

# AVALIAÇÃO DE "SCAFFOLDS" DE HIDROXIAPATITE E FOSFATO TRICÁLCICO PARA CRESCIMENTO ÓSSEO

**Joana da Costa Reis<sup>1</sup>, José Caeiro Potes<sup>2</sup>, Fernando Capela e Silva<sup>3</sup>, Carlos Relvas<sup>4</sup>, José António Simões<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Medicina Veterinária, Universidade de Évora, 7002-554 Évora, Portugal; jmfc@uevora.pt

<sup>2</sup>Departamento de Medicina Veterinária, Universidade de Évora, 7002-554 Évora, Portugal; jacpotes@uevora.pt

<sup>3</sup>Departamento de Biologia e, Universidade de Évora, 7002-554 Évora, Portugal; fcs@uevora.pt

<sup>4</sup>Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

<sup>5</sup>Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal; simoes@mec.ua.pt

**PALAVRAS CHAVE:** “Engineering scaffolds”, hidroxiapatite, trifosfato de cálcio, histologia, ovelha.

**RESUMO:** A Engenharia de Tecidos envolve a utilização de células com matrizes biológicas ou artificiais, ou scaffolds, que direcionam as células durante o processo de reparação ou regeneração dos tecidos. Os scaffolds têm sido usados na reconstrução de segmentos ósseos, já que existem limitações importantes na utilização de enxertos autólogos, homólogos ou heterólogos. A composição dos scaffolds e as suas características estruturais desempenham um papel fundamental nas respostas biológicas do tecido ósseo. O presente estudo teve como objectivo a avaliação da utilização *in vivo* de scaffolds de hidroxiapatite (HA) e de hidroxiapatite/fosfato tricálcico (HA/TCP) no recrutamento e diferenciação de células osteogénicas, para aplicação em ortopedia como superfície osteocondutora/osteoindutora, quer enquanto material de revestimento quer como material para preenchimento de defeitos ósseos. Para o efeito, foram concebidos e fabricados protótipos de scaffolds, com 75% de porosidade, os quais se implantaram nas tibias de duas ovelhas. Três meses após a cirurgia os animais foram sacrificados e foi feita a avaliação histológica de osso não descalcificado em secções incluídas em resina e coradas com Giemsa Eosina. A avaliação histológica efectuada sugere que os scaffolds de HA parecem ter uma maior capacidade de recrutamento e de diferenciação de células osteogénicas e de formação de osso compacto, quando comparados com os scaffolds de HA/TCP, o que pode determinar uma mais rápida reposição da normal função tecidual.

## 1 INTRODUÇÃO

Fontes naturais e sintéticas de substitutos de osso são objecto de investigação há mais de três décadas. Materiais biocerâmicos como a hidroxiapatite (HA) e o fosfato tri-cálcico (TCP) têm sido amplamente utilizados e comercializados. Estes materiais têm sido utilizados em virtude do seu grau de similaridade com as características químicas da componente mineral do tecido ósseo, osteoconductividade e osteointegração. Contudo, estes materiais diferem na sua taxa de reabsorção. A HA tem tempos de degradação que se podem prolongar por

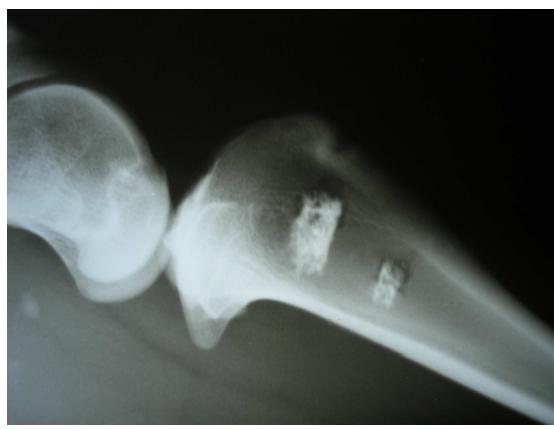
décadas, enquanto os scaffolds porosos de TCP são rapidamente reabsorvidos através de dissolução química e celular conjunta, nomeadamente por actividade osteoclástica, estando a velocidade de biodegradação igualmente dependente da estrutura cristalográfica. O fosfato de cálcio bifásico (BCP) é um compósito de TCP-HA e a sua taxa de degradação aumenta com o aumento do teor em TCP [1, 2]. O presente estudo teve como objectivo a avaliação histológica preliminar do comportamento *in vivo* de

scaffolds de hidroxiapatite e fosfato de cálcio bifásico.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

No presente trabalho foram implantados nas tibias de duas ovelhas adultas Merino Branco, provetes com 75% de porosidade com dimensões de 5x5x10 mm e 10x10x10mm, sendo um grupo composto por scaffolds de 100% hidroxiapatite e outro grupo de fosfato de cálcio bifásico (compósito de 75% de HA e 25% de TCP).

Os animais foram submetidos a jejum de 24 horas previamente à cirurgia, após o que foram tranquilizados com xilazina (0,05 – 0,1 mg/kg), a anestesia induzida com tiopental sódico a 5% (5-10 mg/kg), e mantida, após entubação endotraqueal, com isoflurano. Previamente à indução de estímulos álgicos foi ainda administrada buprenorfina, (0,005 mg/kg). Após realizado o acesso craniomedial à crista da tíbia, o defeito ósseo foi criado mediante perfuração a baixa velocidade e sob irrigação e adaptado à geometria do scaffold mediante a utilização de goiva e elevador de periôsteo. Após a cirurgia foram realizadas radiografias (Fig.1), bem como no momento do sacrifício.



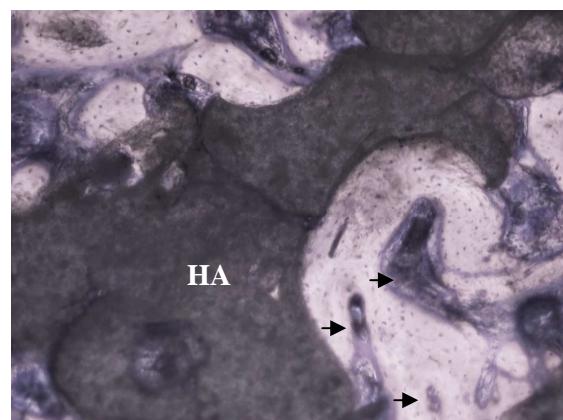
**Fig. 1** Radiografia pós-operatória mostrando a localização dos scaffolds implantados.

Três meses após a cirurgia os animais foram sacrificados e foi feita a avaliação histológica de secções de osso não desmineralizado, incluídas em resina

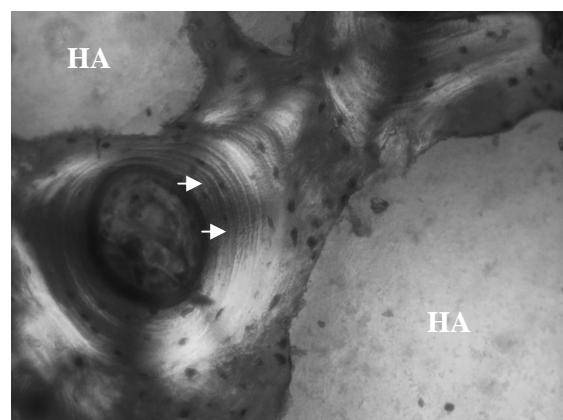
(Technovit 9100) e coradas com Giemsa Eosina.

## 3 RESULTADOS

A avaliação histológica efectuada sugere que, três meses após a implantação, em todos os scaffolds é evidente a penetração de tecido ósseo. Todavia, os scaffolds de HA parecem ter uma maior capacidade de recrutamento e de diferenciação de células osteogénicas, dando origem a osso compacto bem organizado em toda a extensão do scaffold (Figuras 2 e 3).



**Fig. 2** Imagem do centro de um dos scaffolds 100% HA 10x10x20mm, mostrando diversos osteónios em formação (setas, 40x).



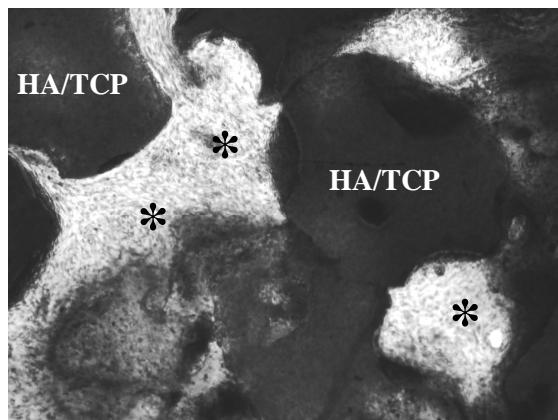
**Fig. 3** Imagem do centro de um dos scaffolds 100% HA, 5x5x10mm, mostrando pormenor de osteónio com orientação lamelar bem definida (setas) (100x, luz polarizada).

Nos scaffolds compostos por HA/TCP, apesar de haver presença de osso neoformado, este tinha uma aparência menos organizada e de superior celularidade. Nestes scaffolds, três

meses após a implantação, e a par com a presença de marcada actividade osteoblástica, era ainda evidente a existência de abundante tecido conjuntivo no interior dos poros do scaffold (Figuras 4 e 5).



**Fig. 4** Imagem mostrando osso neoformado (setas, 40x).



**Fig. 5** Presença de tecido conjuntivo (\*) no interior do scaffold (40x).

#### 4 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo histológico sugerem que, após três meses de implantação, os scaffolds de HA poderão dar origem a tecido ósseo mais maduro e com organização mais próxima do tecido cortical. Diversos estudos sugerem que a taxa de reabsorção mais rápida do TCP pode assegurar uma mais rápida recuperação das propriedades mecânicas tecidulares por permitir a substituição do scaffold por osso recém-formado mais precocemente [3, 4]. Todavia, outros estudos sugerem que a HA pode mais

consistentemente dar origem a tecido ósseo compacto normal, estando a resposta aos fosfatos bifásicos fortemente dependente das características estruturais e proporção de HA/TCP [5, 6, 7]. Estas diferenças poderão ser justificadas quer pelos diferentes modelos animais utilizados, tempos de implantação e metodologias, quer por características inerentes ao material (cristalinidade, porosidade, dimensão dos poros e sua interconectividade, etc.) e enfatizam a necessidade de estudos comparativos alargados dos materiais, bem como a adequação da sua escolha face a cada aplicação clínica.

#### AGRADECIMENTOS

This work was supported by FCT (grant BD/31895/2006, projects POCI/EME/56040/2004, PTDC/EMEMFE/66482/2006).

#### REFERÊNCIAS

- [1] Bohner, M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury*, 31(suppl.4), 37-47, 2000.
- [2] Eggli, P.S.; Müller, W. et al. Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. A comparative histomorphometric and histologic study of bony ingrowth and implant substitution. *Clinical Orthopaedics & Related Research*, 232, 127-138, 1988.
- [3] Ogose, A.; Hotta, T. et al. Comparison of hydroxyapatite and beta tricalcium phosphate as bone substitutes after excision of bone tumors. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 72(1), 94-101, 2005.
- [4] Lu, J.X.; Gallur, A. et al. Comparative study of tissue reactions to calcium phosphate ceramics among cancellous, cortical, and medullar bone sites in rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research*, 42(3), 357-367, 1998.
- [5] Yuan, H.; Yang, Z. et al. Material-dependent bone induction by calcium phosphate ceramics: a 2.5-year study in dog. *Biomaterials*, 22(19), 2617-2623, 2001.
- [6] Okuda, T.; Ioku, K. et al. The effect of the microstructure of beta-tricalcium phosphate on the metabolism of subsequently formed bone tissue. *Biomaterials*, 28(16), 2612-2621, 2007.
- [7] Jensen, S.; Bornstein, M. et al. Comparative study of biphasic calcium phosphates with different HA/TCP ratios in mandibular bone defects. A long-term histomorphometric study in minipigs. *Journal of Biomedical Materials Research Part B*, 2008, doi: 10.1002/jbm.b.31271.