

IMPLANTES DE BIOMATERIAIS EM FALHA ÓSSEA PRODUZIDA NA FÍBULA DE RATOS

BIOMATERIAL IMPLANTS IN BONE FRACTURES PRODUCED IN RAT FIBULAS

Henrique Yassuhiro Shirane¹, Diogo Yochizumi Oda¹, Thiago Cerizza Pinheiro², Marcelo Rodrigues da Cunha³

RESUMO

Objetivo: Avaliar a importância do colágeno e hidroxiapatita na regeneração de fraturas provocadas experimentalmente na fíbula de ratos. **Métodos:** Utilizou-se 15 ratos nos quais foram submetidos à cirurgia para retirada de um fragmento da fíbula sendo o local enxertado com tubos de silicone preenchidos com hidroxiapatita e colágeno. **Resultados:** Ocorreu pouca neoformação óssea no interior dos tubos preenchidos com os biomateriais sendo em maior quantidade naqueles com colágeno. **Conclusão:** Os biomateriais usados apresentaram biocompatibilidade e capacidade osteocondutora capaz de estimular a osteogênese mesmo nos ossos com funções mecânicas e morfológicas secundárias como a fíbula de ratos.

Descritores – Durapatita; Fíbula; Colágeno; Osteogênese

ABSTRACT

Objective: To evaluate the importance of collagen and hydroxyapatite in the regeneration of fractures experimentally induced in the fibulas of mice. **Method:** 15 rats were submitted to a surgery for the removal of a fragment of the fibula. The fragment was replaced by a silicone tube filled with hydroxyapatite and collagen. **Results:** Little bone neoformation occurred inside the tubes filled with biomaterials, the largest amount occurring in those with collagen. **Conclusion:** The biomaterials used demonstrated biocompatibility and osteoconductive capacity capable of stimulating osteogenesis, even in bones with secondary mechanical and morphological functions such as the fibula of the rat.

Keywords – Durapatite; Fibula; Collagen; Osteogenesis

INTRODUÇÃO

As fraturas traumáticas têm aumentado consideravelmente nos últimos anos decorrentes principalmente de acidentes automobilísticos assim como de patologias que afetam o metabolismo ósseo⁽¹⁾. Desse modo, o estudo de diferentes tratamentos ortopédicos para estimular e acelerar a regeneração óssea vem sendo amplamente pesquisados. Dentre eles, destaca-se o uso de enxertos ósseos fundamentais naqueles casos clínicos de fraturas cominutivas ou explosivas nos quais possa haver a necessidade da utilização do enxerto em função da perda considerável de massa óssea conforme a energia do trauma ou gravidade da patologia óssea.

Como alternativa ao reparo dessas fraturas, podendo ou não ser associada aos enxertos ósseos autógenos ou demais fatores indutores da osteogênese, também se destacam a utilização de biomateriais, pelas suas propriedades osteogênicas, e a biocompatibilidade, além da facilidade de confecção em vista do avanço da engenharia de tecidos. Assim sendo, a hidroxiapatita e o colágeno são alguns dos vários materiais que vêm recebendo atenção especial em diversas pesquisas na busca dos implantes sintéticos ideais para a osteocondução, biocompatibilidade e resistência biomecânica durante o processo de reparo dos defeitos ósseos ou regeneração das fraturas⁽²⁻¹⁰⁾.

1 – Acadêmico de Medicina do 3º ano da Faculdade de Medicina de Jundiaí, SP, Brasil.

2 – Acadêmico de Medicina do 4º ano da Faculdade de Medicina de Jundiaí, SP, Brasil.

3 – Professor Doutor Adjunto do Departamento de Morfologia e Patologia Básica na Disciplina de Anatomia de Faculdade de Medicina de Jundiaí, SP, Brasil.

Trabalho desenvolvido no Departamento de Morfologia e Patologia Básica da Faculdade de Medicina de Jundiaí, SP, Brasil.

Correspondência: Prof. Dr. Marcelo Rodrigues Cunha, Rua Francisco Telles, 250, Vila Arens I – 13202-550 – Jundiaí, SP. Email: cunhamr@hotmail.com

Declaramos inexistência de conflito de interesses neste artigo

A hidroxiapatita tem boa condutibilidade óssea, a qual influencia na sua velocidade de reabsorção, sendo regulada principalmente pela porosidade do material⁽¹¹⁾. O contato direto e estável desse biomaterial com o osso estimula a osteogênese e, portanto, a sua osteointegração⁽¹²⁾. Nandi *et al*⁽¹³⁾ realizaram um estudo para avaliar a eficiência da hidroxiapatita porosa em defeitos ósseos criados na diáfise de rádio de cabras e observaram boa formação óssea e revascularização na área enxertada com hidroxiapatita, confirmando assim a propriedade osteocondutora biológica natural deste material.

As indicações para o uso da hidroxiapatita direcionam-se para as correções de defeitos craniomaxilofaciais, traumatismos, deformidades congênicas e também pode ser utilizado na medicina estética^(14,15). Outras substâncias que merecem atenção são os polímeros naturais, que têm sido usados em numerosas aplicações⁽¹⁶⁾.

Polímeros naturais como o colágeno, além de sua biocompatibilidade, participam no controle da estrutura do tecido e na regulação do fenótipo celular simulando a matriz extracelular. O colágeno é a proteína fibrosa mais abundante no organismo humano, representando 25 a 30% da massa total de proteínas nos mamíferos. Como o colágeno é o principal composto orgânico do tecido ósseo, ele vem sendo amplamente usado na fabricação de biomateriais⁽¹⁷⁾.

A biocompatibilidade e estabilidade do colágeno, devido às características biológicas de biodegradável, bioabsorvível, apresentar debilidade antigênica, além de poder ser manipulado facilmente em diferentes formas, torna-o um recurso fundamental à aplicação médica⁽¹⁸⁾. Takaoka *et al*⁽¹⁹⁾ utilizaram colágeno de osso desmineralizado juntamente com hidroxiapatita no tratamento de defeitos ortopédicos congênicos e adquiridos. Nos seus resultados, notaram que o colágeno de osso desmineralizado enxertado em combinação com a hidroxiapatita foi um excelente material osteoindutivo associado à BMP (proteína morfogenética óssea).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade osteocondutora da hidroxiapatita e colágeno no processo de reparo ósseo em defeitos provocados pela remoção de parte do terço médio da fíbula de rato.

MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 15 ratos albinos (*Rattus norvegicus*) Wistar, adultos, pertencentes ao Biotério da Faculdade

de Medicina de Jundiaí. Os animais foram separados da seguinte maneira:

Grupo TS: animais que receberam o tubo de silicone vazio no defeito criado na fíbula;

Grupo TH: animais que receberam o tubo de silicone preenchido com hidroxiapatita no defeito criado na fíbula; e

Grupo TC: animais que receberam o tubo de silicone preenchido com colágeno no defeito criado na fíbula.

Procedimento cirúrgico

Inicialmente, os animais foram pesados e anestesiados com solução de Ketamina (Francotar) e Cloridrato de Xylazina (Virbaxyl 2%) na proporção de 1:1 e na dose de 0,10ml/100gramas de corpórea por via intramuscular. Os animais foram colocados em decúbito dorsal e realizou-se uma incisão longitudinal na pele da região anterolateral da perna esquerda. A musculatura foi afastada de modo a expor a fíbula. Com o auxílio de materiais cirúrgicos, foi realizada uma falha através da retirada de aproximadamente 2mm do terço médio da fíbula. No local desta falha foram colocados tubos de silicone.

Estudo radiológico

Após oito semanas do implante, os animais foram sacrificados e os ossos da perna submetidos à radiografia usando o aparelho FUNK-X10 com ponto focal de 0,8 x 0,8mm e filmes radiográficos Kodak medindo 4,4 x 3,3cm.

Estudo histológico

As amostras foram submetidas aos métodos histológicos de fixação, descalcificação e confecção das lâminas com cortes semisseriados longitudinais na área do defeito ósseo preenchidos com tubos de silicone.

Estudo morfométrico

A quantificação do osso neoformado foi realizada através da estereologia de acordo com o princípio de Delesse (Mandarim de Lacerda, 1999). Usou-se a seguinte fórmula $V_V = P_P/P_T(\%)$, onde:

V_V = densidade de volume ou volume relativo;

P_P = quantidade de pontos (intersecção de linhas) sobre o osso neoformado; e

P_T = número total de pontos do sistema.

Através de um retículo quadrilátero de 100 pontos e acoplado na ocular do microscópio de luz Carl Zeiss, calculou-se a densidade do volume ósseo neoformado

na área do implante dos tubos de silicone e a partir da extremidade do fragmento da fíbula. Esta análise foi feita com a objetiva do microscópio de luz padronizada em aumento de 4x.

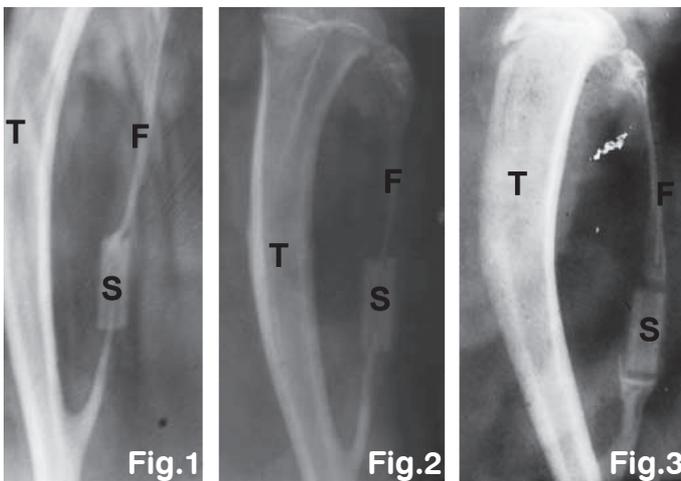
Estudo estatístico

A técnica utilizada na análise dos dados morfométricos foi o estudo de três amostras independentes e médias paramétrica pelo método de Watson-Williams.

RESULTADOS

Análise radiológica

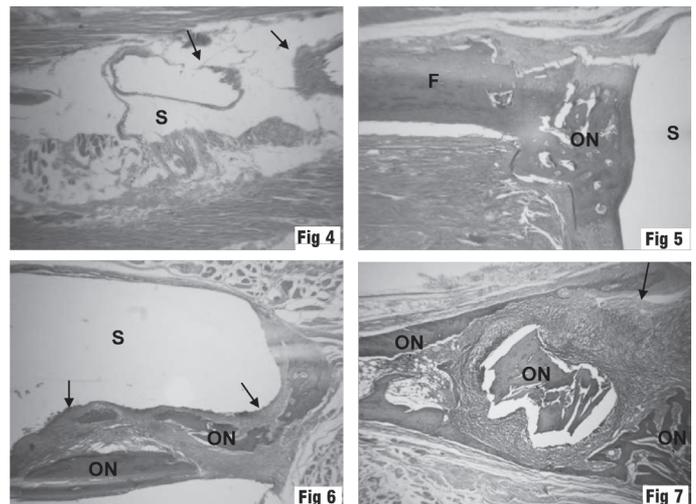
Nos animais do grupo TS, TH e TC presenciou-se boa interação do tubo de silicone com os tecidos circunvizinhos devido à imagem radiopaca nítida do contorno do tubo e nenhum sinal radiológico de alteração patológica (Figuras 1, 2 e 3).



Figuras 1, 2 e 3 – Grupos TS, TH e TC, respectivamente. Nota-se a radiopacidade do tubo de silicone implantado (S). Indicados: tíbia (T) e fíbula (F).

Análise histológica

Nos animais do grupo TS notou-se que o interior do tubo de silicone foi preenchido parcialmente por tecido conjuntivo sem indícios de neoformação óssea (Figura 4). Além disso, ocorreu uma proliferação do tecido ósseo a partir do fragmento da fíbula em direção à extremidade do tubo implantado (Figura 5). Nos animais do grupo TH e TC observaram-se, além de tecido conjuntivo, áreas de neoformação óssea no interior do tubo de silicone, além de osso jovem crescendo a partir da extremidade do fragmento da fíbula (Figuras 6 e 7).



Figuras 4 e 5 – (Grupo TS), 6 (TH) e 7 (TC). Na Figura 4 nota-se a presença de tecido conjuntivo (setas) no interior do tubo de silicone (S) e na Figura 5 presencia-se a projeção de osso neoformado (ON) a partir do fragmento da fíbula (F) em direção à extremidade do tubo de silicone, mas sem indício de osso neoformado no interior desses tubos. Nas **Figuras 6 e 7** observa-se tecido conjuntivo (setas) e áreas de neoformação óssea (ON) no interior dos tubos de silicone preenchidos com biomateriais.

Análise morfométrica e estatística

Na quantificação do percentual de osso neoformado na área do implante, notaram-se valores maiores para os grupos TH (10,2%) e TC (13,4%) comparados com o grupo TS (2,6%). Estatisticamente, os valores entre os grupos foram diferentes ($p < 0,05$) (Figura 8).

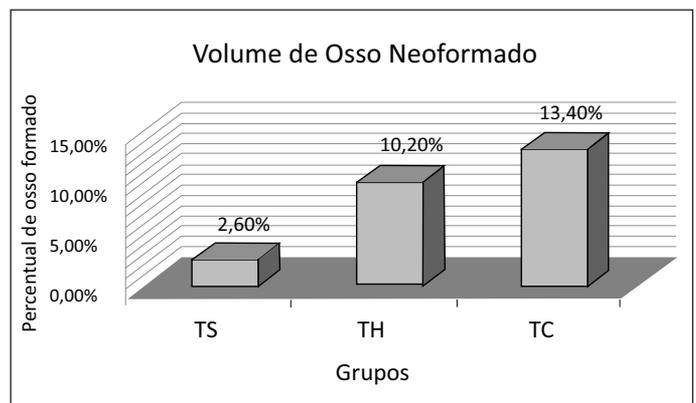


Figura 8 – Percentual de osso neoformado nos grupos TS, TH e TC.

DISCUSSÃO

As limitações clínicas do uso de enxertos ósseos autógenos em fraturas com perda óssea levaram diversos estudos a avanços na área de engenharia de tecidos e biomateriais com o objetivo de fabricar materiais sintéticos capaz de promover rapidez na osteogênese, in-

corporação com o tecido ósseo através da estimulação osteocondutiva e osteoindutiva, não gerar complicação de rejeição associada ao seu uso como fator essencial de biocompatibilidade além de oferecer resistência biomecânica no local do implante⁽²⁰⁾. Atendendo a essas exigências, a hidroxiapatita e o colágeno vêm recebendo considerável atenção no campo da cirurgia plástica, ortopédica e odontológica⁽²¹⁾.

Duarte *et al*⁽²²⁾ usaram a hidroxiapatita sintética em defeito no processo alveolar da mandíbula de cães e observaram intensa proliferação de osteoblastos e neovascularização na presença do implante. Camilli *et al*⁽²³⁾ implantaram hidroxiapatita subperiostealmente no fêmur de ratos e observaram boa neoformação óssea na área do implante além da biocompatibilidade. Resultados semelhantes também foram descritos por Pinheiro *et al*⁽²⁴⁾ ao implantarem hidroxiapatita em falha óssea criada experimentalmente no terço distal de ratos. Cunha *et al*⁽⁸⁾ implantaram colágeno em defeitos no fêmur de ratas e notaram bom fechamento da área devido à intensa quantidade de osso formado e também concluíram através de ensaios biomecânicos, que a área regenerada apresentava com boa qualidade mecânica.

Além da importância da biocompatibilidade e capacidade osteocondutora dos implantes de biomateriais no processo de regeneração óssea, também é fundamental a qualidade mecânica e o tipo de ossificação embriológica do osso. Camilli *et al*⁽²³⁾ observaram que o fêmur, osso endocondral, respondeu melhor ao implante de hidroxiapatita do que a calota craniana na qual origina-se a partir de uma ossificação membranosas. Raab *et al*⁽²⁵⁾ afirmaram que a função mecânica do osso influencia na resistência e na formação do tecido ósseo. Sendo assim, nota-se na literatura que a maioria dos trabalhos com biomateriais usaram fêmur e tíbias de ratos devido à sua boa capacidade biomecânica e origem endocondral importante para a função osteogênica do osso⁽⁸⁻²⁹⁾.

Quanto à fibula de ratos, nota-se que ela apresenta particularidades morfológicas, pois o eixo da diáfise distal da tíbia se funde com a fibula pós-natal, um processo iniciado pelo sétimo dia com a formação de cartilagem secundária que subsequentemente é substituído por ossificação endocondral. Assim, a fibula apresenta baixa qualidade e importância biomecânica⁽³⁰⁾. É definido que a fibula apresenta um papel recíproco em regular o crescimento da tíbia do rato. A baixa

influência biomecânica da fibula, mesmo pela baixa ação da gravidade em que é submetida, pode interferir na consolidação das fraturas pela sua insuficiente função angiogênica e osteogênica⁽³¹⁾.

Mediante aos fatores anatômicos da fibula citados anteriormente, podemos notar em nossa pesquisa que a quantidade de osso formado no interior dos tubos com biomateriais implantados na falha óssea da fibula dos ratos foi em pequena quantidade frente aos resultados descritos na literatura usando fêmur e tíbia. Além disso, não houve neoformação óssea no interior dos tubos vazios implantados. Tal fato pode ter ocorrido levando-se em consideração a função biomecânica secundária da fibula pela sua fusão na tíbia e conseqüentemente a sua baixa função angiogênica e osteogênica. Com estas características morfológicas da fibula, sugere-se que o tempo de implante adotado nessa pesquisa até o momento do sacrifício dos animais foi insuficiente para o processo completo de osteocondução dos biomateriais.

Apesar da baixa neoformação óssea na área do implante, podemos notar, através dos dados radiológicos, que não houve rejeição ao tipo de biomaterial utilizado sugerindo a biocompatibilidade assim como descritos por outros pesquisadores que usaram os mesmos implantes⁽³²⁻³⁵⁾.

CONCLUSÃO

Os biomateriais utilizados têm a capacidade osteocondutora mesmo observando-se uma baixa neoformação óssea em nossa pesquisa. Entretanto, outros fatores como a embriologia, tipo de ossificação, morfologia e biomecânica do osso em estudo são fundamentais no processo de osteogênese. Assim há a necessidade de elaborar um protocolo de experimentação mais padronizado e embasado cientificamente nos casos daqueles ossos, como a fibula de ratos, que ainda não tem qualidades biológicas e parâmetros mecânicos bem definidos sendo fatores que interferem diretamente nos resultados esperados quanto ao processo de regeneração óssea.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) o apoio financeiro referente à bolsa de iniciação científica dado para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- Alonso JE, Lee J, Burgess AR, Browner BD. The management of complex orthopedic injuries. *Surg Clin North Am.* 1996;76(4):879-903.
- Murata M, Huang BZ, Shibata T, Imai S, Nagai N, Arisue M. Bone augmentation by recombinant human BMP-2 and collagen on adult rat parietal bone. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1999;28(3):232-7.
- Pinilla M, Ramírez-Camacho R, Salas C, González F, López-Cortijo C, Vergara J. Development of interface in hydroxyapatite implanted in the middle ear of the rat: a light and scanning microscopy study. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003;128(1):124-31.
- Bombonato-Prado KF, Brentegani LG, Thomazini JA, Lachat JJ, Carvalho TL. Alcohol intake and osseointegration around implants: a histometric and scanning electron microscopy study. *Implant Dent.* 2004;13(3):238-44.
- Rammelt S, Schulze E, Witt M, Petsch E, Biewener A, Pompe W, Zwipp H. Collagen type I increases bone remodelling around hydroxyapatite implants in the rat tibia. *Cells Tissues Organs.* 2004;178(3):146-57.
- Itoh S, Nakamura S, Kobayashi T, Shinomiya K, Yamashita K, Itoh S. Effect of electrical polarization of hydroxyapatite ceramics on new bone formation. *Calcif Tissue Int.* 2006;78(3):133-42.
- Reikerås O, Johansson CB, Sundfeldt M. Hydroxyapatite enhances long-term fixation of titanium implants. *J Long Term Eff Med Implants.* 2006;16(2):165-73.
- Cunha MR, Santos AR Jr, Goissis G, Genari SC. Implants of polyanionic collagen matrix in bone defects of ovariectomized rats. *J Mater Sci Mater Med.* 2008;19(3):1341-8.
- Schwartz Z, Doukarsky-Marx T, Nasatzky E, Goultzschin J, Ranly DM, Greenspan DC, et al. Boyan BD. Differential effects of bone graft substitutes on regeneration of bone marrow. *Clin Oral Implants Res.* 2008;19(12):1233-45.
- Kawai T, Anada T, Honda Y, Kamakura S, Matsui K, Matsui A, et al. Synthetic octacalcium phosphate augments bone regeneration correlated with its content in collagen scaffold. *Tissue Eng Part A.* 2009;15(1):23-32.
- Ravaglioli A, Krajewski A, Biasini V, Martinetti R, Mangano C, Venini G. Interface between hydroxyapatite and mandibular human bone tissue. *Biomaterials.* 1992;13(3):162-7.
- Zaffe D. Interfacial study of some inert and active ceramics implanted in bone. In: Ravaglioli A, Krajewski A, editors. *Bioceramics and the human body.* London: Elsevier; 1991.
- Nandi SK, Kundu B, Ghosh SK, De DK, Basu D. Efficacy of nano-hydroxyapatite prepared by an aqueous solution combustion technique in healing bone defects of goat. *J Vet Sci.* 2008;9(2):183-91.
- Golec TS, Krauser JT. Long-term retrospective studies on hydroxyapatite coated endosteal and subperiosteal implants. *Dent Clin North Am.* 1992;36(1):39-65.
- Hebert S, Xavier R. *Ortopedia e traumatologia: princípios e prática.* 3ª ed. Porto Alegre: Sarvier; 2003. p. 26.
- Zoppi RA, Duek EAR, Coraça DC, Barros PP. Preparation and characterization of poly (L-lactic acid) and poly(ethylene oxide) blends. *Mat Res [online].* 2001;4(2):117-25.
- Kim BS, Mooney DJ. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 1998;16(5):224-30.
- Bernales DM, Caride F, Lewis A, Martin L. Membranas de colágeno polimerizado: Consideraciones su uso em técnicas de regeneracion tisular y osea guiadas. *Cubana Invest Biomed.* 2004;23(2):65-74.
- Takaoka K, Nakahara H, Yoshikawa H, Masuhara K, Tsuda T, Ono K. Ectopic bone induction on and in porous hydroxyapatite combined with collagen and bone morphogenetic protein. *Clin Orthop Relat Res.* 1988;(234):250-4.
- Mellonig JT. Porous particulate hydroxyapatite in a human periodontal osseous defect: a case report. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1991;11(3):217-23.
- Ono I, Ohura T, Murata M, Yamaguchi H, Ohnuma Y, Kuboki Y. A study on bone induction in hydroxyapatite combined with bone morphogenetic protein. *Plast Reconstr Surg.* 1992;90(5):870-9.
- Duarte TS, Borges AP, Lavor MS, Figueiras R, Tsiomis AC, Oliveira FL, et al. Osteointegração da hidroxiapatita sintética no processo alveolar da mandíbula de cães: aspectos histológicos. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2006;58(5):849-53.
- Camilli JA, da Cunha MR, Bertran CA, Kawachi EY. Subperiosteal hydroxyapatite implants in rats submitted to ethanol ingestion. *Arch Oral Biol.* 2004;49(9):747-53.
- Pinheiro TC, Santos FFC, Shirane HY, Cunha MR. Implantes de hidroxiapatita em falhas ósseas produzidas no fêmur de ratos submetidos ao tabagismo passivo. *Rev Bras Ortop.* 2008;43(10):433-41.
- Raab P, Wild A, Seller K, Krauspe R. Correction of length discrepancies and angular deformities of the leg by Blount's epiphyseal stapling. *Eur J Pediatr.* 2001;160(11):668-74.
- Du C, Cui FZ, Feng QL, Zhu XD, de Groot K. Tissue response to nano-hydroxyapatite/collagen composite implants in marrow cavity. *J Biomed Mater Res.* 1998;42(4):540-8.
- Caiazza S, Colangelo P, Bedini R, Formisano G, De Angelis G, Barrucci S. Evaluation of guided bone regeneration in rabbit femur using collagen membranes. *Implant Dent.* 2000;9(3):219-25.
- Wang YJ, Lin FH, Sun JS, Huang YC, Chueh SC, Hsu FY. Collagen-hydroxyapatite microspheres as carriers for bone morphogenetic protein-4. *Artif Organs.* 2003;27(2):162-8.
- Nishikawa T, Masuno K, Tominaga K, Koyama Y, Yamada T, Takakuda K, et al. Bone repair analysis in a novel biodegradable hydroxyapatite/collagen composite implanted in bone. *Implant Dent.* 2005;14(3):252-60.
- Moss ML. A functional analysis of fusion of the tibia and fibula in the rat and mouse. *Acta Anat (Basel).* 1977;97(3):321-32.
- Kirchen ME, O'Connor KM, Gruber HE, Sweeney JR, Fras IA, Stover SJ, et al. Effects of microgravity on bone healing in a rat fibular osteotomy model. *Clin Orthop Relat Res.* 1995;(318):231-42.
- Ruano R, Jaeger RG, Jaeger MM. Effect of a ceramic and a non-ceramic hydroxyapatite on cell growth and procollagen synthesis of cultured human gingival fibroblasts. *J Periodontol.* 2000;71(4):540-5.
- Endres S, Landgraaf M, Kratz M, Wilke A. [Biocompatibility testing of various biomaterials as dependent on immune status]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb.* 2004;142(3):358-65.
- Rücker M, Laschke MW, Junker D, Carvalho C, Schramm A, Mülhaupt R, et al. Angiogenic and inflammatory response to biodegradable scaffolds in dorsal skinfold chambers of mice. *Biomaterials.* 2006;27(29):5027-38.
- Hedia HS. Effect of coating thickness and its material on the stress distribution for dental implants. *J Med Eng Technol.* 2007;31(4):280-7.