

Osteointegração da hidroxiapatita sintética no processo alveolar da mandíbula de cães: aspectos histológicos

[*Osteointegration of synthetic hydroxyapatite in alveolar process of mandible in dogs: histological aspects*]

T.S. Duarte¹, A.P.B. Borges^{2*}, M.S.L. Lavor¹, R. Filgueiras¹,
A.C. Tsiomis¹, F.L. Oliveira¹, K.C.S. Pontes¹

¹Aluno de pós-graduação – UFV – Viçosa, MG

²Departamento de Veterinária – UFV

Av. P.H. Rolfs, s/n

36570-000 – Viçosa, MG

RESUMO

Avaliou-se a hidroxiapatita sintética como substituto ósseo na regeneração do processo alveolar, utilizando-se 28 cães adultos hígidos, pesando entre 10 e 15kg, divididos em dois grupos. Foram criados defeitos de aproximadamente 6 x 5mm na superfície vestibular do processo alveolar até atingir a raiz do quarto pré-molar mandibular direito. Em um grupo, o defeito foi totalmente preenchido com hidroxiapatita sintética; o outro, sem tratamento, foi usado como controle. Aos 8, 15, 21, 42, 60, 90 e 120 dias, foram coletados fragmentos ósseos para a análise histológica sob microscopia óptica. Observou-se crescimento ósseo e vascular no interior dos poros de hidroxiapatita, intensa proliferação de osteoblastos e neovascularização na presença do implante. A biocompatibilidade da hidroxiapatita permitiu a sua integração com o processo alveolar por meio da formação direta de um osso lamelar. Ocorreu neoformação óssea à medida que a hidroxiapatita foi degradada.

Palavras-chave: cão, regeneração óssea, hidroxiapatita, osteocondução, osteoindução

ABSTRACT

The synthetic hydroxyapatite was evaluated as bone substitute in the regeneration of the alveolar process. Twenty-eight healthy adult dogs weighing from 10 to 15kg were divided into two groups. Defects around 6 x 5mm were provoked on the vestibular surface of the alveolar process until reaching the root of the fourth right mandibular premolar tooth. In one group the defect was totally infilled with synthetic hydroxyapatite, whereas the other untreated one was used as control. On days 8, 15, 21, 42, 60, 90 and 120, bone fragments were collected for the histological analysis under optical microscopy. The following results were observed: both bone and vascular growth inside the hydroxyapatite pores, intense osteoblast proliferations and neovascularization at the presence of the implant. The biocompatibility of the hydroxyapatite allowed its integration with the alveolar process by direct formation of a lamellar bone. The bone neoformation occurred as the hydroxyapatite was degraded.

Keywords: dog, bone regeneration, hydroxyapatite, osteoconduction, osteoinduction

Recebido em 17 de novembro de 2004

Aceito em 22 de fevereiro de 2006

*Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail: andrea@ufv.br

INTRODUÇÃO

Materiais à base de fosfato de cálcio foram testados nos últimos anos e encontram-se disponíveis para uso clínico, com o intuito de substituir o auto-enxerto ósseo em cirurgias ortopédicas (Oonishi et al., 1997). Dentre estes, encontra-se a hidroxiapatita, que tem sido empregada em tratamentos maxilofaciais e orais para aumento do rebordo alveolar e preenchimento do alvéolo após a extração do dente (Shareef et al., 1993).

O substituto ósseo ideal deve ser biocompatível e gradualmente substituído por novo tecido ósseo, além de possuir propriedade osteoindutiva ou osteocondutiva (Jensen et al., 1996). A hidroxiapatita sintética é biocompatível, não é carcinogênica e nem alergênica (Gonzalez, 1993; Oonishi et al., 1997). É um material seguro e clinicamente aceitável na obliteração de vários defeitos periodontais (Brown et al., 1998).

A hidroxiapatita atua como um substrato para a osteogênese, sendo classificada como um material osteocondutivo (Nagahara et al., 1992; De Vicente et al., 2000; Orr et al., 2001; Vital et al., 2006). No entanto, Kurashina et al. (2002) afirmam que ela possui propriedade osteoindutora quando implantada na musculatura de coelhos.

Os objetivos deste trabalho foram estudar o efeito provocado pela hidroxiapatita sintética na regeneração do osso alveolar, avaliar seu potencial osteocondutor e sua biocompatibilidade e determinar sua capacidade de acelerar o preenchimento da falha óssea com tecido ósseo neoformado.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 28 cães adultos e hípidos, pesando de 10 a 15kg. Sete dias antes de serem operados, foram everminados com ivermectina¹ (0,3mg/kg) e foram mantidos em baias individuais, onde receberam ração comercial². Todos receberam espiramicina e metronidazol³ (1 comprimido para cada 10kg) por via oral, uma vez ao dia, três dias antes e três dias após o

procedimento cirúrgico. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos eqüitativos. O grupo 1 foi tratado com hidroxiapatita sintética⁴, e o grupo 2 não recebeu tratamento, sendo utilizado como controle.

A hidroxiapatita denominada de T290800-1 é a mistura de hidroxiapatita pura de 30 mesh (HAP-91) com lipossoma do tipo DRV (reidratação de vesícula), obtendo-se um composto de hidroxiapatita absorvível.

Após sedação com acepromazina⁵ (0,1mg/kg), indução e manutenção com pentobarbital⁶ (15mg/kg) por via intravenosa, a área a ser operada foi infiltrada com lidocaína⁷ 2%, e a cavidade oral foi higienizada com solução de clorexidina 2%. Realizou-se um retalho mucoperiosteal de 1,5 x 1,5cm a 0,5cm da margem gengival do quarto pré-molar mandibular direito, que foi deslocado ventralmente, expondo a superfície vestibular do processo alveolar. Um defeito ósseo de aproximadamente 6 x 5mm foi provocado no processo alveolar, até atingir as raízes do quarto pré-molar, com o auxílio de um motor de baixa rotação⁸ e broca esférica para peça-de-mão número oito, com irrigação constante de solução salina isotônica.

O defeito ósseo provocado no grupo 1 foi completamente preenchido com a hidroxiapatita sintética previamente homogeneizada com sangue, enquanto o grupo 2 permaneceu sem tratamento. Em ambos os grupos, o retalho mucoperiosteal foi reposicionado sobre o osso alveolar e suturado com pontos simples separados com fio absorvível de poliglactina 4-0⁹.

Os animais foram mantidos em baias individuais por 14 dias e alimentados, duas vezes ao dia, com ração comercial amolecida e água à vontade. Posteriormente, passaram para baias coletivas e receberam ração comercial, porém, em sua forma natural, até o final do experimento.

⁴ Hidroxiapatita T290800-1 – J.H.S. Laboratório Químico Ltda.

⁵ Acepran 1% - Univet S.A. – Indústria Veterinária.

⁶ Pentobarbital Sódico 3% - Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda.

⁷ Lidovet – Bravet Ltda.

⁸ Motor de suspensão – Fava Ltda.

⁹ Vicryl 4-0® - Ethicon.

¹ Ivomec 1% - Merial Ltda.

² Selection Special Croc – Royal Canin Ltda.

³ Stomorgyl 10 – Merial Ltda.

No pós-operatório, receberam morfina¹⁰, por via oral (5mg/kg), imediatamente após a recuperação anestésica, e ketoprofeno¹¹ (0,1mg/kg) por via subcutânea, a cada 24 horas, durante três dias. Dois cães de cada grupo foram sacrificados aos 8, 15, 21, 42, 60, 90 e 120 dias do pós-operatório para a obtenção de uma amostra contendo defeito ósseo provocado. Esses animais seriam sacrificados para controle populacional, e tal procedimento foi realizado com sobredosagem anestésica com pentobarbital sódico intravenoso.

As amostras foram fixadas em formol tamponado a 10% e descalcificadas em solução contendo ácido fórmico a 8% e ácido clorídrico a 8%, em vácuo moderado. Adicionalmente, foram processadas pela técnica rotineira de desidratação, diafanização e inclusão em parafina, cortadas com espessura de quatro micrômetros e coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (Luna, 1968).

Nos cortes histológicos, foram avaliados o padrão de reparação óssea, qualificando o tecido ósseo neoformado e a osteointegração, e a biocompatibilidade da hidroxiapatita.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No oitavo dia do pós-cirúrgico, os animais do grupo-controle apresentaram início de reabsorção das bordas do defeito com formação de matriz óssea acelular, tecido de granulação pouco vascularizado e grande proliferação de tecido fibrovascular. No grupo tratado, não foi observada formação de matriz óssea, notando-se apenas o preenchimento do defeito por coágulo. De acordo com Donohve e Mascres (1993), a hidroxiapatita inibe, inicialmente, a formação óssea, o que pode justificar a ausência de matriz óssea neste grupo oito dias após a implantação.

Aos 15 dias, aproximadamente 90% da borda do defeito foi reabsorvida no grupo-controle, e houve formação de novo tecido ósseo caracterizado por trabéculas espessas. No grupo tratado, as partículas de hidroxiapatita mostradas como material amorfo, acelular e bem delimitado eram rodeadas por um novo osso (Fig. 1), que também estava presente em toda a superfície do defeito, permitindo a osteointegração. Em outro

ponto do defeito, na mesma data, foram vistas partículas de hidroxiapatita rodeadas apenas por tecido fibrovascular, sem formação óssea. De acordo com Callan e Rohrer (1993), o tecido fibrovascular é precursor do novo tecido ósseo.

Com 21 dias após a implantação da hidroxiapatita, a borda do defeito de um cão tinha sido parcialmente reabsorvida, havendo a formação de matriz óssea acelular e a deposição de tecido conjuntivo hemorrágico sobre a sua superfície. Além disso, a hidroxiapatita não foi encontrada. Outro animal do grupo tratado e um do grupo-controle apresentaram formação de trabéculas ósseas.

Aos 42 dias, houve formação óssea no grupo tratado, com início de diferenciação de osso trabecular em osso lamelar, caracterizado por amplos canais de Havers. No entanto, ainda foram encontrados osso trabecular não-remodelado e áreas de grande neovascularização e hemorragia, partículas de hidroxiapatita rodeadas por tecido ósseo trabecular e capilares no interior dos seus poros (Fig. 2). No grupo-controle, houve apenas aumento na formação de osso trabecular na periferia do defeito, com algumas regiões ainda não-reabsorvidas, sem a organização em osso lamelar.

Ao comparar o grupo tratado com o grupo-controle, a partir do décimo quinto dia do pós-cirúrgico, percebeu-se que a formação de osso jovem com intensa atividade de osteoblastos e a neovascularização foram mais evidentes na presença da hidroxiapatita.

Segundo Jensen et al. (1996) e De Vicente et al. (2000), a hidroxiapatita funciona como um suporte para a migração de células osteoprogenitoras originadas no receptor e nos túneis vasculares, permitindo a aposição óssea.

De acordo com White e Shors (1986), o tamanho e o grau de conexão entre os poros do biomaterial são fundamentais para o crescimento vascular e ósseo no seu interior. A porosidade da hidroxiapatita, utilizada neste experimento, permitiu o crescimento de tecido fibrovascular e a migração de células no seu interior. Tal fato induziu a formação óssea e, conseqüentemente, a regeneração óssea do processo alveolar de cães, evidenciando a propriedade osteocondutora da hidroxiapatita.

¹⁰ Dimorf – Cristália Ltda.

¹¹ Ketofen 1% - Rhodia Mérieux.

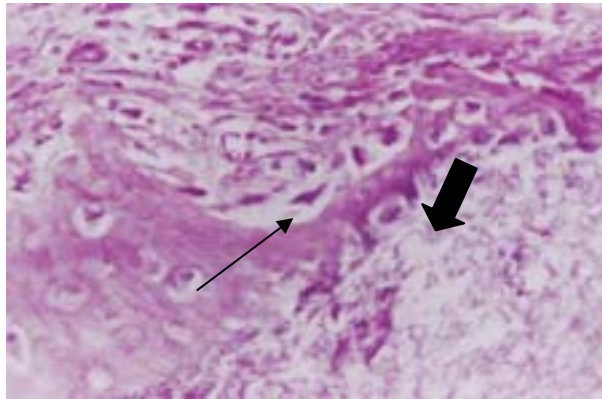


Figura 1. Partículas de hidroxiapatita (seta grande) rodeadas por osso trabecular e osteoblastos (seta fina) 15 dias após a sua implantação no defeito provocado no processo alveolar direito da mandíbula de cão. HE. 400X.

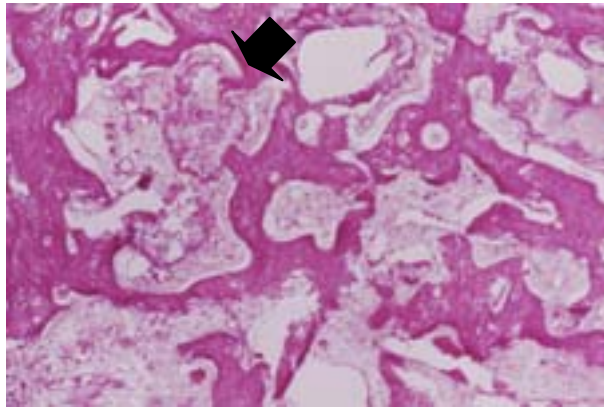


Figura 2. Partículas de hidroxiapatita (seta) rodeadas por tecido ósseo trabecular, 42 dias após a sua implantação no defeito provocado no processo alveolar direito da mandíbula de cão. HE. 100X.

A manutenção do volume e da estrutura porosa do implante, na fase inicial de regeneração óssea, é um fator importante para a função osteogênica das biocerâmicas (Jensen et al., 1996; Ripamonti, 1996; Kurashina et al., 2002). A hidroxiapatita T290800-1, usada neste experimento, manteve volume constante até 60 dias de implantação no defeito periodontal e, onde a biocerâmica estava presente, a formação óssea e a neovascularização foram mais intensas.

Segundo White e Shors (1986), a degradação da hidroxiapatita pode ocorrer por reabsorção mediada por osteoclastos ou dissolução química. De acordo com Oonishi et al. (1997), o mecanismo de reabsorção da hidroxiapatita pode envolver a fratura das partículas à medida que ocorre a formação do novo osso no interior dos poros intragranulares.

Como não foram vistos osteoclastos, é possível que tenha sofrido dissolução química ou fraturas no decorrer da formação óssea.

Aos 90 dias, tanto no grupo tratado quanto no grupo-controle, a periferia do defeito foi totalmente preenchida por osso lamelar e apenas o centro apresentou osso trabecular. Cento e vinte dias após o procedimento cirúrgico, não havia mais limite entre as margens do defeito e o novo osso formado em ambos os grupos, e o defeito estava completamente preenchido com osso compacto lamelar.

No grupo tratado, foram verificadas áreas hemorrágicas ainda aos 120 dias do pós-operatório, possivelmente devido à intensa angiogênese apresentada. A razão dura foi suficiente para causar

microlesões nos vasos recém-formados durante a mastigação e provocar hemorragia.

Neste estudo, ao contrário do encontrado por Borges (1998), ao se implantar hidroxiapatita sintética na tíbia de cães, não foram observadas células que indicassem reação de corpo estranho, nem foram reveladas necrose óssea, desintegração da matriz, osteoclasia e formação tipo sarcomatosa.

Apesar de Brown et al. (1998) afirmarem que a estabilidade do implante é essencial para promover a angiogênese precoce e a osteointegração, a instabilidade provocada pelo sangramento e pelas forças de oclusão parecem não ter influenciado a regeneração óssea.

CONCLUSÕES

A hidroxiapatita T290800-1 apresentou propriedade osteocondutora, revelou-se biocompatível e acelerou o preenchimento de defeitos provocados no processo alveolar da mandíbula de cães.

AGRADECIMENTOS

Ao JHS Laboratório Químico, Belo Horizonte/MG.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BORGES, A.P.B. *O efeito da hidroxiapatita sintética na regeneração óssea de defeito provocado experimentalmente no terço proximal da tíbia de cães (Canis familiares): Estudo clínico-cirúrgico, radiológico e histológico por microscopia de luz e microscopia eletrônica de retrodispersão*. 1998. 111f. Tese (Doutorado). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BROWN, G.D.; MEALEY, B.L.; NUMMIKOSKI, P.V. et al. Hydroxyapatite cement implant for regeneration of periodontal osseous defects in humans. *J. Periodontol.*, v.69, p.146-157, 1998.

CALLAN, C.P.; ROHRER, M.D. Use of bovine-derived hydroxyapatite in the treatment of edentulous defects: a human clinical and histologic case report. *J. Periodontol.*, v.64, p.575-582, 1993.

DE VICENTE, J.C.; LÓPEZ-ARRANS, E.; LÓPEZ-ARRANS, J.S. Tissue regeneration in bone defects

adjacent to endosseous implants: an experimental pilot study. *Int. J. Period. Rest. Dent.*, v.20, p.41-49, 2000.

DONOHVE, W.B.; MASCRETS, C.A.A. Comparison of the effects of two hydroxyapatites and a methacrylate resin on bone formation in the rat ileum. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, v.8, p.75-82, 1993.

GONZALEZ, R. Hidroxiapatita porosa HA-200. Principais características físico-químicas. *Quím. Nova*, v.16, p.509-511, 1993.

JENSEN, S.S.; AABOE, M.; PINHOLT, E.M. et al. Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, v.11, p.55-66, 1996.

KURASHINA, K.; KURITA, H.; WU, Q. et al. Ectopic osteogenesis with bifasic ceramics of hydroxyapatite and tricalcium phosphate in rabbits. *Biomaterials*, n.23, p.407-412, 2002.

LUNA, L.G. *Manual of histologic methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3.ed. New York: McGraw Hill, 1968. 257p.

NAGAHARA, K.; ISOGAI, M.; SHIBATA, K. et al. Osteogenesis of hydroxyapatite and tricalcium phosphate used as a bone substitute. *Int. J. Oral Maxillofac Implants*, v.7, p.72-79, 1992

OONISHI, H.; KUSHITANI, S.; YASUKAWA, E. et al. Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute. *Clin. Orthop. Related Res.*, n.334, p.316-325, 1997.

ORR, T.E.; VILLARS, P.A.; MITCHELL, H.P. et al. Compressive properties of cancellous bone defects in rabbit model treated with particles of natural bone mineral and synthetic hydroxyapatite. *Biomaterials*, n.22, p.1953-1959, 2001.

RIPAMONTI, U. Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models. *Biomaterials*, n.17, p.31-35, 1996.

SHAREEF, M.Y.; MESSER, P.F.; NOORT, R. Fabrication, characterization and fracture study of machinable hydroxyapatite ceramic. *Biomaterials*, v.14, p.69-75, 1993.

VITAL, C.C.; BORGES, A.P.B.; FONSECA, C.C. et al. Biocompatibilidade e comportamento de compósitos de hidroxiapatita em falha óssea na ulna de coelhos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.58, p.175-183, 2006.

WHITE, E.; SHORS, E.C. Reconstructive implant surgery and implant prosthodontics I. Biomaterial aspects of Interpore-200 porous hydroxyapatite. *Dent. Clin. North Am.*, v.30, p.49-67, 1986.