consideradas presença de células inflamatórias e neoformação óssea. Em seguida, os cortes foram analisados e os selecionados, fotografados no fotomicroscópio de luz Jenaval-Zeiss, pertencente ao Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara.

A Pesquisa foi realizada de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovados pelo Comitê de Ética Experimental Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara -

UNESP em reunião de 4 de março de 2004, com protocolo nº 23/2002.

Resultado

Grupo tratado (GT)

Aos 10 dias (Figura 1a), observaram-se restos de tecido de granulação na região central da loja cirúrgica e a formação de pequenas trabéculas ósseas na sua periferia. Não foi observada reação inflamatória. Aos 20 dias (Figura 1b), o tecido ósseo neoformado, permeando amplos espaços medulares, ocupava praticamente toda a loja cirúrgica.

No período de 30 dias (Figura 2a), observou-se um avançado processo de reparação, o tecido ósseo apresentou espaços medulares definidos preenchendo a loja cirúrgica, a qual, aos 45 dias (Figura 2b), mostrou-se completamente reparada com tecido ósseo maduro.

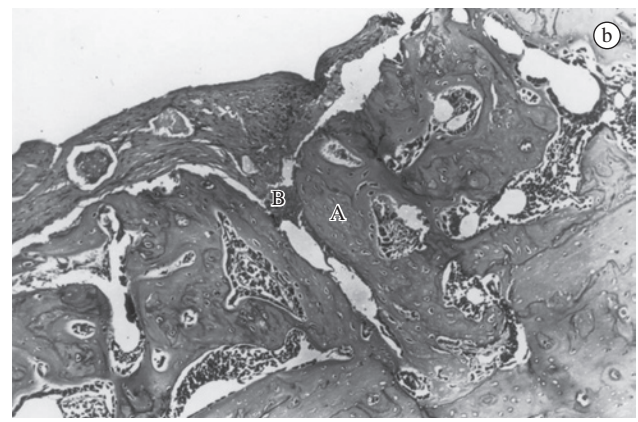
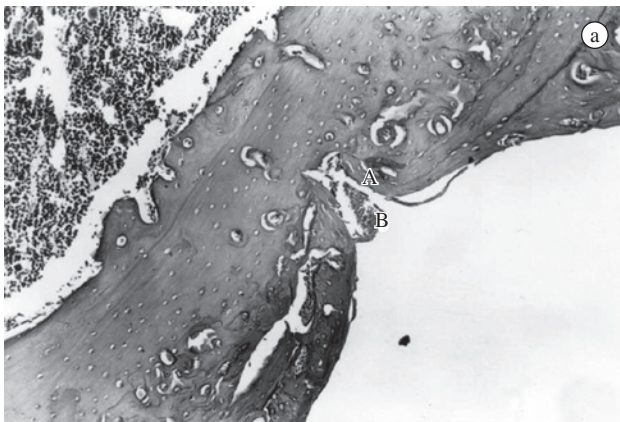


Figura 1. a, b) GT, 10 e 20 dias, respectivamente. Observa-se ausência de reação inflamatória e formação de tecido ósseo preenchendo a lesão cirúrgica (A) além de restos de tecido de granulação (B). HE, 125X.

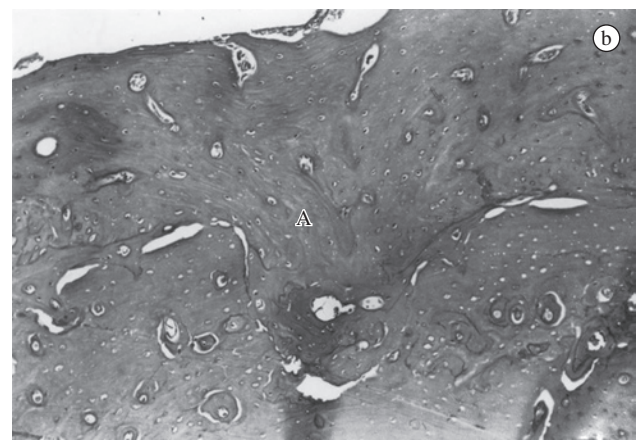
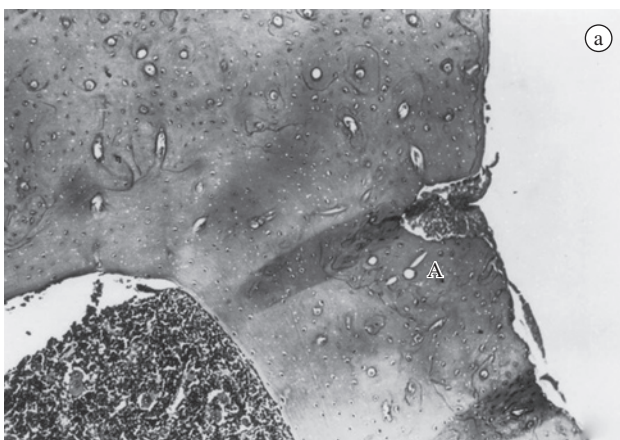


Figura 2. a, b) GT, 30 e 45 dias respectivamente. Observa-se o grande processo de reparação com presença de tecido neoformado (A), preenchendo praticamente toda loja cirúrgica (a) e reparação óssea completa (b) diante de contato direto do fosfato tricálcio com o osso. HE, 125X.

Grupo Controle (GC)

Aos 10 e 20 dias (Figuras 3a e 3b), a loja cirúrgica apresentou-se preenchida por tecido conjuntivo em desenvolvimento, com numerosos fibroblastos e, na região mais profunda da loja, observaram-se pequenas trabéculas ósseas neoformadas. Observou-se ausência de reação inflamatória.

No período de 30 dias (Figura 4a), a loja cirúrgica mostrou-se praticamente preenchida por tecido ósseo, formado em diferentes graus de maturação com espaços medulares pequenos e definidos. Aos 45 dias (Figura 4b), ocorreu a reparação total da loja cirúrgica com a presença de tecido ósseo maduro.

Discussão

Quando qualquer material de enxerto é inserido no corpo, torna-se rapidamente coberto por várias camadas de proteínas; as proteínas aderem à superfície do material e presumivelmente controlam, por meio de processos enzimáticos, a adesão inicial de células; determinando, portanto, o tipo de interface com o implante¹¹.

Depois da instalação de implantes endósseos, três possíveis respostas podem ocorrer nos tecidos do hospedeiro¹². Primeira, um processo inflamatório agudo ou crônico que pode resultar na perda precoce do implante. Segunda, uma encapsulação por tecido conjuntivo fibroso, resultando em falha da ancoragem óssea. Terceira, a resposta mais

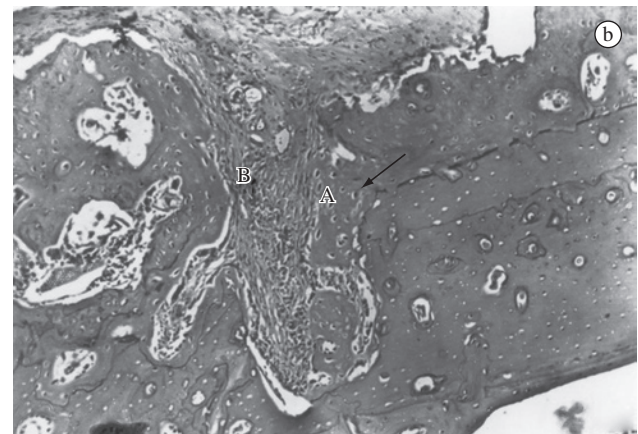
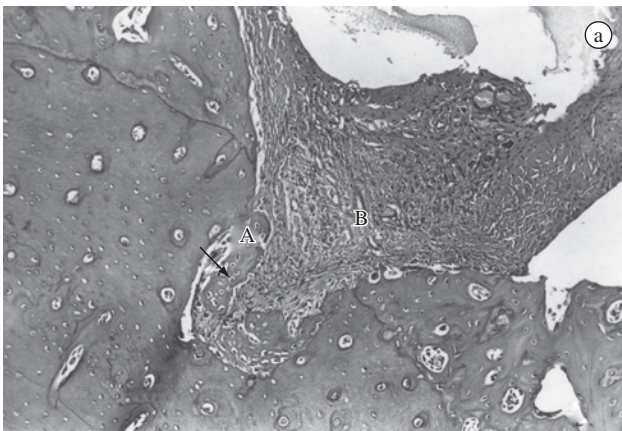


Figura 3. a, b) GC, 10 e 20 dias, respectivamente. Observa-se neoformação de tecido ósseo (A), com presença de osteócitos (cabeça de seta) e osteoblastos; proliferação de vasos e fibras colágenas (B). HE, 125x.

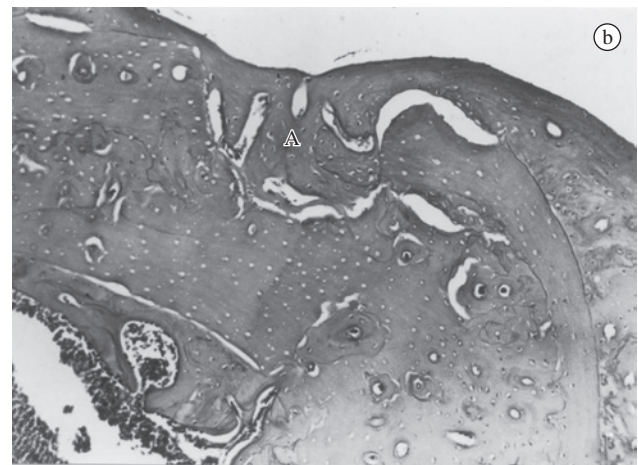
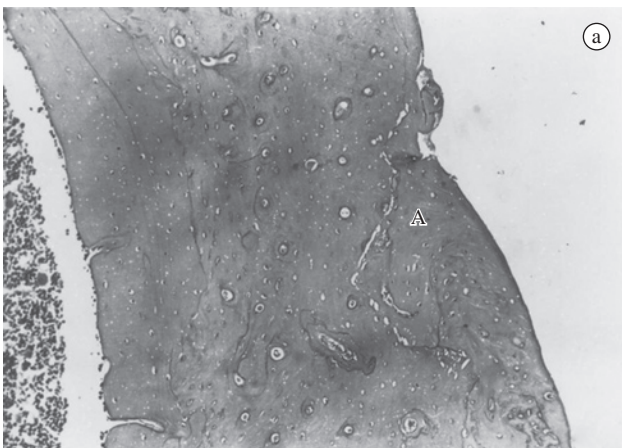


Figura 4. a, b) GC, 30 e 45 dias, respectivamente. Nota-se acentuada reparação óssea (A) na loja cirúrgica que se completa aos 45 dias. HE, 125x.

positiva, a formação de um tecido ósseo vivo em torno do implante, de forma previsível e duradoura, estabelecendo um contato mecânico que resulta na ancoragem do implante, denominada osseointegração. Segundo nossas observações, a evolução no processo de neoformação óssea apresentou ausência de reação inflamatória e a presença de inúmeros fibroblastos, osteoblastos e osteócitos, demonstrando um processo de reparação gradativo no decorrer dos períodos e um íntimo contato do tecido ósseo neoformado na loja cirúrgica criada, estando de acordo com a resposta mais positiva de osseointegração.

O grupo tratado apresentou capacidade de neoformação óssea mais acelerada quando comparado com o grupo controle até o período de 20 dias; depois deste período, os resultados são semelhantes, evidenciando que o fosfato tricálcio atuou como matriz ou como um retículo para o crescimento de um novo tecido ósseo; característica esta requerida para um bom material para implante⁷.

O material eleito para este estudo mostrou-se reabsorvível e resultou em um novo remodelamento ósseo; essa reabsorção deve ser considerada nos aspectos da composição química do cristal e de sua estrutura como material, concordando com as características imprescindíveis para a finalidade utilizada⁹.

Estudos experimentais sobre osseointegração devem começar com avaliações cuidadosas das características físicas dos implantes e, segundo Vidigal Jr et al.^{13,14}, estudos longitudinais em humanos e estudos em animais devem incluir uma avaliação quantitativa cuidadosa da percentagem de contato direto entre o osso e o substrato implantado, pois o termo osseointegração, sem levar em consideração a quantificação de contato direto osso-implante, poderia ser aplicado aos mais diversos materiais. Na realidade, se uma abordagem de quantificação fosse utilizada, poder-se-iam avaliar as diferenças das reações teciduais aos mais diversos materiais¹¹.

Uma interface implante-osso em que ocorra 100% de contato, na verdade, nunca se estabelece. Existe um consenso de que implantes osseointegrados, considerados bem-sucedidos, apresentam de 25 a 75% de contato ósseo (osseointegração), enquanto o restante da área é preenchido, por tecido não-mineralizado (vasos, nervos e tecido conjuntivo)¹¹. Em nosso estudo, ficou evidente o processo gradativo da reparação óssea, com um adequado preenchimento da loja cirúrgica, que pode ser visto a partir do período de 30 dias.

O periosteó possui fundamental importância no processo de reparação óssea, visto que oferece células capazes de se diferenciarem em células formadoras de tecido ósseo. Em alguns animais em que acidentalmente foi removido, não houve formação óssea.

São necessários mais estudos que demonstrem a capacidade osteoindutora do fosfato tricálcio (TCP), buscando desta forma aumentar as possibilidades de utilização de novos materiais para enxerto ósseo.

Conclusão

O fosfato tricálcio (TCP) apresentou biocompatibilidade quando em contato direto com o tecido ósseo; houve evolução no processo de neoformação óssea em todos os períodos; apresentou capacidade osteoindutora, mediante sua reabsorção com conseqüente neoformação óssea.

Referências

1. Naaman Bou-Abboud N, Patat JL, Guillemin G, Issahakian S, Forest N, Ouatoun JP. Evaluation of the osteogenic potential of biomaterials implanted in the palatal connective tissue of miniature pigs using undecalcified sections. *Biomaterials*. 1994;15:2001-7.
2. Ceschin JR. Fisiologia dos implantes. In: Ceschin JR. O implante na reabilitação bucal. São Paulo: Panamed; 1984. p. 273-303.
3. Maas C, Merwin G, Wilson J, Frey D, Maves M. Comparison of biomaterials for facial bone augmentation. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1990;116:551-6.
4. Dalcusi G, Legeros RZ, Nery E, Lynch K, Kerebel B. Transformation of biophasic calcium phosphate ceramics in vivo: ultrastructural and physicochemical characterization. *J Biomed Mater Res*. 1989;23:883-94.
5. Harakas NK. Demineralized bone matrix- induced osteogenesis. *Clin Orthop Rel Res*. 1984;188:239.
6. Moretti EA, Gómez GF, Patterson F, Mario P, Alonso E, Fodor M, et al. Evaluación experimental de diferentes sustitutos óseos en calota craneana de conejos albinos NZ/ Experimental assessment of several bone substitutes in NZ albino rabbits skull. *Rev Argent Cir Plast*. 1997;3:24-32.
7. Zenóbio EG, Marcantonio RAC, Marcantonio Jr E, Ferreira BA, Okamoto T. Avaliação do comportamento biológico de dois materiais sintéticos à base de fosfato de cálcio após a implantação em alvéolos de cães. *Rev Odontol UNESP*. 1998;27:73-85.
8. De Groot K. Ceramic of calcium phosphates: preparation and properties. *Bioceramics of calcium phosphate*. Boca Raton: CRC Press; 1983
9. Romero M, Yazmín D. Valoración clínica e histológica y radiográfica del mantenimiento del reborde alveolar utilizando membrana de colágeno y/o injertos oseos. *Bogotá*; 1993.
10. Morse A. Formic acid-sodium citrate descalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bones for sectioning in paraffin. *J Dent Res*. 1945;143-53.
11. Albrektsson T, Sennerby L. Direct bone anchorage of oral implants: clinical and experimental considerations of the concept of osseointegration. *Int J Prosthodont*. 1990;3:30-41.
12. Krauser JT. Hidroxyapatite-coated dental implants.

- Biologic rationale and surgical technique. *Dent Clin North Am.* 1989;33:879-903.
13. Vidigal Jr GM, Avillez RR, Groisman M, Pinto VS. Análise de três diferentes implantes osseointegrados. *Rev Assoc Paul Cir Dent.* 1993;47:1135-9.
14. Vidigal GM, Novaes AB, Chevitarese O, de Avillez RR, Groisman M. Evaluation of the implant-connection interface using scanning electron microscopy. *Braz Dent J.* 1995;6:17-23.