

# Avaliação microscópica e morfométrica da biocompatibilidade da zinco apatita 1%

Mônica Diuana Calasans-Maia, e-mail: [monicacalasans@terra.com.br](mailto:monicacalasans@terra.com.br)

Adriana Terezinha Neves Novellino Alves, e-mail: [adrianaterezinha@globo.com](mailto:adrianaterezinha@globo.com)

Alexandre Malta Rossi, e-mail: [rossi@cbpf.br](mailto:rossi@cbpf.br)

Fábio de Oliveira Ascoli, e-mail: [fabiooascoli@yahoo.com.br](mailto:fabiooascoli@yahoo.com.br)

José Mauro Granjeiro, e-mail: [jmgranjeiro@gmail.com](mailto:jmgranjeiro@gmail.com)

## Introdução

A hidroxiapatita (HA) sintética é um biomaterial à base de fosfato de cálcio osteocompatível, osteocondutor, osseoindutor e ossointegrável, capaz de auxiliar o reparo ósseo. Ainda, pode atuar como arcabouço carreador de células osteogênicas na bioengenharia óssea visando minimizar ou eliminar o auto-enxerto como alternativa terapêutica. As propriedades estruturais da HA podem ser alteradas pela incorporação de cátions bivalentes, Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> e Cd<sup>2+</sup>, ou trivalentes, La<sup>3+</sup>, Y<sup>3+</sup>, In<sup>3+</sup> e Bi<sup>3+</sup>, cuja liberação gradual favoreceria o reparo ósseo (Mg<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup>) ou serviria como um modelo *in vivo* de toxicidade a metais pesados (Pb<sup>2+</sup> e Cd<sup>2+</sup>). O zinco é um elemento traço importante presente no osso, capaz de aumentar a mineralização tanto *in vitro* como *in vivo*. Demonstrou-se que a hidroxiapatita dopada com 2 mol% de Zn<sup>2+</sup>, aumentou significativamente a adesão osteoblástica quando comparada a HA não dopada. Posteriormente, verificou-se que incorporações entre 0,6 e 1,2% de Zn<sup>2+</sup> no composto de β-tricalcio fosfato/HA promoveram a proliferação de osteoblastos. O objetivo deste estudo foi avaliar histomorfométricamente a zinco apatita (ZnHA 1%) e a hidroxiapatita no reparo ósseo de tibia de coelhos.

## Material e métodos

Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa animal nº 195/06 (HUAP). Foram utilizados quinze coelhos da raça Nova Zelândia Branca, de ambos os sexos, pesando entre 2.500 e 3.000g, provenientes do Laboratório de Produção de Coelhos (LPC, Fazenda Escola da Faculdade de Veterinária da UFF, Cachoeiras de Macacu). Os materiais (HA e ZnHA 1%) foram produzidos no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, foram implantados sob a forma de cilindros compactados em ambas as tíbias de cada animal.

Os animais receberam como medicação pré-anestésica 20mg de Quetamina e 1 mg de Xilazina, por via intramuscular trinta minutos antes do procedimento. Após observar-se ausência de reflexos à dor, os animais receberam isoflurane 1% como medicação anestésica geral inalante durante o procedimento e 0,3mg/Kg de Lidocaína e 0,1 mg/kg de morfina, por via raqui-medular.

Seguindo-se à tricotomia e anti-sepsia, uma incisão de aproximadamente 40 mm de comprimento foi realizada sobre cada tibia. Após a exposição óssea cada osso foi perfurado em 2 locais diferentes com broca de 2 mm em rotação baixa e intermitente. Os planos profundos e

superficiais foram suturados com fio monofilamentado de Náilon 4.0. Todos os animais receberam antibioticoterapia e antiinflamatório em dose única no pós-operatório imediato. Decorridos os períodos experimentais de 1, 2 e 4 semanas, cinco animais de cada grupo experimental foram retirados aleatoriamente e anestesiados como descrito acima e mortos com injeção intramuscular de pentobarbital sódico (60mg/Kg).

Removeu-se das tíbias um bloco (margem de 5 mm) contendo um cilindro de cada material. Um par de blocos (HA e ZnHA) foi submetido à fixação em formol 10% tamponado (48 horas), lavagem com água corrente (12 horas), desmineralização em solução descalcificadora de ossos da Allkimia® (12 horas). Em seguida, cada bloco contendo um cilindro foi clivado transversalmente ao longo eixo do implante em 3 segmentos, sendo as peças submetidas ao processamento histológico padrão do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário Antônio Pedro (SAP-HUAP) da UFF para inclusão em parafina. Cortes semi-seriados de 6µm de espessura foram corados com Hematoxilina-Eosina.

O outro par de blocos foi fixado em álcool 70% e processado para inclusão em resina de acordo com o protocolo do SAP-HUAP. Cortes de 50 µm de espessura foram corados com Tricrômio de Masson e cortes de 200 µm não corados foram analisados pela microscopia de luz, pelo Infra-vermelho com transformada de Forrier e pela microscopia eletrônica de varredura (MEV). Cortes semi-finos de 2 µm de espessura foram corados com Azul de Toluidina e Fuccina Básica e cortes ultra finos de 70 nm foram analisados pela microscopia eletrônica de transmissão (MET). O estudo duplo-cego foi avaliado por um observador com experiência e as seguintes respostas foram analisadas: presença de infiltrado inflamatório, presença de osso neoformado, biocompatibilidade e osteocondução dos materiais.

## Resultados

A caracterização física e química dos pós de HA e ZnHA antes da implantação permitiu constatar que os materiais apresentaram fase única, alta cristalinidade, relação Ca/P de 1,66 e 1,54, respectivamente, e incorporação de 0,003 mol % de zinco na HA. Através do MEV observamos antes da implantação discretas fissuras na superfície de ambos materiais.

A análise microscópica do tecido descalcificado evidenciou, no período de 7 dias e na superfície cortical óssea, que no grupo ZnHA não houve neoformação óssea, presença de exsudato hemorrágico e proliferação

fibroblástica. No grupo HA notou-se leve neoformação óssea e proliferação fibroblástica. No grupo HA, após 14 dias, observou-se discreta neoformação óssea em torno do cilindro, pouca reabsorção óssea. Nos dois grupos, observou-se comparativamente ao período anterior, maior quantidade de osso neoformado com áreas de tecido conjuntivo. No período de 28 dias, foram observadas trabéculas largas de osso neoformado, sem resposta inflamatória e com poucas áreas de reabsorção óssea no grupo HA. No grupo ZnHA eram evidentes áreas de neoformação óssea com trabéculas ósseas anastomosando-se entre si, presença de osso com numerosos osteócitos e pavimentação osteoblástica.

Nos cortes descalcificados, foram realizadas duas análises quantitativas de histomorfometria com o auxílio do programa Image Pró-plus®. Para a histomorfometria por contagem de pontos, quatro imagens foram capturadas com o aumento de 4 vezes e realinhadas através do programa "Multiple Image Alignment"(MIA), sobre essa imagem foi aplicada uma grade com cem pontos. Osso neoformado, biomaterial, tecido conjuntivo e osso nativo do animal foram quantificados através desse programa que mostrou no grupo da HA uma área maior de osso neoformado ( $p=0,039$ ) quando comparado ao grupo da ZnHA aos 7 dias, porém nenhuma diferença foi observada entre os grupos aos 14 e 28 dias ( $p>0,05$ ). Em ambos os grupos as áreas de osso neoformado aumentou dos 7 aos 14 dias ( $p<0,05$ ) estabilizando depois até o final do experimento e concomitante ao aumento da área óssea observamos a significativa diminuição do tecido conjuntivo ( $p<0,05$ ). Para a realização da outra análise histomorfométrica, oito campos de cada lâmina foram capturados e analisados através da densidade de volume por delineamento das áreas de interesse. Osso neoformado e tecido conjuntivo foram quantificados em  $\mu\text{m}^2$  na interface da cortical óssea e do cilindro. Analisando a osteogênese na interface o grupo da HA mostrou uma área de osso neoformado maior que a área do grupo zinco apatita aos 7 dias ( $p<0,05$ ), mas nenhuma diferença foi observada entre os grupos aos 14 e 28 dias ( $p>0,05$ ). Em ambos os grupos, a área de osso neoformado entre 7 e 14 dias não foi significativa ( $p>0,05$ ), porém dos 7 aos 28 dias foi muito significativa ( $p<0,01$ ). Entre os períodos de 14 e 28 dias, a área de osso neoformado foi significativa para o grupo da HA ( $p<0,05$ ) e não significativa para o grupo ZnHA ( $p>0,05$ ). A microscopia ótica de campo claro e com luz polarizada dos cortes não descalcificados mostrou a formação de osso da margem óssea da interface em direção ao cilindro.

## Discussão

O presente estudo avaliou a resposta óssea da zinco apatita em comparação a hidroxiapatita *in vivo*. Esse modelo animal associado ao defeito cirúrgico não crítico permite a avaliação da biocompatibilidade, presença de resposta inflamatória e capacidade osteocondutora desses materiais, porém não revela o seu potencial osseointegrador. Contudo, o presente estudo mostrou resultados com pequeno percentual de formação óssea em torno dos cilindros, provavelmente

isso se deve a coincidência dos diâmetros da perfuração e do cilindro (2 mm), promovendo uma pequena superfície de contato do osso com o material. A resposta da zinco apatita aos 7 dias pode ter sido influenciada pelas características do biomaterial, que na análise de microscopia de transmissão mostrou ser um material mais poroso que a hidroxiapatita, porém aos 14 dias ambos os materiais mostraram resposta favorável com osso neoformado em torno dos implantes e aos 28 dias o espaço entre osso e cilindro apresentaram formação óssea quase na totalidade do espaço e já com áreas de remodelamento ósseo. Na análise microscópica de campo claro observamos a formação do osso sempre da periferia do defeito cirúrgico em direção ao cilindro. Na microscopia de luz polarizada observamos aos 7 dias no grupo da HA e aos 14 dias em ambos os grupos diferentes direções das fibras de colágeno, caracterizando um osso imaturo e recém formado. Aos 28 dias já observamos uma direção mais paralela entre essas fibras, mostrando que nesse período essa região já se apresenta com características de osso secundário com áreas de remodelamento ósseo.

## Conclusões

Não houve diferença significativa entre os grupos estudados quanto a absorção dos biomateriais nos três períodos estudados, aos 7 dias houve uma significativa diferença entre os grupos quanto a formação de osso, nos períodos de 14 e 28 dias não houve diferença significativa entre os grupos estudados quanto a neoformação óssea e houve alteração na composição química do material 28 dias após a sua implantação. Os materiais estudados foram osteocompatíveis, osteocondutores e não promoveram resposta inflamatória na superfície da cortical óssea.

## Descritores

Hidroxiapatita, zinco apatita, reparo ósseo, coelhos, biocompatibilidade.

## Referências

1. Kawamura, H, Muramatsu, T, Miyakawa, S, Ochiai, N, Ito, A, Tateishi, T. Long-term implantation of zinc-releasing calcium phosphate ceramics in rabbit femura. J Biomed Mater Res A. 65, 468-474, 2003.
2. Rosa A L, Beloti M.M., De Oliveira P.T, Van Noort R. Osseointegration and osseoconductivity of hydroxyapatite of different microporosities. J Mater Sci Mater Med. 13, 1071-1075, 2002.
3. Sogo Y, Sakurai T, Onuma K, Ito A. The most appropriate (Ca+Zn)/P molar ratio to minimize the zinc content of ZnTCP/HAP ceramic used in the promotion of bone formation. J Biomed Mater Res. 62,457-463, 2002.
4. Webster, T J, Massa-Schlueter, E A, Smith, J L, Slamovich, E B. Osteoblast response to hydroxyapatite doped with divalent and trivalent cations. Biomaterials. 25, 2111-2121, 2004.