

AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DE UMA VITROCERÂMICA EM PERFURAÇÕES ÓSSEAS SOB INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO LASER

E.R.B ARRUDA *, N.A. PARIZOTTO ** e J.M.D.A. ROLLO*.

*Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia EESC/FMRP/IQSC-USP, São Carlos, Brasil.

**Departamento de Fisioterapia/UFSCAR, São Carlos, Brasil.

e-mail: emilianoarruda@vivax.com.br

Abstract: The present study evaluated the effects caused by the Low Level Laser Therapy at λ 780nm, on the osteoconductive behavior of the glass-ceramic drafted from bioactive glass of composition: 45% SiO₂, 24.5% Na₂O, 24.5% CaO and 6% P₂O₅ in drillings in tibia of rats. Drillings were made below the tuberosity of the right tibia of 65 males of the race Wistar rats (*Rattus Norvegicus Albinus*) in adult age. They were randomly divided into 4 groups which are: a control and three underwent experimental procedure to implant and/or of low level laser irradiation. The results showed the replacement of glass-ceramic particles by new bone, and histological evidences of most collagen fibers deposition on irradiated groups.

Key-words: Low-level Laser, glass-ceramic, bone repair.

Introdução

A busca por novos materiais sintéticos para o tratamento de alterações ósseas incentiva o estudo de uma técnica apoiada no desenvolvimento tecnológico ainda pouco explorado, a do biomaterial.

Biomateriais são materiais desenvolvidos para uso em áreas da saúde com finalidade de substituir a matéria viva cuja função foi perdida, neste caso o tecido ósseo. Um biomaterial é qualquer substância sintética ou natural que pode ser utilizada para substituição total ou parcial de qualquer tecido, ou órgão do organismo. Excluem-se aqui os fármacos [1].

O biovidro de composição: 45% SiO₂, 24,5% Na₂O, 24,5% CaO e 6% P₂O₅ mostrou-se um biomaterial não citotóxico e biocompatível com características de material de preenchimento e de material osteocondutor [2].

As propriedades mecânicas dos vidros bioativos podem ser fortemente afetadas por transformações de fases [3]. A vitrocerâmica baseada no biovidro acima descrito foi previamente preparada para ter suas propriedades osteocondutoras avaliadas.

Uma vez que estes tipos de implantes são utilizados no intuito de viabilizar o reparo ósseo, é relevante o fato de se tentar combiná-los com outras técnicas bioestimulantes como a radiação laser de baixa intensidade.

Lirani-Galvão e colaboradores [4]

demonstraram efetividade da LTBI com λ 780nm 30mW de potência na fluência de 112,5J/cm², na estimulação do reparo ósseo em tíbias de ratos, e Da Silva e Camilli [5] demonstraram melhor interação com enxertos ósseos autógenos devido à laserterapia.

A literatura discute superficialmente a interação do biovidro no estado amorfo ou mesmo cristalino, sob a influência da radiação laser de baixa intensidade, com o tecido ósseo. Os fatores supracitados nos levam a crer que a LTBI poderia ser empregada, a fim de interagir de forma positiva no reparo ósseo, em combinação com a vitrocerâmica utilizada.

Materiais e Métodos

Caracterização do biomaterial - Foi utilizada uma vitrocerâmica baseada no biovidro de composição: 45% SiO₂, 24,5% Na₂O, 24,5% CaO e 6% P₂O₅, que foi fundida em cadinho de platina a 1340°C (mistura de fusão), e após a análise térmica diferencial (Figura 1) foi submetida a tratamento térmico em cuba de inox acima de sua temperatura de transição vítrea buscando a cristalinidade, a 620°C por 30 minutos e mantido à 790°C por 60 minutos.

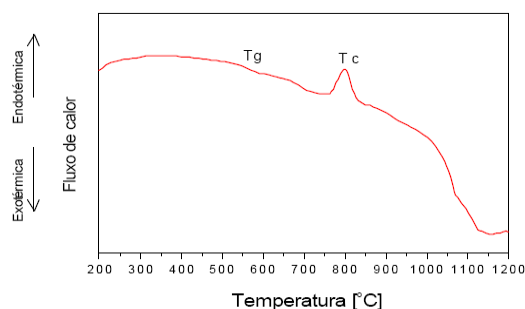


Figura 1 – Análise térmica diferencial do biovidro evidenciando a temperatura de transição vítrea (Tg) e a temperatura de cristalização (Tc).

Para caracterizar a vitrocerâmica utilizada no presente experimento, foi utilizada a técnica de Micro Raman e também a de Difração de Raios-X.

Na espectroscopia Raman, os picos formados no gráfico da amostra submetida ao tratamento térmico evidenciam a presença de cristalinidade, já na amostra

vítrea os picos não aparecem, o que caracteriza um material amorfo. Demonstrando a eficiência do tratamento empregado (Figura 2).

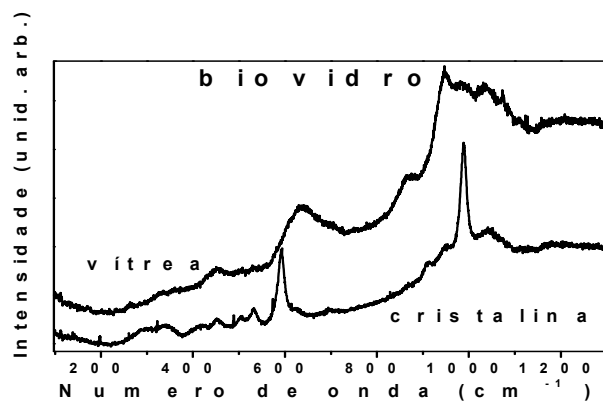


Figura 2 - espectroscopia Raman comparativa, demonstrando a formação de picos após o tratamento térmico.

Na difração de Raios-X, o gráfico demonstra a formação de picos que indicam a presença de cristalinidade e a formação de fases compatíveis com cristais de Silicato de Sódio e Cálcio (Figura 3), enquanto na amostra vítrea os picos estão ausentes o que é característica de um material amorfo (Figura 4), confirmando desta forma a espectroscopia Raman.

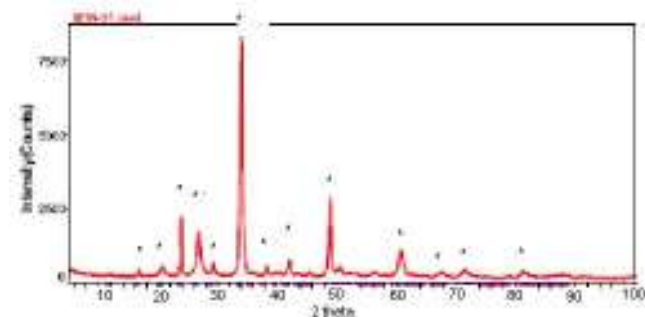


Figura 3 – DRX evidenciando a formação de fases compatíveis com $\text{Na}_2\text{CaSiO}_4$ (*).

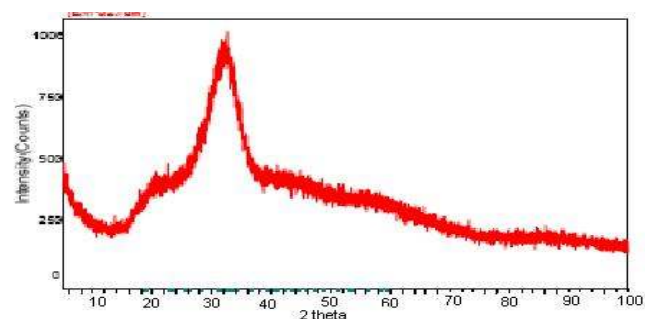


Figura 4 – DRX com ausência de picos, evidenciando material amorfo.

Animais Experimentais - Foram utilizados 65 ratos machos da raça Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) na idade adulta. Os quais permaneceram em ambiente

higienizado a cada dois dias, com iluminação ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo água e ração balanceada *ad libitum*.

Grupos experimentais - Os animais, com suas tíbias direitas cirurgicamente perfuradas foram divididos aleatoriamente em quatro grupos, dos quais um foi utilizado como controle e três submetidos a procedimento experimental de implante e/ou irradiação laser de baixa intensidade. Os parâmetros da laserterapia empregados no experimento foram: modo contínuo de emissão, potência de 30mW, dose de 112,5 J/cm². Resultando deste modo em um tempo de aplicação de 150 segundos e energia pontual de 4,5J.

. Os grupos utilizaram 16 animais. Posteriormente, os animais de cada grupo foram subdivididos em dois subgrupos cada, de acordo com o tempo de vida antes da eutanásia, que ocorreu com 7 e 13 dias P.O.

Grupo experimental 1 (n=16) - Os animais não foram submetidos a nenhum procedimento após a cirurgia, permanecendo em suas gaiolas durante todo o período experimental. Grupo representado pela sigla GC.

Grupo Experimental 2 (n=16) - Neste grupo os animais receberam radiação laser desde o primeiro dia P.O.. Grupo representado pela sigla GL.

Grupo Experimental 3 (n=16) - Os animais tiveram a lesão submetida à aplicação de vitrocerâmica. Grupo representado pela sigla GV.

Grupo Experimental 4 (n=16) - Os animais foram submetidos à aplicação de vitrocerâmica, e também à irradiação laser. Grupo representado pela sigla GVL.

Procedimento experimental - Todo o procedimento foi realizado de acordo com as normas para a prática didático-científica da vivisecção de animais (lei 6638/08 de maio de 1979) e com os princípios éticos na experimentação animal (COBEA 1991) sob condições padrão de assepsia e sob anestesia geral.

Antes do procedimento cirúrgico foi realizada a pesagem dos animais e determinada a dose de anestésicos. Esta composta da combinação de cloridrato de Ketamina 10% e cloridrato de Xilazina 2%, com dose proporcional ao peso do animal e utilizada em cada indivíduo de todos os grupos com aplicação intraperitoneal.

A pele circunjacente à tuberosidade da tíbia da pata direita foi previamente tricotomizada e limpa com álcool etílico iodado. Foi realizada uma pequena incisão longitudinal sobre a pele, e uma incisão na musculatura tornando possível a perfuração da tíbia.

A aplicação da vitrocerâmica foi realizada com auxílio de um porta-amálgama utilizando como veículo o sangue do próprio animal. Ao final do procedimento, a pele e o músculo foram suturados usando fio poliamida monofilamento 3.0 não reabsorvível, e então, a pele foi limpa com solução de álcool iodado, proporcionando desta forma higienização local.

A terapia laser teve seu início 24 horas após a lesão, e foi realizada durante 12 dias consecutivos. Logo após a eutanásia, a tíbia direita de cada animal foi

retirada e submetida a procedimento histológico padrão para descalcificação e inclusão em parafina.

Foram realizados cortes longitudinais direcionados à análise das características das fibras colágenas, utilizando para isto a coloração Picro Sirius Red sob luz polarizada, evidenciando o estado organizacional do colágeno depositado, através da quantificação pelo Software ImageJ, da intensidade da coloração dada pelo Picro Sirius Red (em pixels) numa escala de 0 a 255.

Resultados

A Figura 5 representa o padrão alcançado por cada grupo aos 7 dias. Há evidências qualitativas no aspecto organizacional das fibras de colágeno no tecido ósseo neoformado, demonstrando que os grupos tratados com laser estão em melhores condições de organização estrutural.

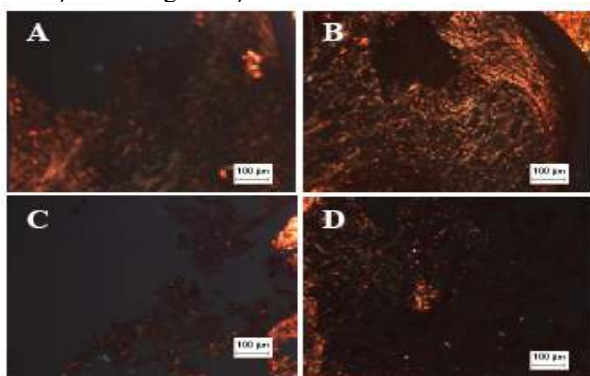


Figura 5 – o GC apresenta uma anisotropia moderada (A), enquanto o GL apresenta uma melhora na organização estrutural das fibras colágenas (B). O GV apresenta baixa anisotropia (C), enquanto o grupo GVL há um aumento na anisotropia das fibras colágenas em comparação com GV.

A Figura 6 traz os dados quantitativos referentes à organização estrutural do tecido 7 dias P.O.

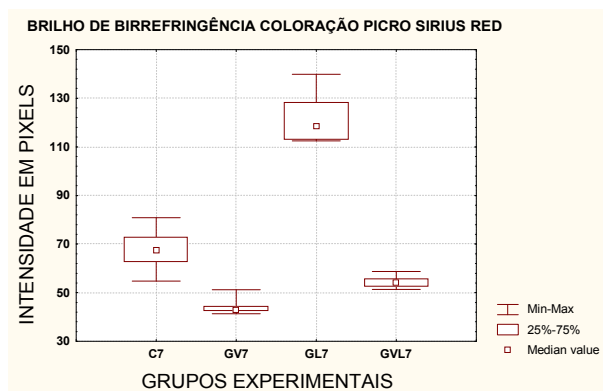


Figura 6 - médias em pixels da intensidade da coloração dada pelo Picro Sirius Red. O GC apresenta melhor organização tecidual se comparado aos GV e GVL, o grupo GL apresenta a melhor organização tecidual entre todos os grupos em 7 dias.

A Figura 7 ilustra a representação dos grupos GC e GL aos 13 dias, onde é evidente a estimulação da organização tecidual pela radiação laser.

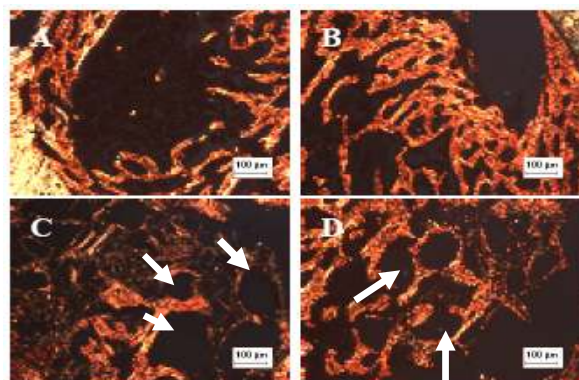


Figura 7 – o GC apresenta formação de tecido anisotrópico predominante na periferia do sítio de lesão (A), o grupo GL tem uma maior anisotropia em comparação com GC, evidência de maior organização estimulada pelo laser de baixa intensidade (B). O GV apresenta tecido anisotrópico em torno das partículas da vitrocerâmica, inclusive nas áreas centrais da lesão (C), o GVL apresenta maior quantidade de tecido anisotrópico (D) em comparação com GV (as setas indicam partículas da vitrocerâmica).

A Figura 8 traz os dados quantitativos referentes à organização estrutural do tecido 13 dias P.O.

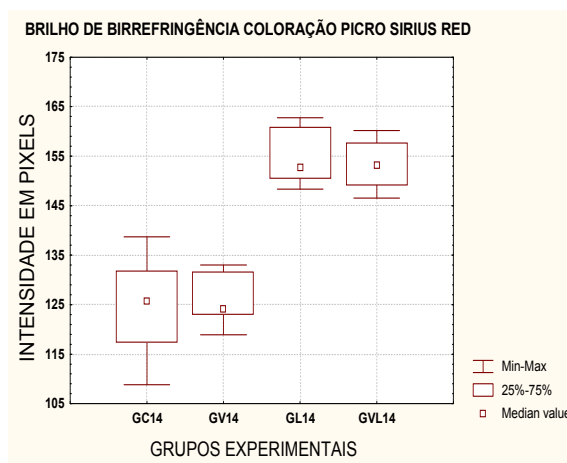


Figura 8 - médias em pixels da intensidade da coloração dada pelo Picro Sirius Red. O grupo GV apresenta anisotropia inferior ao GC. Os grupos que receberam a radiação laser encontram-se com melhor organização tecidual se comparados aos grupos que não receberam o estímulo, porém o GL apresenta maior anisotropia que o GVL.

Os resultados quantitativos de anisotropia foram analisados utilizando ANOVA unicaudal com *post hoc* de Tukey. A diferença foi estatisticamente

significativa ($p < 0,05$) na comparação entre todos os grupos.

Discussão

O retardo inicial na anisotropia tecidual, observada nos grupos submetidos a aplicação da vitrocerâmica no presente estudo, é corroborado por Becker et al [6].

Contudo, Guastaldi [7] afirma que o atraso inicial do processo de reparo pode ser entendido como uma reação fisiológica natural, porque na presença de partículas de enxerto a deposição óssea ao redor do material é mais lenta e diretamente proporcional à absorção do mesmo, promovendo uma equivalência reparativa somente nos períodos cronológicos finais de 30 a 60 dias.

Em termos de aplicação clínica, o vidro mais utilizado é o Bioglass® 45S5 [8], que conduz à formação mais rápida de osso do que a hidroxiapatita (HA). No entanto, a baixa tenacidade à fratura não permite a sua aplicação em zonas de carga.

Assim, vitrocerâmicas bioativas (obtidas por cristalização controlada de vidros) foram desenvolvidas de forma a, mantendo as propriedades de osteocondução do biovidro, melhorar a sua resistência, permitindo a sua utilização mais abrangente.

MOURA e colaboradores [9] obtiveram uma vitrocerâmica (Biosilicate®) com maior bioatividade e propriedades mecânicas superiores ao do biovidro utilizado para a obtenção da mesma.

Os presentes resultados demonstram que a vitrocerâmica utilizada apresenta potencial osteocondutor após o tratamento térmico empregado.

A laserterapia de baixa intensidade tem sido estudada como estimulante do reparo ósseo com resultados positivos, corroborando os presentes resultados [10, 11].

Nos resultados apresentados, fica evidente uma estimulação do processo de reparo pela radiação laser de baixa intensidade nos parâmetros utilizados, bem como a melhora da interação do osso com a vitrocerâmica utilizada.

Foram realizados estudos demonstrando melhor interação osso-implante utilizando-se LTBI com diodo de arsenieto de gálio aluminizado (GaAlAs) em tíbias com implantes de titânio [12] corroborando os presentes resultados.

Conclusão

A partir dos resultados apresentados, é possível concluir que a vitrocerâmica baseada no biovidro de composição em porcentagem de peso 45% SiO₂, 24,5% Na₂O, 24,5% CaO e 6% P₂O₅, após ser recozido em cuba de inox acima de sua temperatura de transição vítrea, a 620°C por 30 minutos e mantido a 790°C por 60 minutos, apresenta características de material de preenchimento e potencial osteocondutor.

A laserterapia de baixa intensidade mostrou-se um eficiente meio bioestimulante nos parâmetros utilizados.

Quando o tecido é irradiado na presença da vitrocerâmica a interação de ambos é otimizada, melhorando a qualidade do tecido ósseo neoformado.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES pelo apoio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

Referências Bibliográficas

- [1] Guastaldi, A.C. (2004) Biomaterial – *ponderações sobre as publicações científicas*. Rev. assoc. paul. Cir. Dent., São Paulo, v.58, n.3, p.205-206.
- [2] Reyes, L. C. V. (2000) Aplicação de um vidro bioativo em tíbias de coelho. 70p. Dissertação de Mestrado UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - São Carlos - SP.
- [3] P. Li, Q. Yang, F. Zhang and Kobuko (1992), the effect of residual glassy phase in a bioactive glass-ceramic on the formation of its surface apatite layer in vitro, J. Mater. Sci. Mater. Med., v.3 n.6, p.452-456.
- [4] Lirani-Galvão, A.P.R.; Jorgetti, V.; Silva, O. L. (2006) Comparative study of how low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound affect bone repair in rats. Photomedicine & Laser Surgery, v. 24, n.6 p.735-740.
- [5] Da Silva, R.V., Camili, J.A. (2006) Repair of bone defects treated with bone graft and low power laser. The journal of craniofacial surgery. v.17 n.2 p.297-301.
- [6] Becker W, Becker B.E., Caffesse R. A comparison of desmineralized freeze-dried bone and autologous bone to induce bone formation in human extraction sockets. **J Periodontol**; 65(2):1128-33, 1994.
- [7] Guastaldi, A.C. Biomaterial – *ponderações sobre as publicações científicas*. **Rev. assoc. paul. Cir. Dent.**, São Paulo, v.58, n.3, p.205-206, 2004.
- [8] Kokubo T, Ito S, Huang ZT, Hayashi T, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. (1990) Ca-P - Rich Layer formed on high strength bioactive glass ceramics A-W. **J Biomed Mater Res**; v.24 n.3 p.31-43.
- [9] Moura, J. Teixeira, L.N. Rvagnani, C. Peitl, O. Zanotto, E.D. Beloti, M.M. Rosa, A.L. Oliveira, P.T. (2008) In vitro osteogenesis on a highly bioactive glass-ceramic. **J Mater Sci Mater Med**. V.19 n.2 p.833-8.
- [10] Pinheiro, A. L., Gerbi, M. E. (2006) Photoengineering of bone repair. **Photomedicine and laser surgery**. V.24 n.2 p.169-78.
- [11] Garavello, I., Baranauskas, V., DA Cruz-Hofling, M. A. (2004) The effects of low laser irradiation on angiogenesis in injured rat tibiae. **Histology and histopathology**. V. 19 n. 1 p.43-8.
- [12] Khadra, M., Ronold, H. J, Lyngstradaas, S. P., Ellingsen, J. E., Haanaes, H. R (2004). Low-level laser therapy stimulates bone-implant interaction: an study in rabbits. **clinical oral implants research**, v.15 n.3 p.325-32.