

## **Caracterização *in vivo* de blendas de cimento de aluminato de cálcio para reparo ósseo**

### **(*In vivo* characterization of blends based on calcium aluminate cement for bone repair)**

J.M.A. Abdala<sup>1</sup>, L.M.R. Vasconcellos<sup>2</sup>, M.N. Vieira<sup>2</sup>, F.S. Ortega<sup>3</sup>, V.C. Pandolfelli<sup>4</sup>, I.R. Oliveira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – Universidade do Vale do Paraíba  
São José dos Campos - SP

<sup>2</sup>Departamento de Biociência e Diagnóstico Oral, Instituto de Ciência e Tecnologia –  
Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos - SP

<sup>3</sup>Centro Universitário FEI  
São Bernardo do Campo - SP

<sup>4</sup>Departamento de Engenharia de Materiais – Universidade Federal de São Carlos  
São Carlos - SP

juabdala@yahoo.com.br

#### **Resumo**

*O cimento ósseo, PMMA (polimetilmetacrilato), apresenta limitações de manuseio e suas reações podem causar necrose do tecido devido às reações exotérmicas. Assim, vêm sendo estudadas blendas a base de cimento de aluminato de cálcio (CAC) com alta resistência mecânica à compressão possuindo também propriedades bioativas. O objetivo deste trabalho foi caracterizar as blendas quanto à formação de depósitos de cálcio (in vitro), análise histológica na interface com o cimento (in vivo) e resistência à flexão (in vivo). Os resultados mostraram que as blendas de alumina e colágeno favoreceram o depósito de cálcio enquanto a presença de óxido de zinco inibiu a mineralização da matriz. Ocorreu neoformação óssea na interface cimento-tecido ósseo após 4 semanas da cirurgia, com pontes ósseas constituídas por osso imaturo demonstrando a viabilidade do tecido ósseo. A blenda alumina apresentou o maior valor de força máxima de flexão e de rigidez in vivo superando o PMMA.*

*Palavras-chave: blendas de aluminato de cálcio, flexão de três pontos, neoformação óssea.*

#### **Abstract**

*The bone cement, PMMA (polymethylmethacrylate), has handling limitations and its reactions may cause tissue necrosis due to exothermic reactions. Thus, calcium aluminate cement (CAC) based blends with high compressive strength have also been studied and also have bioactive properties. The objective of this work was to characterize the blends for the formation of calcium deposits (in vitro), histological analysis at the interface with cement (in vivo) and flexural strength (in vivo). The results showed that alumina and collagen blends promoted calcium deposition while the presence of zinc oxide inhibited matrix mineralization. New bone formation occurred at the bone cement-tissue interface after 4 weeks of surgery, with bone bridges consisting of immature bone demonstrating the viability of the bone tissue. The alumina blend presented the highest value of maximum flexural strength and stiffness in vivo, better of PMMA.*

*Keywords: calcium aluminate cement blends, flexural strength, bone neoformation.*

## INTRODUÇÃO

O cimento atual mais utilizado para reparo ósseo é o PMMA (polimetilmetacrilato) [1], mas este apresenta deficiências como manuseio, não induz remodelação óssea após sua aplicação, produz reações exotérmicas durante sua cura [2] e há risco de vazamento do material em tecidos adjacentes [3] podendo ocorrer necrose nos mesmos [4].

O cimento de aluminato de cálcio (CAC), por outro lado, tem apresentado vantagens como fluidez e boas condições de trabalhabilidade [5], preparação a temperatura ambiente, ajuste da reologia e tempo de endurecimento, alta resistência mecânica inicial, boa resistência à corrosão [6], biocompatibilidade [7, 8] e habilidade de formar apatita *in situ* indicando sua bioatividade em fluido corporal simulado (SBF) [6, 9]. Também apresenta alta viscosidade, permitindo injeção direta após a mistura e baixa reação exotérmica [10, 11].

Trabalho recente [12] mostrou o desenvolvimento de blendas a base de CAC contendo diferentes teores de alumina, zircônia, óxido de zinco, hidroxiapatita, fosfato tricálcico, quitosana e colágeno, essas composições se mostraram bioativas quando em contato com fluido corporal simulado (SBF). Resultados preliminares *in vitro* também avaliaram a viabilidade de células osteoblásticas quando em contato com as blendas apontando resultados promissores principalmente para as amostras contendo zircônia, colágeno e óxido de zinco [12]. Outro trabalho mostrou que blendas de CAC resultaram em amostras com alta resistência mecânica à compressão (similar ao PMMA) [10]. Foi demonstrado que o uso do CAC testado em tecidos subcutâneos de ratos não induziu reação inflamatória sendo considerado biocompatível [13].

Dentro deste contexto o objetivo do presente trabalho foi realizar a caracterização de blendas de CAC (alumina, óxido de zinco, colágeno e fosfato tricálcico) quanto a formação de depósitos de cálcio (*in vitro*), análise histológica na interface cimento-tecido ósseo após 4 semanas de cirurgia (*in vivo*) e análise de resistência mecânica à flexão em três pontos (*in vivo*).

## MATERIAIS E MÉTODOS

Inicialmente o cimento de aluminato de cálcio (CAC) foi misturado a seco com dispersante Castament FS60 (Bayer, 0,6%-p) e plastificante  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Labsynth, 2,8%-p)

em moinho de bolas durante 1 hora. A seguir diferentes compostos foram adicionados e homogeneizados durante 1 hora com auxílio de moinho de bolas produzindo-se as seguintes blendas: 4%-p de alumina ou óxido de zinco ou fosfato tricálcico e 1%-p de colágeno.

Essas blendas foram usadas na preparação de suspensões aquosas (80%-p de sólidos, com exceção da blenda contendo colágeno preparada com 73%-p) com as quais foram preparadas amostras cilíndricas (6 mm diâmetro x 2 mm de altura). Amostras de PMMA (Bio mecânica) foram preparadas seguindo recomendações do fabricante. As análises de depósito de cálcio foram realizadas na Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto - FORP-USP utilizando células osteoblásticas de ratos da linhagem UMR-106 (American Type Cell Collection -ATCC, CRL-1661). A extração bioquímica de vermelho de Alizarina foi avaliada usando um método colorimétrico descrito por Gregory em 2004, [14] para análise quantitativa do teor de cálcio. Os dados foram expressos como absorvância a 405 nm e submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls, quando apropriado. O nível de significância adotado foi de 5%.

Os ensaios *in vivo* foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos/UNESP (CEUA 07/2017) e foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Para os estudos *in vivo*, 20 ratos adultos (*Rattus norvegicus*, variação albinus, Wistar), pesando cerca de 300g, totalizando n=5 e 4 grupos avaliados (com defeito não preenchido, com defeito preenchido com as blendas alumina ou fosfato tricálcico e PMMA), foram utilizados como modelo para avaliação do reparo ósseo. Aos 90 dias de idade foi realizado um defeito ósseo monocortical de 3 mm em cada fêmur, de todos os animais, sob anestesia geral. Ao término da cirurgia os animais foram monitorados até o prazo da eutanásia de 4 semanas. Os fêmures dos lados direito foram usados para análises histológicas a fim de observar a neoformação óssea na interface com os cimentos, enquanto os dos lados esquerdos foram usados para realizar os ensaios biomecânicos de flexão. Os fêmures direitos foram acondicionados em formol a 10% até o momento do processamento histológico e os fêmures esquerdos foram armazenados em solução de Ringer a -20°C até a realização dos testes.

Para análise histológica, após a preparação da lâmina (fixação, descalcificação, desidratação, diafanização, inclusão e microtomia), a mesma foi corada em hematoxilina e eosina para diferenciação das estruturas ácidas e básicas.

Os fragmentos ósseos dos fêmures esquerdos que estavam congelados em solução de Ringer a -20°C foram retirados do freezer no dia da realização do teste de flexão em três

pontos. Algumas peças não tiveram condições para ensaio e desta forma os grupos passaram a ter  $n=3$  como padronização. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Pesquisa de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista de São José dos Campos, em uma EMIC modelo DL 200. Os parâmetros usados no ensaio de flexão de três pontos foram adaptados conforme a metodologia de Silva et al. em 2017 [15]. Cada fêmur foi centralizado considerando o defeito ósseo preenchido com a blenda como o ponto central entre dois apoios distantes 10 mm um do outro. A carga de 5 kgf foi aplicada transversalmente ao longo do eixo do fêmur com uma velocidade constante de 5 mm/min até a falha do espécime. A partir do programa Tesc (versão 1.1) as seguintes propriedades extrínsecas do osso cortical foram avaliadas: força máxima (N): valor máximo da carga durante o teste e rigidez (kN/mm): ângulo da curva força x deslocamento na região linear. Os dados obtidos foram expressos como média e desvio padrão e analisados estatisticamente ao nível de significância de 5%. Os grupos foram submetidos à análise de variância ANOVA e quando necessário foi aplicado o teste de Tukey.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração bioquímica de vermelho de Alizarina mostrou valores significativamente maiores de depósitos de cálcio para os grupos controle, 4%-p de alumina e 1%-p de colágeno. Menor valor foi obtido para o grupo 4%-p óxido de zinco (ZnO), como apresentado na Figura 1.

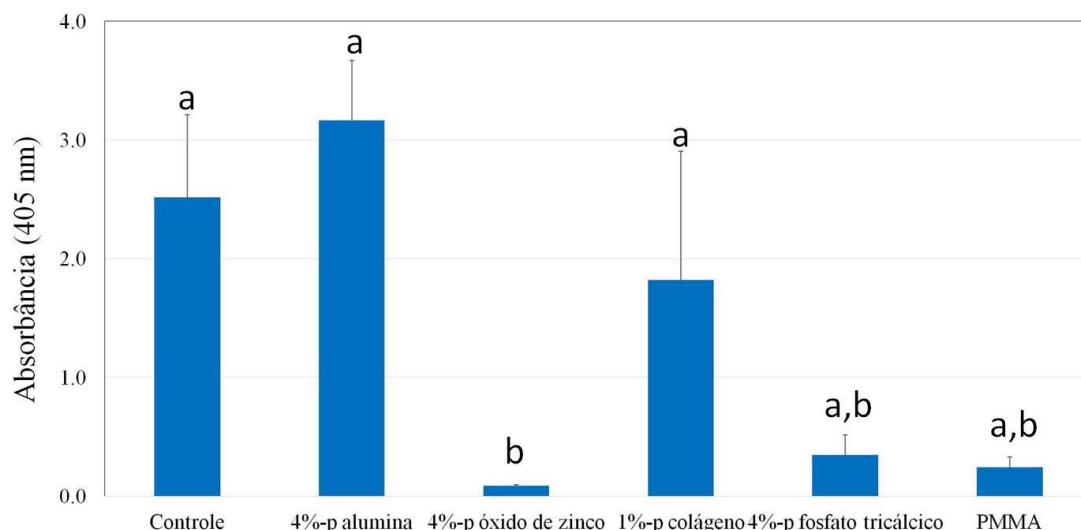


Figura 1: Extração bioquímica de vermelho de Alizarina (depósito de cálcio) em culturas de células osteoblásticas UMR-106.

As culturas de células osteoblásticas foram expostas aos diversos materiais após 7 dias de cultura. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ).

As células UMR-106 são uma linhagem celular de osteosarcoma de camundongo que podem ser induzidas para produzir rapidamente fosfato de cálcio mineral associado a uma matriz extracelular à base de colágeno [16]. Portanto, os depósitos de cálcio são uma indicação de formação *in vitro* de nódulos semelhantes a ossos que podem ser especificamente corados com vermelho-alaranjado usando o corante Alizarina Red S.

Os resultados mostraram que a adição de ZnO ao CAC inibiu significativamente a mineralização da matriz, e estes achados concordam com as observações de Togari et al. (1993) mostrando que a exposição ao zinco reduz o conteúdo de cálcio e inibe a mineralização da matriz em culturas de células osteogênicas, mas promove atividade da fosfatase alcalina e expressão gênica de marcadores de osteoblastos [17] [18].

Nas análises das lâminas histológicas observou-se neoformação óssea na interface cimento-tecido ósseo após 4 semanas da cirurgia. Nas interfaces laterais e na região abaixo do cimento foi observada neoformação óssea com a presença de osteoblastos em fileira única ao redor das trabéculas ósseas, bem como osteócitos aprisionados no interior da matriz óssea, demonstrando a viabilidade do tecido ósseo. A Figura 2 ilustra as imagens da interface entre o cimento e o tecido ósseo nos diferentes grupos. Cabe ressaltar que o grupo óxido de zinco não foi avaliado devido a inibir os depósitos de cálcio e o grupo colágeno não pode ser injetado no defeito ósseo devido à alta viscosidade.

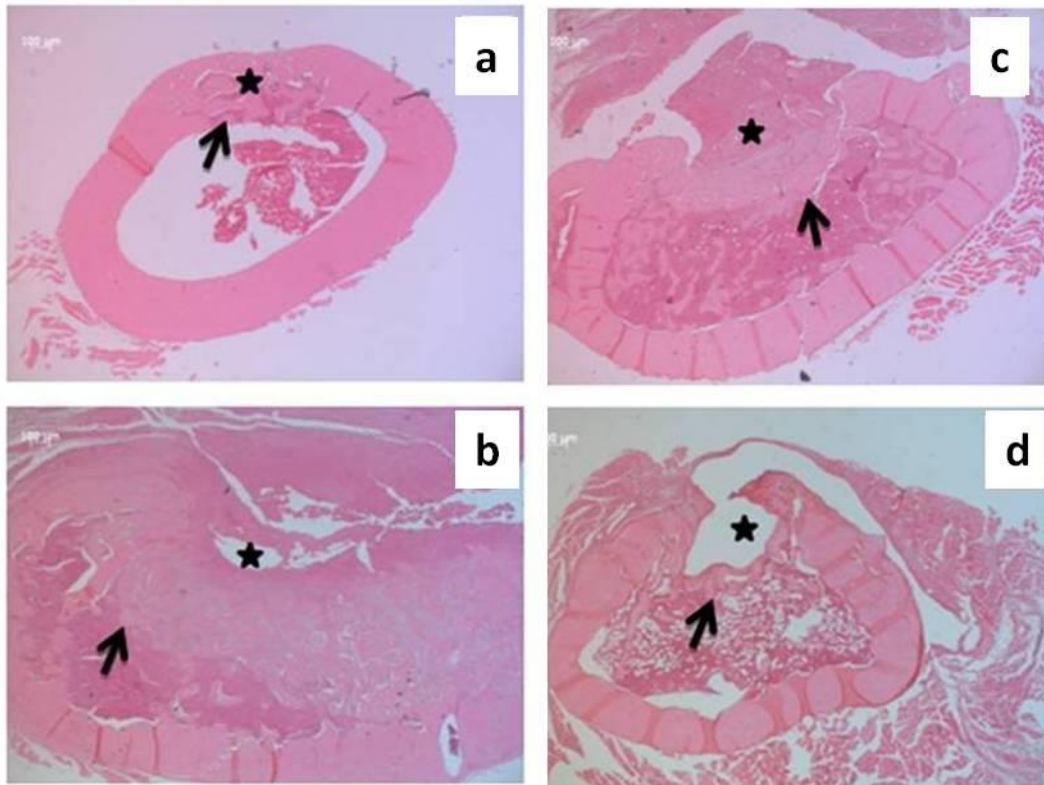


Figura 2: Imagens histológicas da neoformação óssea abaixo da área de implantação do cimento no defeito ósseo. As imagens mostram a neoformação óssea (➡) no defeito ósseo (★) após período de 4 semanas para os seguintes grupos: a) coágulo; b) alumina; c) fosfato tricálcico e d) PMMA.

O teste de flexão em três pontos foi realizado nesta ponte óssea neoformada nos espécimes do fêmur esquerdo que ficou acondicionado em Ringer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Os dados de média e desvio padrão da força máxima obtida para os diferentes grupos podem ser visualizados na Figura 3. Observou-se maior valor para o grupo alumina comparado ao grupo controle (coágulo) e PMMA.

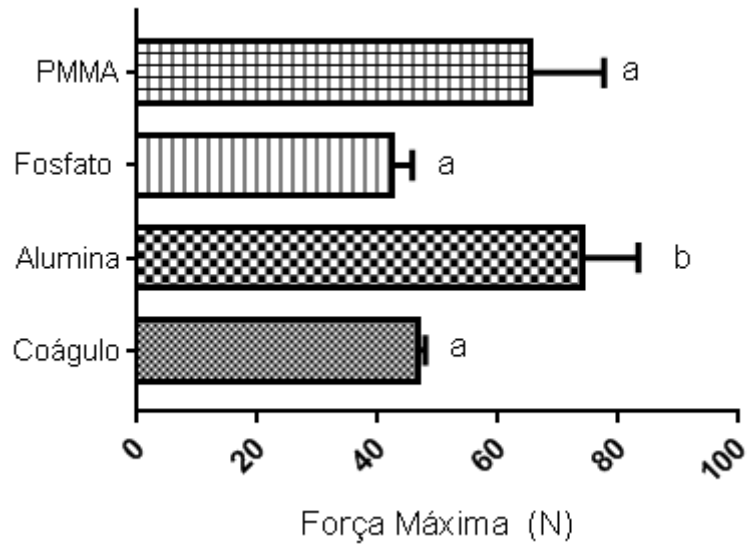


Figura 3: Força máxima de flexão *in vivo* para o osso com defeito preenchido com as blendas (76%-p) em comparação ao grupo coágulo (controle) e PMMA.

Os dados de média e desvio padrão da rigidez da amostra podem ser visualizados na Figura 4. Após os testes estatísticos observou-se diferença significativa entre o grupo alumina e o grupo controle (coágulo) o qual exibiu o maior valor ( $p < 0,05$ ).

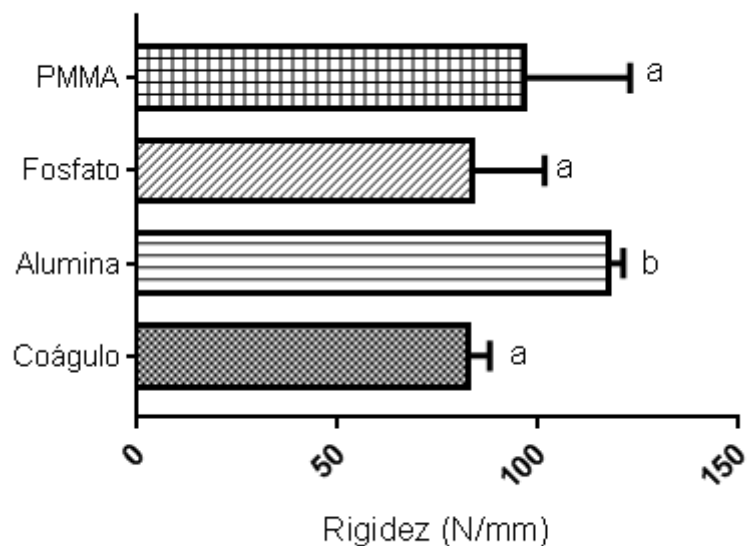


Figura 4: Rigidez *in vivo* para osso preenchido com as blendas (76%-p) em comparação com grupo coágulo (controle) e PMMA.

A maior adesão com o osso ocorreu com a alumina que apresentou o maior valor de força máxima de flexão *in vivo*, e esse comportamento promoveu melhor reparo ósseo e conseqüentemente, melhor resultados biomecânicos. O PMMA apresentou o segundo maior valor de força máxima, mas para testes *in vivo* e não apresentou interação com o tecido ósseo melhor que a alumina. Sugere-se que os produtos gerados durante a manipulação do PMMA podem interferir no reparo ósseo e conforme, assim foi relatado também que o PMMA apresentou problema de alta rigidez de compressão sendo suspeito de causar problemas nas vertebra adjacentes após a vertebroplastia [19], além disso foi relatado danos térmicos à cartilagem articular decorrentes da aplicação do PMMA [20]. Outros autores também relataram biocompatibilidade insuficiente do PMMA, incorporando nano partículas de hidroxiapatita para melhorar a sua biocompatibilidade [21]. Conforme já verificado por outros autores a alumina é um material inerte e resistente à maioria dos ambientes corrosivos como o corpo humano apresentando também excelente dureza [22], causando pouca ou nenhuma resposta dos tecidos envolta mantendo-se inalterado [22]. Tavassoli em 2018 mostrou que a forma convencional da alumina é de uma biocerâmica inerte e sua incorporação em biocerâmicas de hidroxiapatita resultou em melhor dureza e aumento na tenacidade à fratura, aumentando marcadores funcionais de função óssea evidenciada pela maior fixação e proliferação celular, atividade de fosfatase alcalina e detecção de cálcio, resultando em diferenciação osteogênica acelerada quando comparada à hidroxiapatita sozinha [23].

Neste trabalho a blenda alumina promoveu o maior valor de rigidez o que também se confirmou em seu bom resultado de análise histológica.

## CONCLUSÕES

As blendas alumina apresentaram valores mais elevados de depósito de cálcio, que são uma indicação de formação *in vitro* bem sucedida de nódulos semelhantes ao osso. O uso das blendas a base de CAC resultaram em neoformação óssea na interface lateral cimento-tecido ósseo após 4 semanas da cirurgia, indicando a formação de tecido com características de normalidad demonstrando a viabilidade do tecido ósseo. Como resultado a alumina promoveu melhor comportamento de interação com o osso com melhor formação de matriz mineralizada, maior ponte óssea neoformada e melhores resultados biomecânicos.

## AGRADECIMENTOS



Os autores agradecem a Fapesp #2016/15032-3 e #2017/22183-0 e CNPq #301665/2015-0 pelo apoio a esta pesquisa, bem como a Imerys Aluminates (França), a Vanderbilt Minerals (EUA), a NovaProm (Brasil) e BASF (Alemanha) por fornecer gentilmente amostras de CAC e aditivos.

## REFERÊNCIAS

- [1] A.M.E. Santana, D.T. Venetsanos. Numerical investigation of the effect of bone cement porosity on osteoporotic femoral augmentation. *International Journal for numerical methods in Biomedical Engineering* 34 (2018) 25-30.
- [2] M. Wu, S. Yao, Y.L. Xie, F.F. Yan, Z.M Deng, J. Lei, L. Cai. A novel subchondral bone-grafting procedure for the treatment of giant-cell tumor around the knee A retrospective study of 27 cases. *Medicine* 97 (2018) 38-42.
- [3] H-Z.Guo, Y-C.Tang, Y.X. Li, K.Yuan. D.Q. Guo, P.J. Luo, T.P. Zhou, S.C. Zhang; D. Liang. The Effect and Safety of Polymethylmethacrylate-Augmented Sacral Pedicle Screws Applied in Osteoporotic Spine with Lumbosacral Degenerative Disease: A 2-Year Follow-up of 25 Patients. *World Neurosurgery* 121 (2019) 404-410.
- [4] A.C.B. Castro, M.V.M. Collares, C.P. Portinho, P.C.Dias, R.A.Pinto. Necrose facial extensa após infiltração com polimetilmetacrilato. *Rev. Bras. Otorrinolaringologia* 73 (2007) 850.
- [5] I.R. Oliveira, V.C. Pandolfelli, M. Jacobovitz. Chemical, physical and mechanical properties of a novel calcium aluminate endodontic cement. *Internacional Endodontic Journal* 43 (2010) 1069-1076.
- [6] H. Engqvist, J-E. Schultz- Walz, J. Loof, G.A. Botton, D. Maye, M.W. Pfaneuf, N-O, Ahnfelt, L. Hermansson. Chemical and Biological Integration of a Mouldable Bioactive Ceramic Material capable of forming Apatite in vivo in Teeth. *Biomaterials* 25 (2004) 2781-2787.
- [7] F.G. Aguilar, L.F.R. Garcia, F.C.P. P. Souza. Biocompatibility of New Calcium Aluminate Cement (EndoBinder). *JOE* 38 (2012) 367-371.
- [8] L.M.S. Castro-Raucci, I.R. Oliveira, L.N. Teixeira, A.L Rosa, P.T. Oliveira, M. Jacobovitz. Effects of a novel calcium aluminate cement on the early events of the progression of osteogenic cell cultures. *Braz Dent J.* 22 (2011) 99-104.
- [9] I.R.Oliveira. Bioactivity of calcium aluminate endodontic cement. *Journal of Endodontics* 39 (2013) 774-778.
- [10] H. Engqvist, T. Persson, J. Loof, A. Faris, L. Hermansson. Chemical stability of a novel injectable bioceramic for stabilisation of vertebral compression fractures. *Trends Biomaterial Artif. Organs* 21 (2008) 98-106.
- [11] C.P. Burguer, P.C. Moraes, C.L, Maniscalco, P.A. Borges; P.A.C.S, Batista, J.C. Canola, A.E.W.B. Meirelles, M.G. Sabino, H. Rosseto. Cimento de aluminato de cálcio: uso em defeitos ósseos induzidos em fêmur de coelhos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec* 65 (2013) 757-762.
- [12] I.R. Oliveira, L.J. Raniero, V.M.C. Leite, L.M.S. Castro-Raucci. In vitro apatite-forming ability of calcium aluminate blends. *Ceramics International* 43 (2017) 10071-10079.
- [13] L. F. R. Garcia, C. Huck, L. M. Oliveira, P. P. C. Souza, C.A. S. Costa. Biocompatibility of New Calcium Aluminate Cement: Tissue Reaction and Expression of Inflammatory Mediators and Cytokines. *JOE* 40 (2014) 2024-2029.

- [14] C.A. Gregory, W. G. Gunn, A. Peister, D.J. Prockop. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Analytical Biochemistry* 329 (2004) 77–84.
- [15] E. Silva, V.F. Pereira, Vasconcellos, L.M.R, F.E. Oliveira, A.A.H. Brandão. Quality of bone repair in ovariectomized rats with bone lesions treated with phytotherapeutic and homeopathic *Arnica montana*. *Braz Dent Sci.* 20 (2017) 25-31.
- [16] C.M. Stanford, P.A. Jacobson, E.D. Eanes, L.A. Lembke, R.J. Midura. Rapidly forming apatitic mineral in a osteoblastic cell line (UMR 106-01 BSP). *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 9420-9428.
- [17] A.Togari, S.Arakawa, M. Arai, S. Matsumoto. Alteration of in vitro bone metabolism and tooth formation by zinc. *Gen. Pharmacol* 24 (1993) 1133-1140.
- [18] Castro-Raucci, L.M.S.; Teixeira, L.N.; Barbosa, A.F.S. R.R. Fernandes, W. Raucci-Neto, M. Jacobovitz, I.R. Oliveira, P.T. Oliveira. Calcium chloride-enriched calcium aluminate cement promotes in vitro osteogenesis. *Int Endod J.* 51 (2018) 674-683.
- [19] M.Y Liu, P.L.Lai, C.L.Tai. Biomechanical evaluation of low-modulus bone cement for enhancing applicability in vertebroplasty – an experimental study in porcine model. *Biomedical Engineering-applications Basis Communications* 30 (2018) 1-8.
- [20] M. Wu, S. Yao, Y.L. Xie, F.F. Yan A novel subchondral bone-grafting procedure for the treatment of giant-cell tumor around the knee A retrospective study of 27 cases. *Medicine* 97 (2018) 38-42.
- [21] M. R. Ayatollahi, S. A. Mirmohammadi, H. A. Shirazi. The tension-shear fracture behavior of polymeric bone cement modified with hydroxyapatite nano-particles. *Archives of Civil and mechanical engineering* 18 (2018) 50-59.
- [22] V. V. C. Azevedo, S. A. Chaves, D. C. Bezerra, A. C. F. M. Costa. Materiais cerâmicos utilizados para implantes. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, 31 (2008) 31-39.
- [23] H. Tavassoli, J. Javadpour, M. Taheri, M. Mehrjou, N. Koushki, F. Arianpour, M. Majidi, J. Izadi-Mobarakeh, B. Negahdari, P. Chan, M. E. Warkiani, S. Bonakdar. Incorporation of Nanoalumina Improves Mechanical Properties and Osteogenesis of Hydroxyapatite Bioceramics. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 4 (2018) 1324–1336.