

HIDROXIAPATITA MICROGRANULAR: COMPORTAMENTO BIOLÓGICO EM TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS

Denise Tostes OLIVEIRA*

José Mauro GRANJEIRO**

Luciane MAEDA***

Marcelo CHACON***

Marcelo Araujo da FONSÊCA***

Eulázio Mikio TAGA**

Maria Sílvia de Lima TAGA****

- **RESUMO:** Micropartículas ultrafinas de hidroxiapatita sintética foram implantadas na região subcutânea de ratos. Os animais foram sacrificados nos intervalos de tempo de 3 e 24 horas e 7, 21, 30 e 60 dias após o implante, sendo os fragmentos teciduais incluídos em parafina e analisados pela microscopia óptica. A resposta tecidual induzida pela HA foi caracterizada, a partir do 7º dia, por uma inflamação crônica granulomatosa exuberante, com as células inflamatórias envolvendo as partículas. Neste trabalho não se observou nenhuma resposta imunológica exacerbada, o que reforça a biocompatibilidade do material.
- **Unitermos:** Hidroxiapatitas; implantes artificiais; macrófagos.

Introdução

Até hoje muitos materiais aloplásticos, como polímeros, teflon impregnado com carbono, cerâmica de aluminato de cálcio e outros, têm sido estudados com o objetivo de substituir o osso autógeno em diversos procedimentos cirúrgicos, porém, os resultados clínicos obtidos não foram totalmente satisfatórios, uma vez que esses materiais apresentam problemas de deiscência, extrusão e/ou mobilidade e reabsorção do osso subjacente.^{1,9} Contudo, os materiais derivados do fosfato de cálcio,

* Departamento de Patologia – Faculdade de Odontologia – USP – 17043-101 – Bauru – SP.

** Departamento de Bioquímica – Faculdade de Odontologia – USP – 17043-101 – Bauru – SP.

*** Graduandos – Faculdade de Odontologia – USP – 17043-101 – Bauru – SP.

**** Pesquisadora do Instituto Adolfo Lutz – 17015-110 – Bauru – SP.

especialmente a hidroxiapatita (HA), apresentam propriedades favoráveis, destacando-se a biocompatibilidade,² união com tecidos duros^{7,16} e uma possível atividade biológica em função da liberação de cálcio e fosfato, os quais são importantes mediadores celulares que estimulam a síntese protéica.^{8,15} Devido a estas características, seu uso é amplo em diversas áreas como cirurgia ortognática,^{3,4} aumento de rebordo alveolar,^{11,12} procedimentos endodônticos¹³ e periodontais.^{7,10}

A hidroxiapatita sintética pode ser obtida em forma de blocos e partículas, densas ou porosas. De acordo com a técnica de síntese utilizada, variando-se a temperatura e a pressão, a capacidade de dissolução do material pelo organismo é alterada e, com isso, as respostas teciduais variam.^{5,14}

O objetivo desse trabalho é analisar a resposta tecidual às micropartículas de HA, quando implantadas em tecido subcutâneo de ratos.

Material e método

Um total de 30 ratos wistar, machos, com peso de aproximadamente 160 g, foram divididos aleatoriamente em grupos de 5 animais cada, os quais receberam implantes de partículas microgranulares de HA na região dorsal subcutânea.

O material utilizado foi a HA-Microgranular sintetizada por meio de uma técnica de precipitação branda, o que permitiu a obtenção de um pó com partículas ultrafinas, grau de pureza de 100% e relação peso/volume de 1:4. O produto foi caracterizado por meio de espectrometria de infravermelho e difração de raio X.⁶

Cada animal recebeu 30 mg de HA, a qual foi implantada por meio de uma seringa de vidro de 1 ml, com o bico seccionado a fim de permitir a saída do material. Introduziu-se o pó de HA, previamente pesado na seringa, e esterilizou-se por calor seco a 160°C por 1 hora.

Os animais foram anestesiados com éter sulfúrico, realizou-se a tricotomia da região dorsal posterior e a anti-sepsia da área com álcool iodado a 3%. Em seguida, foi realizada uma pequena incisão de aproximadamente 1,5 cm de comprimento, sendo o tecido divulsionado com uma tesoura de ponta romba, e, a seringa, contendo a HA, introduzida na região subcutânea onde se depositou o material a uma distância de 4 cm do local da incisão, em direção à pata traseira do animal.

Ao final dos intervalos de tempo de 3 e 24 horas e 7, 21, 30 e 60 dias, os animais foram sacrificados e as regiões dos implantes removidas, identificadas, fixadas em formol 10% e incluídas em parafina, segundo a técnica de rotina. Cortes histológicos de 6 micrômetros de espessura foram obtidos, corados em HE e analisados ao microscópio óptico.

Resultados

As micropartículas de HA, coradas pela hematoxilina-eosina, apresentavam-se basófilas à microscopia óptica.

Nas primeiras horas (3 e 24 horas) após o implante da HA, observou-se na região subcutânea uma inflamação aguda intensa, principalmente no período de 24 horas (Figura 1), caracterizada por edema, congestão vascular, tênue rede de fibrina e grande número de polimorfonucleares (PMNs).

A partir do 7º dia (Figura 2), houve a formação de granulomas do tipo corpo estranho, altamente celularizados na periferia, com predominância de macrófagos e células gigantes multinucleadas envolvendo as partículas de HA. Na região central da área inflamada, inúmeras partículas basófilas encontravam-se livres de células inflamatórias. Circunscrevendo o processo inflamatório, notava-se a presença de um tecido de granulação exuberante com discretas áreas de fibrosamento.

Aos 21 e 30 dias a resposta inflamatória era semelhante aos 7 dias, porém, estruturalmente o granuloma apresentava-se mais maduro, com um completo envolvimento tecidual de todas as partículas de HA. Era nítida a presença de áreas negativas vacuolares (Figura 3), algumas birrefringentes, localizadas no citoplasma das células multinucleadas inflamatórias. Periféricamente, o tecido de granulação foi substituído por uma delgada cápsula fibrosa.

Após 60 dias (Figura 4), notou-se uma redução aparente no volume dos granulomas e uma maior dispersão das células inflamatórias na região subcutânea, quando comparados com os períodos experimentais anteriores. As células gigantes multinucleadas eram maiores, vacuoladas e com maior número de núcleos. Algumas figuras de mitoses foram observadas nesses granulomas.

Discussão

Vários trabalhos têm demonstrado que a configuração, a forma¹³ e o processo de síntese² das partículas de HA, utilizadas como material de implante, afetam a sua biodegradação e/ou dissolução, determinando uma resposta tecidual específica. Clinicamente, a hidroxiapatita é, quase sempre, utilizada na forma de blocos e partículas que permanecem no tecido mole, envolvidos por uma cápsula fibrosa devido à dificuldade de dissolução do material pelas células de defesa. O tamanho das partículas, obtidas a partir de diferentes técnicas de síntese, geralmente empregando-se altas temperaturas e pressão, varia de 250 a 2 000 μm .⁶ A HA-Microgranular é uma hidroxiapatita sintética que apresenta micropartículas de 10 a 50 micrômetros, dimensões estas que podem favorecer a fagocitose por células como macrófagos e fibroblastos. A HA-Microgranular apresenta ainda um grau de pureza de 100% e completa liberação de cálcio e fosfato em ácido láctico 1M,⁶ íons estes que, no tecido,

podem interferir aumentando o metabolismo celular, como foi demonstrado por Evans et al.⁵ (1984) e Orly et al.¹⁵

A inflamação aguda, induzida pela HA-Microgranular nas primeiras horas (Figura 1), foi mais exuberante quando comparada, no mesmo período experimental, com o implante de discos densos de HA,¹⁷ e isso provavelmente ocorreu devido ao tamanho das partículas.

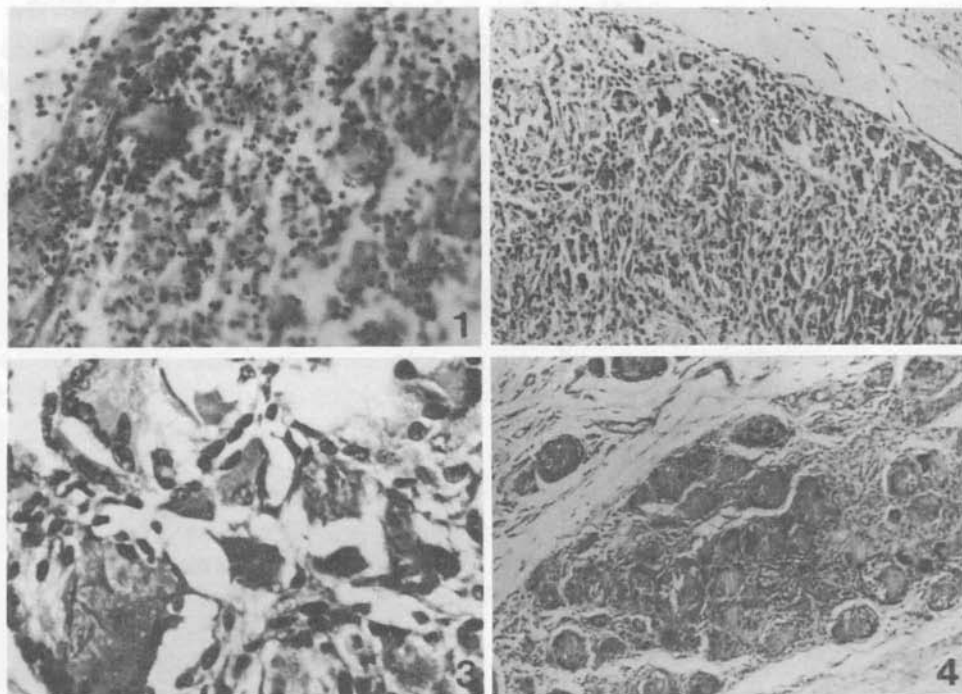


FIGURA 1 - 24 horas - Infiltrado inflamatório de PMNs envolvendo as micropartículas de hidroxiapatita. H.E. 62. 5X

FIGURA 2 - 7 dias - Presença de um granuloma do tipo corpo estranho com predominância de macrófagos e células gigantes multinucleadas inflamatórias. H.E. 25X

FIGURA 3 - 30 dias - As células gigantes multinucleadas inflamatórias presentes apresentavam inúmeros vacúolos citoplasmáticos. H.E. 100X

FIGURA 4 - 60 dias - O granuloma tipo corpo estranho apresenta uma aparente redução de volume. H. E. 25X

A partir do 7º até 60º dia (Figuras 2 e 3), a intensa celularidade da inflamação crônica granulomatosa observada, com predominância de macrófagos e células gigantes multinucleadas, pode ser associada também ao tamanho e à quantidade de partículas de HA implantadas, visto que as respostas teciduais, induzidas em tecido mole por HA densas, são caracterizadas pela formação de granulomas de curta duração

e com poucas células inflamatórias.^{13,16,17} As micropartículas da HA-Microgranular foram completamente envolvidas por macrófagos e células gigantes multinucleadas inflamatórias, inclusive no período de 60 dias (Figura 4), o que contrasta com os trabalhos de Tanaka et al.¹⁷ e Pettis et al.,¹⁶ que descreveram o encapsulamento de partículas de HA de maiores dimensões por fibras colágenas antes dos 60 dias.

A fagocitose de partículas de HA por células como macrófagos, fibroblastos e osteoblastos foi demonstrada tanto *in vivo* como *in vitro*.^{5,7,15} Assim sendo, a intensa e longa duração da reação inflamatória granulomatosa observada e a aparente redução do granuloma com 60 dias podem ser associadas a uma possível biodegradação do material.

Não foi observado envolvimento imunológico exacerbado nos granulomas induzidos pela HA-Microgranular. Isso indica que não houve rejeição do material, o que reforça sua biocompatibilidade e possibilita seu uso na clínica odontológica. Todavia, outros estudos são necessários para avaliar o comportamento biológico dessas micropartículas de HA, quando implantadas em tecidos duros, a fim de permitir uma correta indicação e adequada utilização da mesma como material de implante.

Conclusão

A ausência de rejeição das micropartículas de hidroxiapatita, no tecido subcutâneo de ratos, reforça a biocompatibilidade do material.

Agradecimento

Ao técnico Juracy do Nascimento (FOB-USP), pela colaboração na parte laboratorial deste trabalho.

OLIVEIRA, D. T. et al. Histologic evaluation of tissue response to microparticles of hydroxyapatite subcutaneously implanted in rats. *Rev. Odontol. UNESP*, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 197-202, 1993.

- **ABSTRACT:** *Ultrafine microparticles of syntetic hydroxyapatite were implanted in the subcutaneous region of rats. The animals were sacrificed at 3 and 24 hours, and 7, 21, 30 and 60 days post-operatively. The implants were formalin fixed, paraffin embeddes and analysed through light microscopy. The tissue response induced by hydroxyapatite was characterized from 7th day by a exuberant foreign body reactions with the inflammatory cells surrounding hydroxyapatite particles. In the present experiment, exacerbated immunologic response were not observed, confirming the biocompatibility of the material.*
- **KEYWORDS:** *Hydroxyapatites; implants; artificial; macrophages.*

Referências bibliográficas

1. CHE-SHOA CHANG et al. Histologic study of hydroxyapatite as an implant material for mandibular augmentation. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 41, p. 729-37, 1983.
2. DACULSI, G. et al. Crystal dissolution of biological and ceramic apatites. *Calcif. Tissue Int.*, v. 45, p. 95-103, 1989.
3. DE LANGE, G. L. et al. Histological and ultrastructural appearance of the hydroxyapatite-bone interface. *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 24, p. 829-45, 1990.
4. DENISSEN, H. W., DE GROOT, K. Immediate dental root implants from synthetic dense calcium hydroxyapatite. *J. Prosthet. Dent.*, v. 42, p. 551-5, 1979.
5. EVANS, R. W. et al. Culture human monocytes and fibroblasts solubilize calcium phosphate crystals. *Calcif. Tissue Int.*, v. 36, p. 645-50, 1984.
6. GRANJEIRO, J. M. et al. Caracterização físico-química de hidroxiapatita para uso clínico. *R. G. O.*, v. 40, p. 130-4, 1992.
7. GRÉGOIRE, M. et al. The influence of calcium phosphate biomaterials on human bone cell activities: an *in vitro* approach. *J. Biomaterials Res.*, v. 24, p. 165-77, 1990.
8. HAMMER, W. B., KLAWITTER, J. Porous aluminum oxide and high density polyethylene sponge for augmentation of the edentulous mandible. *J. Dent. Res.*, v. 55, sp. iss. B, p. B243, Feb. 1976. (Abstract 726).
9. IBBOTT, C. G. Root resorption associated with placement of a ceramic implant-report of a case. *J. Periodontol.*, v. 56, p. 419-21, 1985.
10. KENT, J. et al. Hidroxyapatite blocks and particles as bone graft: substitutes in orthognatic and reconstructive surgery. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 44, p. 597-605, 1986.
11. _____. Hidroxyapatite blocks for increase stability in orthognatic surgery. *J. Dent. Res.*, v. 64, sp. iss., p. 215, 1985. (Abstract 367)
12. KENT, J. N. Reconstruction of the alveolar ridge with hydroxyapatite. *Dent. Clin. North. Am.*, v. 30, p. 231-45, 1986.
13. MISIEK, D. J. et al. Soft tissue responses to hydroxyapatite particles of different shapes. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 42, p. 150-60, 1984.
14. OLGIVE, A. et al. The biocompatibility of hydroxyapatite implanted in the human periodontium. *J. Periodontol. Res.*, v. 22, p. 270-83, 1987.
15. ORLY, I. et al. Chemical changes in hydroxyapatite biomaterial under *in vivo* and *in vitro* biological conditions. *Calcif. Tissue Int.*, v. 45, p. 20-6, 1989.
16. PETTIS, G. Y. et al. Tissue response to composite ceramic hydroxyapatite/demineralized bone implants. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 48, p. 1068-74, 1990.
17. TANAKA, A. et al. Histologic evaluation of tissue response to sintered lanthanum-containing hydroxyapatites subcutaneously implanted in rats. *J. Osaka Dent. Univ.*, v. 23, p. 111-20, 1989.

Recebido em 4.8.1992.