

## Hidroxiapatita associada à lignina no preenchimento de falha óssea experimental na tíbia de coelhos

Cristiane Carneiro Vital<sup>1</sup>  
Andréa Pacheco Batista Borges<sup>2</sup>  
Cláudio César Fonseca<sup>2</sup>  
Breno Gonçalves Camacho<sup>1</sup>  
Renner Maia Negreiros<sup>1</sup>

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a hidroxiapatita sintética, associada à lignina (HAL), em forma de bloco, como substituta na regeneração óssea. Para tanto, foram utilizados 20 coelhos, divididos em dois grupos, com 10 animais cada. Após a realização de protocolo anestésico e cirúrgico rotineiro, foi retirado da tíbia direita um fragmento ósseo circular de 4,5 mm de diâmetro em todos os animais. No grupo I, o defeito foi preenchido com hidroxiapatita, o grupo II não recebeu tratamento, sendo utilizado como controle. Os tecidos foram incisados de maneira rotineira. Os animais foram submetidos à avaliação clínica e radiográfica imediatamente após o procedimento cirúrgico e aos 4, 8, 15, 30 e 60 dias do pós-operatório. Nas mesmas datas, exceto no dia da cirurgia, dois animais de cada grupo foram sacrificados, objetivando a coleta de material para histologia. Os resultados mostraram evolução normal no processo de regeneração óssea nos dois grupos; entretanto, nos coelhos tratados o processo de reparação óssea mostrou-se mais adiantado nas observações de 15 e 30 dias, não havendo diferença entre os grupos na análise subsequente. Com isso, concluiu-se que a hidroxiapatita associada à lignina como substituto ósseo é eficiente, não causando reação inflamatória e mostrando-se biocompatível.

**Palavras chave:** hidroxiapatita, lignina, reparação óssea

### ABSTRACT

#### Hydroxyapatite associated with lignin in the filling of experimental bone defect in rabbit's tibia

The objective of this work was to evaluate synthetic hydroxyapatite associated with lignin in solid form as substitute in bone regeneration. Twenty rabbits were divided into two groups of 10 animals each. Group one was treated with hydroxyapatite associated with lignin, whereas group two did not receive the implant. After routine anesthesia and surgical protocol, a circular bone fragment, 4.5 mm in diameter, was excised from the tibia from all animals of both groups. In the group one, the defect was filled with hal, but group two did not receive any treatment. The animals were clinically and radiographically examined daily immediately after the surgery and at four, eight, 15, 30 and 60 days after surgery to evaluate bone healing. At same time, two animals per time period were sacrificed and bone fragments were collected for histopathological evaluations. The results showed normal evolution in bone regeneration in both groups, although it was earlier in the group receiving hydroxyapatite up to the 30th day of observation. The use of hydroxyapatite associated with lignin as bone substitute was proven efficient, without inflammatory reaction and demonstrating to be biocompatible.

**Key words:** hydroxyapatite, lignin, bone regeneration.

<sup>1</sup> Estudante de pós-graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Viçosa. CEP 36570-000 Viçosa, MG. E-mails: crisvital@gmail.com, brenocamacho@yahoo.com.br, rennermaia@hotmail.com

<sup>2</sup> Departamento de Veterinária, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/UFV. Av. P.H. Rolfs, s/n. CEP 36570-000 Viçosa, MG-Brasil. E-mails: andrea@ufv.br, fonseca@ufv.br

## INTRODUÇÃO

As enfermidades ósseas e as fraturas são um sério problema de saúde que afeta significativamente a qualidade de vida de seus portadores. Em muitos casos, o tratamento de falhas ósseas requer implantes (Kokubo *et al.*, 2003). O emprego de biomateriais no reparo de partes danificadas do tecido ósseo tem revolucionado a ortopedia e odontologia atuais (Legeros, 2002, Duarte, 2003).

O grupo de biomateriais que mais se assemelha à composição do osso é o das cerâmicas de fosfato de cálcio (Rezende *et al.*, 1998, Legeros, 2002); dentre as quais a mais difundida é a hidroxiapatita (HAP), cuja estrutura química é representada pela fórmula  $C_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ . A HAP tem sido produzida sinteticamente desde o início dos anos 1970 e tem sido usada clinicamente desde o início de 1980 (Legeros, 2002).

As propriedades biológicas da hidroxiapatita sintética são bem documentadas na literatura. Ela tem sido estudada por se tratar de uma substância bioativa não tóxica que provoca pouca reação tecidual (Moreira *et al.*, 2003). A hidroxiapatita já foi utilizada na correção de defeitos ósseos no homem e em várias espécies animais, com resultados satisfatórios o suficiente para ser indicada como alternativa para a enxertia óssea na rotina clínica de ambos (Franco *et al.*, 2001; Legeros, 2002; Rezende *et al.*, 1998).

Por ter excelente capacidade osteocondutora e ser altamente biocompatível, a hidroxiapatita é ótima alternativa aos enxertos de osso esponjoso homólogo e autógeno em falhas ósseas tanto no ser humano como em animais domésticos (Rodrigues *et al.*, 2003).

A HAP é esterilizável e relativamente não-absorvível (Orr *et al.*, 2001), é vantajosa por causa de sua composição uniforme, alta biocompatibilidade, segurança (não é tóxica, nem alergênica ou carcinogênica) e pelo fato de sua microestrutura (tamanho dos poros) ser completamente controlável (Nilson *et al.*, 2004; Orr *et al.*, 2001).

A estrutura porosa da hidroxiapatita funciona como suporte passivo para a neoformação vascular, o que leva à proliferação de fatores indutores da aposição óssea (Borges *et al.*, 2000). Segundo Orr *et al.* (2001), a superfície porosa da hidroxiapatita parece fornecer um substrato adicional à proliferação do tecido ósseo. Além de ser importante com relação à resistência do material, a porosidade da hidroxiapatita também regula mecanicamente os crescimento celular e vascular. Poros maiores favorecem a invasão de células e vasos, permitindo o crescimento ósseo (Orr *et al.*, 2001).

A hidroxiapatita possui pequena resistência mecânica, por esse motivo sua aplicação clínica é limitada a áreas onde não há suporte de peso ou há cavidades ósseas (Yasunaga *et al.*, 1999).

A lignina é um componente da parede celular das plantas lenhosas que lhes fornece rigidez e age como agente permanente de ligação entre as células. É um polímero

complexo de elevado peso molecular constituído de unidades de fenil-propano. A lignina ocorre na maioria das plantas, mas sua composição não é idêntica em todas elas, já que apresenta variações em sua estrutura básica. A função biológica da lignina nas plantas vivas é formar, juntamente com a celulose e outros carboidratos da parede celular, um tecido de excelente resistência e durabilidade. Ela também reduz a permeabilidade da parede celular à água (Sjöström, 1993).

Acredita-se que a associação da hidroxiapatita com a lignina resulte em um material com maior capacidade de aderência ao osso sem que haja desprendimento de calor, problema que ocorre quando se utilizam outros polímeros.

O objetivo deste trabalho foi testar a eficiência e a biocompatibilidade da hidroxiapatita sintética (HAP-91)<sup>3</sup>, associada à lignina em forma sólida, como substituto ósseo em falha provocada na tíbia de coelhos pela avaliação de sua osseointegração, por meio de exames clínicos, radiológicos e histológicos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para realização deste experimento, foram utilizadas 20 coelhas adultas, clinicamente sadias, da raça Nova Zelândia, provenientes do setor de cunicultura do Departamento de Zootecnia da UFV.

Foram constituídos dois grupos aleatoriamente com 10 animais cada. Os coelhos do grupo I receberam hidroxiapatita associada à lignina (grupo tratado) e os animais do grupo II não receberam tratamento (grupo controle).

Após a preparação adequada do campo cirúrgico e contenção anestésica dos animais, fez-se a sedação com acepromazina<sup>4</sup> 1% na dose de 0,2 mg/kg por via intravenosa e os anestesiaram com Bubivacaína<sup>5</sup> a 0,5%, na dose de 0,5 mL/kg, por via epidural. Pelo espaço intervertebral lombo-sacro, foi feita incisão na face medial no terço médio do membro pélvico direito, expondo a tíbia por meio de incisão longitudinal da pele e afastamento do tecido muscular. Em seguida, foi produzido um orifício na cortical, na área da metafise tibial proximal, utilizando-se uma broca trefina de 4,5 mm de diâmetro, no qual foi introduzido, então, um bloco circular de diâmetro igual ao da broca de HAL nos animais do grupo I. No grupo II esse defeito provocado não recebeu tratamento, sendo utilizado como controle. Os tecidos incisados foram suturados, utilizando-se náilon cirúrgico e padrão simples contínuo.

Os animais foram submetidos a observações diárias da ferida cirúrgica durante uma semana, avaliando-se o grau de reação inflamatória baseado na presença de edema e dor, através de inspeção visual e pressão digital da área operada. Avaliou-se, ainda, também visualmente, a presença de hemorragia, de secreção purulenta e de deiscência de sutura.

<sup>3</sup> JHS Laboratório Químico LTDA.

<sup>4</sup> Aceprom<sup>4</sup> Univet S.A., São Paulo, Brasil

<sup>5</sup> BubiAbbott<sup>5</sup> Abbott Laboratórios do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil

Para análise radiográfica foram realizadas radiografias dos membros operados nas posições mediolateral e craniocaudal em todos os animais, imediatamente após a cirurgia e aos 4, 8, 15, 30 e 60 dias do pós-operatório. As radiografias foram analisadas quanto à radiopacidade e classificadas em diferentes graus, sempre comparando a falha óssea à cortical do osso circunvizinho, considerado normal (Tabela 1). Os resultados foram interpretados com auxílio de análise de variância não paramétrica, empregando-se o teste de Kruskal-Wallis.

**Tabela 1.** Classificação do grau de radiopacidade na região da falha óssea de coelhos do grupo controle e do grupo tratado com hidroxiapatita associada à lignina

Grau	Caracterização Radiográfica
0	Radiopacidade intensamente menor do que a cortical do ossocircunvizinho
1	Radiopacidade discretamente menor do que a cortical do ossocircunvizinho
2	Radiopacidade igual à cortical do osso circunvizinho
3	Radiopacidade maior do que a cortical do osso circunvizinho

Para análise histológica, dois animais do grupo controle e dois do grupo tratado foram sacrificados aos 4, 8, 15, 30 e 60 dias do pós-operatório com superdosagem de pentobarbital sódico, a fim de se coletarem amostras da região operada. Para tanto, o membro operado foi amputado na articulação coxofemoral e, em seguida, fixado em solução de formol 10% tamponado por 24 horas, após o que foi realizada a coleta de material de aproximadamente 1,0 cm<sup>3</sup> na região em que se trabalhou cirurgicamente. As amostras foram processadas segundo técnicas rotineiras de histologia e coradas em H-E e foram examinadas ao microscópio óptico. Os resultados histológicos foram interpretados por meio de análise descritiva.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Algumas horas após a cirurgia, todos os animais apresentaram deambulação normal, estando esse fato de acordo com o observado por Rezende *et al.* (1998) e Franco *et al.* (2001), mesmo se considerando o fato de que foram utilizados modelos experimentais diferentes nestes trabalhos.

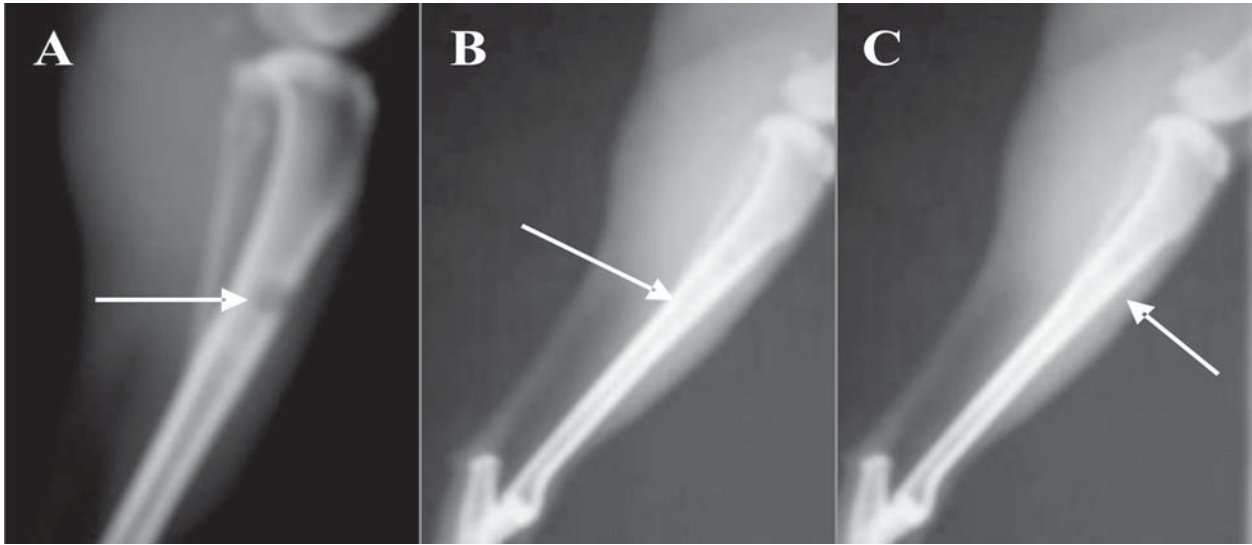
Em dois animais do grupo controle e em um do grupo tratado observou-se secreção purulenta, um dia após a cirurgia, no local da incisão. O fato de tanto os animais do grupo controle quanto os do grupo tratado terem apresentado sinais locais de infecção atribui-se ao trauma tecidual causado pela técnica cirúrgica, ou mesmo pela ocorrência de infecção no período pós-cirúrgico, já que

não se utilizou nenhum tipo de medicação preventiva, e não à reação ao implante, como descrito por Borges *et al.* (2000). A presença de secreção foi controlada com a simples limpeza da ferida cirúrgica, tendo essa não interferido no processo cicatricial da pele e desaparecido espontaneamente após alguns dias.

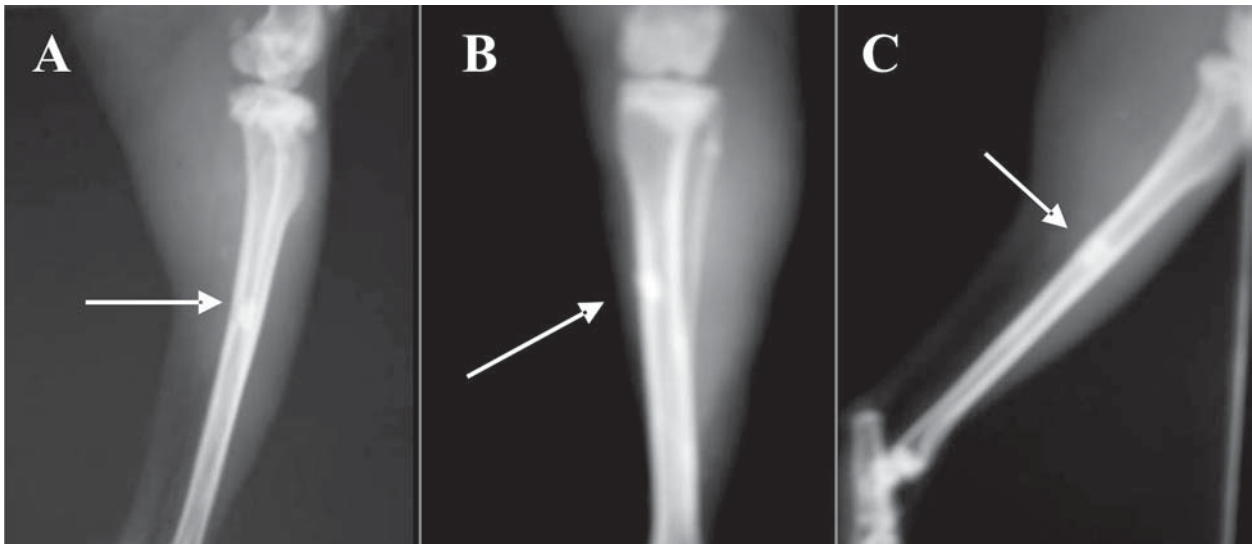
Os resultados radiográficos dos animais do grupo controle obtidos imediatamente após a cirurgia revelaram radiopacidade grau 0 na região do defeito, uma vez que a falha óssea experimentalmente produzida foi mantida sem qualquer preenchimento. Essa radiopacidade foi gradualmente aumentando até apresentar grau 3, aos 60 dias de pós-operatório (Fig. 1A, B e C). Já no grupo tratado, observou-se, no mesmo período, radiopacidade semelhante à cortical do osso vizinho, ou seja, grau 2. Nas radiografias feitas aos 4, 8, 15, 30 e 60 dias, a radiopacidade da hidroxiapatita foi gradualmente diminuindo até apresentar grau 1 (Fig. 2A, B e C). Esse fenômeno era esperado e foi descrito por Borges *et al.* (2000), devido à invasão de tecido conjuntivo no processo normal de reparação óssea. Deve-se considerar ainda que não há alteração na densidade da hidroxiapatita, uma vez que seu número atômico não se altera. Entretanto, o crescimento dos tecidos conjuntivo e ósseo ao longo do tempo e ao redor das partículas de hidroxiapatita contribui para diminuição de sua radiopacidade (Rezende *et al.*, 1998). Ao mesmo tempo em que acontecia a diminuição da radiopacidade da hidroxiapatita, o osso em formação tornava-se cada vez mais radiopaco, apresentando radiopacidade semelhante à do osso normal aos 60 dias de pós-operatório (Fig. 2C).

Considerando-se somente os aspectos radiográficos, não parece ter havido diferença na velocidade da reparação óssea entre os grupos controle e tratado, o que também foi observado por Franco *et al.* (2001). A lignina não pareceu interferir negativamente no processo de reparação, já que aos 60 dias observaram-se indícios radiográficos de que a falha óssea estava completamente preenchida por tecido de reparação semelhante ao tecido ósseo em todos os animais do grupo tratado. Este fato está de acordo com o descrito por Borges *et al.* (2000), que aos 60 dias de pós-operatório observaram reparação óssea completa na tíbia dos animais tratados com hidroxiapatita pura.

Os resultados dos exames histológicos revelaram que nos locais em que foram produzidas as falhas ósseas, nos dois grupos, não foi observada infecção pós-cirúrgica, apesar de ter sido verificada secreção purulenta no local da incisão no período pós-operatório de alguns animais. Esse fato indica que a reação inflamatória observada no período pós-operatório limitou-se à pele e aos tecidos subcutâneos. Além disso, no grupo tratado não se observou reação de rejeição ao implante, estando esses resultados de acordo com o descrito por Yasunaga *et al.* (1999) e Cehreli *et al.* (2003), indicativos da biocompatibilidade da HAL.



**Figura 1.** Radiografia da tíbia de coelhos do grupo controle em posicionamento mediolateral. A - 4 dias, radiopacidade grau 0; B - 30 dias, radiopacidade grau 1; e C - 60 dias, radiopacidade grau 2. A seta evidencia o defeito ósseo.



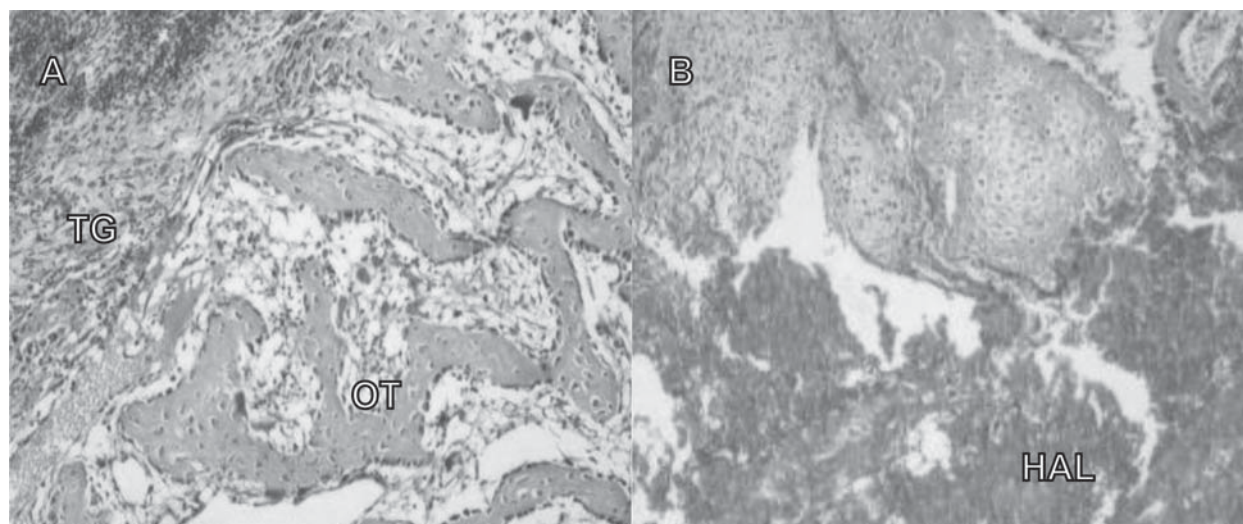
**Figura 2.** Radiografias da tíbia de coelhos tratados com hidroxiapatita associada à lignina em posicionamento craniocaudal (B) e mediolateral (A e C). A, dia 0, radiopacidade grau 2; B, 15 dias, radiopacidade grau 1; e C, 60 dias, radiopacidade grau 1. Setas: HAL preenchendo o defeito ósseo.

Aos quatro dias do pós-operatório, tanto no grupo controle quanto no tratado não havia qualquer indicação de formação óssea, porém tinha grande quantidade de osteoblastos nas bordas da lesão.

No oitavo dia de pós-operatório, foram observados nos animais do grupo controle início de reabsorção das bordas do defeito e tecido conjuntivo frouxo na sua superfície (Fig. 3A), assim como descrito por Franco *et al.* (2001) e Duarte (2003). Já no grupo tratado, aos oito dias observou-se tecido conjuntivo frouxo, desorganizado nas bordas do defeito, e tecido conjuntivo fibroso ao redor das partículas de hidroxiapatita (fig. 3B). Foi verificada pequena área de neoformação óssea circundando o implante. O atraso no grupo tratado, quando comparado ao grupo controle, pode ser

devido à inibição inicial da formação óssea pela presença da hidroxiapatita, que em primeiro momento atua como barreira física, assim como descrito por Duarte (2003).

No grupo tratado foi observado, aos 15 dias de pós-operatório, que a hidroxiapatita estava praticamente envolvida por osso trabecular (fig. 4F), o que também foi por Lopes *et al.* (2000), e havia a presença de tecido conjuntivo denso e intensa vascularização. Nos animais do grupo controle também se observou formação de tecido ósseo trabecular a partir das bordas da lesão. Entretanto, o tecido ósseo formado nos animais do grupo tratado, aos 15 dias, mostrou-se mais organizado e com trabéculas ósseas mais espessas do que o tecido formado nos animais do grupo controle (fig. 4A e B).

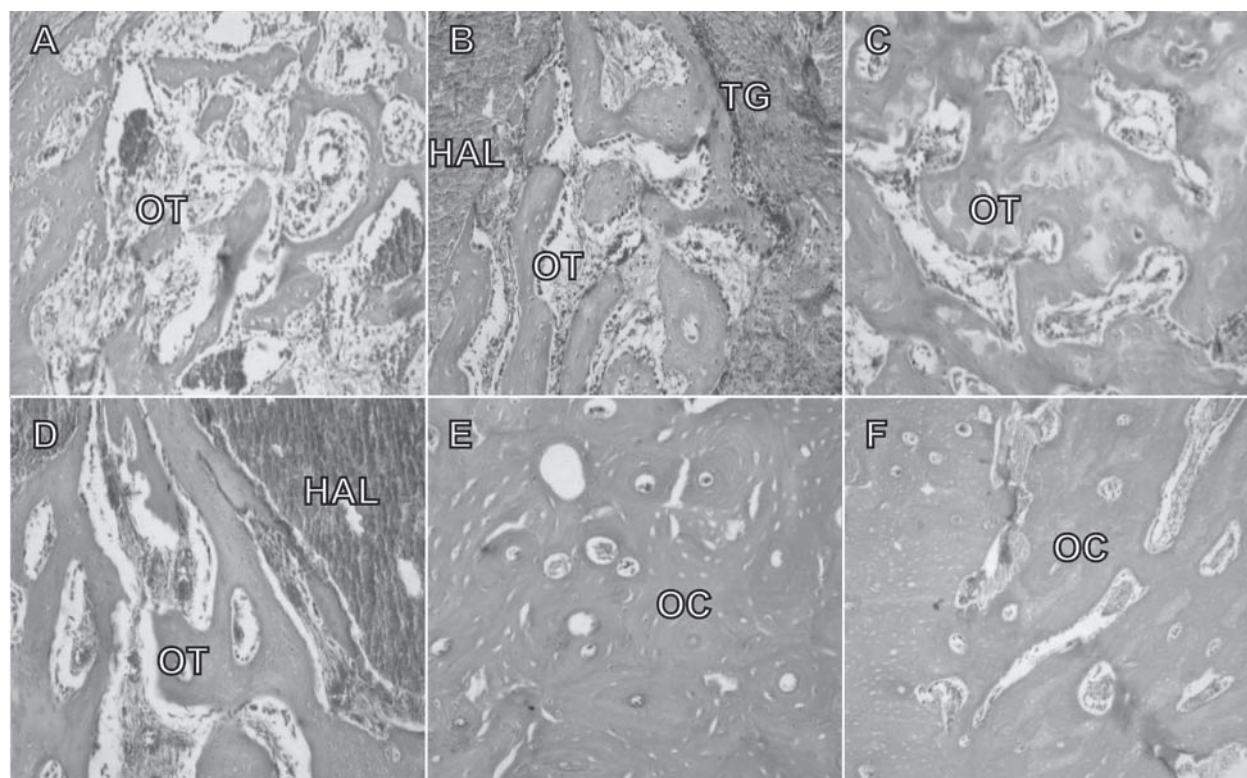


**Figura 3.** Fotomicrografias da tíbia de coelho dos grupos controle (A) e tratado (B) aos oito dias de pós-operatório. HAL: hidroxiapatita associada à lignina; OT: osso trabecular; e TG: tecido de granulação.

Aos 30 dias após a cirurgia, os animais de ambos os grupos mostraram tecido ósseo trabecular preenchendo toda a falha (fig. 4C e D), como descrito por Lopes *et al.* (2000) e Franco *et al.* (2001). Na observação de 30 dias pôde-se constatar, assim como descrito aos 15 dias, formação óssea mais evidente no grupo tratado, evidenciando-se trabéculas ósseas mais espessas e sistemas de Havers mais organizados, fato este indicativo da característica osteocondutora da

HAL, sugerindo um processo de reparação óssea mais adiantado.

Aos 60 dias, tanto no grupo controle quanto no tratado observou-se extensa formação óssea, tendo esse tecido se mostrado mais desenvolvido do que aos 30 dias (Fig. 4E e F). Embora na presença do implante a resposta óssea tenha sido mais evidente nas observações de 15 e 30 dias, o tempo necessário para a regeneração óssea foi o mesmo tanto no grupo controle quanto tratado.



**Figura 4.** Fotomicrografias da tíbia de coelho dos grupos controle (A, C e E) e tratado (B, D e F). A, 15 dias; 35x. B, 15 dias; 37x. C, 30 dias; 35x. D, 30 dias; 31x. E, 60 dias; 57x; F, 60 dias; 50x. HAL: hidroxiapatita associada à lignina; OC: osso compacto; OT: osso trabecular; e TG: tecido de granulação

## CONCLUSÃO

Com base nos resultados clínico-cirúrgicos, radiográficos e histológicos, pôde-se obter as seguintes conclusões.

- A hidroxiapatita, associada à lignina, mostrou-se biocompatível, sendo um substituto ósseo eficiente, não provocando qualquer tipo de reação inflamatória ou de rejeição do implante, não alterando o tempo necessário para que ocorresse a reparação óssea.

- Na presença do implante, a resposta óssea foi mais evidente nas observações de 15 e 30 dias, tendo, portanto, acelerado o processo de regeneração.

## AGRADECIMENTOS

À JHS Laboratório Químico Ltda. pelo fornecimento do produto testado

## REFERÊNCIAS

- Borges APB, Rezende CMF, Ribeiro MB, Melo, EG, Nobrega Neto PIN. (2000) Hidroxiapatita sintética (HAP-91) como substituto ósseo em defeito experimental provocado no terço proximal da tíbia em cão: aspectos à microscopia eletrônica de transmissão. Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia, 52:616-620.
- Cehreli MC, Sahin S, Kesenci K. (2003) Biological reactions to a poly (L-lactide)-hidroxiapatite composite: A study in canine mandible. Journal of Biomaterials Application, 17:265-276.
- Duarte TS (2003) Osseointegração da hidroxiapatita sintética no processo alveolar da mandíbula de cães. Tese de Mestrado. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 58p.
- Franco KL, Borges AB, Vilória, MIV, Fernandes, ES; Felberg, AF (2001) Hidroxiapatita sintética pura, hidroxiapatita associada ao colágeno e hidroxiapatita sintética associada ao lipossoma como substitutos ósseos em defeitos provocados na tíbia de cães: aspectos da osteointegração à microscopia de luz transmitida. Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia, 53:431-436.
- Kokubo T, Kim H & Kawashita M (2003) Novel bioactive materials with different mechanical properties. Biomaterials, 24:2161-2175.
- Legeros RZ (2002) Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. Clinical Orthopaedics and Related Research, 395:81-98.
- Lopes MA, Santos JD, Monteiro FJ (2000) Push-out testing and histological evaluation of glass reinforced hydroxyapatite composites implanted in the tibia of rabbits. Journal of Biomedical Material Research, 54:734-740.
- Moreira ASB, Pastorelli MT, Damasceno LHF (2003) Estudo experimental da influência das dimensões dos grânulos de hidroxiapatita na integração óssea. Acta Ortopédica Brasileira 11:240-250.
- Nilson M, Wang JS, Wielanek L (2004) Biodegradation and biocompatibility of a calcium sulphate-hydroxyapatite bone substitute. Journal of Bone and Joint Surgery (British Volume), 86-B:120-125.

Orr TE, Villars PA, Mitchell SL (2001) Compressive properties of cancellous bone defects in a rabbit model treated with particles of natural bone mineral and synthetic hydroxyapatite. Biomaterials, 22:1953-1959.

Rezende CMF, Borges APB, Bernis, WB, Melo, EG, Nobrega Neto, PI (1998) Aspectos clínicos-cirúrgicos e radiográficos da hidroxiapatita sintética na diáfise proximal da tíbia de cães. Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia, 50:537-545.

Rodrigues CVM, Serricella P, Linhares ABR, *et al.* (2003) Characterization of a bovine collagen-hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering. Biomaterials, 24:4987-4997.

Sjöström E (1993) Wood chemistry: fundamentals and applications. San Diego, Academic Press, 293p.

Yasunaga T, Matsusue Y, Furukawa T, *et al.* (1999) Bonding behavior of ultrahigh strength unsintered hydroxyapatite particles/poly (L-lactide) composites to surface of tibial cortex in rabbits. Bioceramics, 9:391-394.