



ESTUDO *IN VIVO* DA BIOATIVIDADE DE UM COMPÓSITO TRIFÁSICO À BASE DE HIDROXIAPATITA E PENTÓXIDO DE NIÓBIO EM SÍTIO INTRAMUSCULAR DE RATOS WISTAR

Karina Amélia Morikawa (PIBIC), Alessandro Gavazzoni (UEM), Marcelo Augusto Seron (UEM), Bruno Henrique Miotto Stabile (UEM), Luzmarina Hernandes (Orientador)
luzhernandes@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá/Centro de Ciências Biológicas, Maringá – PR

Área: Ciências Biológicas Subárea: Morfologia

Palavras chave: sítio ectópico, biocompatibilidade, biomaterial.

Resumo

Os modelos de formação de osso ectópico são extremamente usuais na avaliação da formação óssea por células-tronco, por fatores de crescimento e por novos biomateriais. Um compósito a base de hidroxiapatita e pentóxido de nióbio foi testado em modelo de avaliação ortotópica (defeito de tamanho crítico na calvária), sendo considerado biocompatível, bioativo e apresentando evidências de propriedade osteoindutoras. O objetivo deste estudo foi testar o potencial osteoindutor do compósito enriquecido com pentóxido de nióbio, empregando um modelo de avaliação ectópica. Amostra do compósito (teste) foi implantada na região posterior da pata traseira direita de ratos Wistar enquanto que a pastilha de hidroxiapatita pura (controle) foi implantada na mesma região da pata traseira esquerda do mesmo indivíduo. Em ambos os lados, o material foi implantado em posição subfacial entre os músculos gastrocnêmio e sóleo. Os animais (n=5/grupo) foram mortos após 7, 14, 21 e 28 dias. Os conjuntos musculares posteriores das pernas foram removidos para estudo *ex vivo*, com posterior processamento histológico para coloração com hematoxilina e eosina. A análise histológica permitiu observar uma progressão de acordo com os tempos de tratamento: no início havia intensa degeneração de células musculares devido ao procedimento cirúrgico, que foi sendo reabsorvido e substituído por tecido normal. Não foram encontrados sítios de inflamação próximos à pastilha, o que demonstra sua biocompatibilidade. Uma intensa angiogênese foi observada, tanto em amostras controle como naquelas implantadas com o compósito. Houve uma tendência ao encapsulamento do material. Não foi observado desenvolvimento de tecido ósseo.



Introdução

Os modelos de formação de osso ectópico são extremamente usuais na avaliação da formação óssea por células-tronco, por fatores de crescimento e por novos biomateriais. Tais modelos apresentam vantagens únicas sobre os modelos ortotópicos, incluindo uma falta relativa de estimulação de citocinas e a interação célula a célula com células endógenas (hospedeiras) formadoras de ossos. Tais características favorecem a formação óssea experimental e controlada, *in vivo* (SCOTT *et al.*, 2012). Um compósito baseado em hidroxiapatita e pentóxido de nióbio foi testado em modelo de regeneração ortotópica (defeito de tamanho crítico na calvária), sendo considerado biocompatível e bioativo e apresentando forte evidências de possuir propriedade osteoindutora. Demonstramos recentemente, em estudo estrutural da interface biomaterial-osso que o compósito baseado em hidroxiapatita e pentóxido de nióbio (HA-Nb) na forma de pastilha, foi bioativo, biocompatível e promoveu osteocondução e osseointegração quando implantado em defeito de tamanho crítico na calvária de ratos. Grande quantidade de vasos sanguíneos, células osteogênicas e osteoclastos foram vistos na superfície dos materiais (KIYOCHI JÚNIOR, 2013). Posteriormente, seu potencial osteoindutor foi demonstrado (CANDIDO, 2014). Considerando o potencial biológico deste biomaterial, o objetivo deste estudo foi testar o potencial osteoindutor do compósito, empregando um modelo de avaliação em sítio ectópico.

Materiais e métodos

Foram utilizados ratos machos, da linhagem Wistar, pesando entre 150-200g. Os animais foram mantidos antes do experimento em caixas de polipropileno em número de 5 animais/caixa em ambiente com temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 50% de umidade e ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à água e ração.

Para o experimento, foram utilizados 20 ratos. Sob efeito de uma solução anestésica, utilizando uma mistura de xilazina e quetamina na proporção 1:1, os animais foram epilados manualmente na região lateral da perna, para delimitação do sítio cirúrgico. Posteriormente, foi realizada a desinfecção da pele com uma gaze embebida em iodopovidona (PVPI). Uma incisão longitudinal de aproximadamente 1 cm foi realizada invadindo a pele, subcutâneo e músculo posterior da perna (m. gastrocnêmio e m. sóleo). Entre esses músculos foi inserido uma pastilha com forma de meia lua composta de hidroxiapatita (grupo controle) de um lado do animal e uma pastilha de um compósito baseado em hidroxiapatita e pentóxido de nióbio na perna do outro lado do animal. O fechamento da incisão foi feito por meio de 3 pontos simples na pele, com fio de nylon e posterior limpeza com soro fisiológico e nova



aplicação de PVPI. Os animais (n=5/grupo) foram mortos após 7, 14, 21 e 28 dias. Para a eutanásia foi empregada o tiopental numa dose de 120 mg/Kg, e o conjunto muscular posterior da perna foi removido para estudo *ex vivo*, com posterior processamento histológico para inclusão em parafina e coloração com hematoxilina e eosina.

Resultados e discussão

- Observação do grupo tratado por 7 dias

Os grupos tratados com HA e com HA-Nb demonstraram aspectos histológicos semelhantes. Foi possível observar um aglomerado de células basófilas ao redor do local de implantação da pastilha, junto com restos de células musculares. Observamos também uma cápsula se formando ao redor da pastilha. Além disso, havia uma grande quantidade de vasos se formando, inclusive junto com a cápsula.

- Observação do grupo tratado por 14 dias

Os grupos tratados com HA e com HA-Nb demonstraram aspectos histológicos semelhantes. Observamos uma diminuição das células basófilas e uma degeneração muscular menos intensa, quase imperceptível nas lâminas. A cápsula ao redor do sítio de implantação da pastilha estava formada e havia intensa presença de vasos na cápsula e no tecido pericapsular.

- Observação do grupo tratado por 21 dias

Os grupos tratados com HA e com HA-Nb demonstraram aspectos histológicos semelhantes. Não observamos nesse tempo de tratamento áreas de degeneração muscular, nem de tecido basofílico ao redor das pastilhas. Entretanto, há muitos vasos formados na cápsula e no tecido pericapsular.

- Observação do grupo tratado por 28 dias

Os grupos tratados com HA e com HA-Nb demonstraram aspectos histológicos semelhantes. Não observamos nesse tempo de tratamento áreas de degeneração muscular, nem de tecido basofílico ao redor das pastilhas. Entretanto, há muitos vasos formados na cápsula e no tecido pericapsular.

Não foi possível observar, histologicamente, distinção entre os grupos tratados com HA ou HA-Nb. Em ambos os tratamentos, nos grupos de 7 e de 14 dias, houve intensa destruição do tecido muscular próximo ao local de implantação da pastilha e aparecimento de células basófilas – polimorfonucleadas, que foi devido, provavelmente, ao procedimento cirúrgico para o implante, já que a HA não induz atividade inflamatória (KIYOCHI JÚNIOR, 2012) Como,



histologicamente, os grupos tratados com HA e HA-Nb obtiveram resultados semelhantes, acreditamos que esse compósito também não induz atividade inflamatória.

Além disso, a observação da neoformação angiogênica no tecido intracapsular e pericapsular demonstra que ambos os compósitos são biocompatíveis e, possivelmente, favoráveis à osteogênese, já que a angiogênese desempenha um papel crucial no crescimento e reparação óssea (KANCZLER; OREFFO, 2008).

Conclusões

Podemos concluir que tanto a pastilha de HA quanto a de HA-Nb foram biocompatíveis em sítio ectópico intramuscular de ratos Wistar.

Agradecimentos

Ao CNPq, pela bolsa concebida; à minha orientadora, Luzmarina Hernandez e ao doutorando, Alessandro Gavazzoni, que me ajudou na realização desse projeto.

Referências

CANDIDO, A. G. **Compósito baseado em HA- β TCP-Nb₂O₅ estimula a osteoindução durante o reparo de defeitos de tamanho crítico em calvária de ratos.** 2013. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá, PR, 2013.

KANCZLER, J. M.; OREFFO, R. O. C. Osteogenesis and angiogenesis: The Potential for Engineering Bone. **European Cells and Materials**, v. 15, p. 100-114, 2008.

KIYOCHI JÚNIOR, H. J. **Estudo ex vivo da Cerâmica Bifásica composta de Hidroxiapatita – Beta Fosfato Tricálcio (HA- β -TCP) e Pentóxido de Nióbio (Nb₂O₅) como Biomaterial Empregado para o Reparo Ósseo em Defeitos de Calvária.** 2013. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá, PR, 2013.

SCOTT, M. A.; LEVI, B.; ASKARINAM, A.; NGUYEN, A.; RACKOHN, T.; TING, K.; SOO, C.; JAMES, A. W. Brief review of models of ectopic bone formation. **Stem Cells and Development**, v. 21, n. 5, p. 655-667, 2012.