

ESTUDO DA REAÇÃO TECIDUAL AO IMPLANTE SUBCUTÂNEO DE DOIS TIPOS DE PARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA EM RATOS

Nelson Luiz de MACEDO*
Maria Aparecida Neves JARDINI*
Yasmin Rodarte CARVALHO**

- RESUMO: Os autores estudaram a reação tecidual ao implante subcutâneo de hidroxiapatita (HA) em ratos. Partículas de HA de coral e HA-40 foram implantadas no subcutâneo dos animais. A análise histológica após 7, 14, 21 e 30 dias demonstrou que ambos os tipos de HA induziram respostas inflamatórias, que persistiram por todo o período de estudo. A HA de coral demonstrou menor reação inflamatória do que a HA-40. Os dois tipos de materiais utilizados não mostraram potencial osteoindutivo.
- PALAVRAS-CHAVE: Hidroxiapatitas; reparação de ferida cirúrgica.

Introdução

A regeneração dos tecidos periodontais, em pacientes com doença periodontal avançada e perda óssea, é o maior objetivo do tratamento periodontal. Durante a última década, muitos materiais foram testados e avaliados na tentativa de reverter os efeitos da destruição óssea periodontal induzida pela placa bacteriana.

Atualmente, existe uma tendência na utilização de materiais sintéticos para substituir o tecido ósseo destruído.¹¹ A procura por materiais aloplásticos continua, na tentativa de resolver alguns dos inconvenientes encontrados com a utilização de material autógeno. De todos os materiais sintéticos utilizados nos implantes ósseos, nesses últimos anos, a hidroxiapatita (HA) é o que tem levantado o maior número de pesquisas tanto em nível clínico como histológico.⁷

* Departamento de Diagnóstico e Cirurgia – Faculdade de Odontologia UNESP – São José dos Campos – 12245-000 – SP.

** Departamento de Patologia – Faculdade de Odontologia – UNESP – São José dos Campos – 12245-000 – SP.

Estudos em animais indicam que a HA é inerte e que a reparação da ferida subsequente resultou em encapsulação com colágeno.³ Em cães, Minabe et al.⁸ relataram que ocorreu cementogênese em superfícies radiculares desmineralizadas após a colocação de uma mistura de implante de HA/colágeno.

Estudos clínicos demonstraram que a implantação de HA resultou em reduções da profundidade de sondagem das bolsas e defeitos ósseos.^{5,6} Yukna et al.¹¹ compararam o debridamento cirúrgico com a implantação de HA, concluindo por maior preenchimento do defeito ósseo e menor reabsorção da crista óssea alveolar quando do uso de HA.

Avaliações histológicas, incluídas em descrições de casos, indicaram a encapsulação da HA e a ausência de resposta inflamatória.⁷ Não havia nenhuma evidência de osteogênese, cementogênese ou formação de ligamento periodontal. Ellinger et al.³ notaram o fechamento da ferida cirúrgica com uma combinação de epitélio juncional longo e adesão de tecido conjuntivo, mas também observaram a formação de osteóide com o uso de um fosfato de cálcio bifásico poroso.

A forma porosa de HA natural, desenvolvida a partir de coral do gênero *Porites*, foi avaliada como um material potencialmente útil para o tratamento de defeitos ósseos periodontais.^{12,13} Estudos clínicos também demonstraram resultados satisfatórios com a utilização de HA porosa em lesões de bifurcação.⁶ Por outro lado, outro estudo relatou que a HA não porosa promoveu maior preenchimento do defeito do que a HA porosa.⁹

Os resultados de estudos histológicos em humanos foram mais promissores. Stahl & Froum¹⁰ demonstraram ossificação nos poros do implante e união deste tecido com as estruturas ósseas contíguas na periferia do defeito. A formação óssea nos poros de implante foi notada antes de 3 meses pós-tratamento.

O mercado nacional já apresenta alguns tipos de materiais cerâmicos para serem utilizados como substitutos do tecido ósseo. Granjeiro et al.⁴ e Bonachela et al.¹ têm introduzido o uso de Biohidroxi como implante na substituição do tecido ósseo. Entretanto, alguns poucos estudos têm avaliado a efetividade desses materiais no tratamento de defeitos ósseos periodontais.*

A maioria dos autores concorda que a HA é um material biocompatível, inerte e não provoca nenhuma resposta inflamatória ou reação imune quando implantada dentro de tecidos mole e ósseo.^{7,11}

O presente estudo se propõe a avaliar a reação tecidual ante a implantação de dois tipos de hidroxiapatita no subcutâneo de ratos.

* MACEDO, N. L. et al. Tratamento de defeitos ósseos periodontais usando hidroxiapatita e barreiras artificiais. Aceito para publicação na R. G. O.

Material e método

Dois tipos de HA em grânulos foram utilizados neste estudo; um obtido a partir de coral da região de Angra dos Reis, RJ, e a HA-40 (Homus Ind. Com., São Paulo).

a) Hidroxiapatita de coral

A metodologia utilizada na preparação da HA de coral foi adaptada daquela proposta por Weber & White.¹² O primeiro passo é a remoção do material orgânico contido no esqueleto do coral (aragonita – CaCO_3), por imersão em uma solução de hipoclorito de sódio a 5% por pelo menos 30 horas. Após a oxidação dos tecidos moles, a amostra é lavada em água destilada e seca a 90°. Jatos de ar comprimido podem ser usados para ajudar na eliminação dos constituintes orgânicos liquefeitos. A completa conversão hidrotérmica da aragonita (CaCO_3) em hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ é feita com tratamento por 24 horas em meio fluido contendo $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e H_2O , mantido a 300° 15.000 psi. Entretanto, para este estudo, após a eliminação de todo o material orgânico, colocamos a HA em solução de H_2O_2 20 volumes por 30 dias. Após nova lavagem, secagem e obtenção do material na forma de grânulos, ele foi esterilizado em estufa a 160°C durante uma hora.

b) Procedimento cirúrgico

Para o presente trabalho, foram utilizados 12 ratos albinos, machos, com peso entre 150 e 200 gramas. Estes animais, durante todo o período experimental, foram alimentados com dieta sólida comercialmente preparada e água *ad libitum*.

Para o ato operatório, os ratos foram anestesiados por inalação de éter sulfúrico, após o que foi feita a tricotomia da região dorsal. Após a anestesia e a assepsia do campo operatório, fizemos duas incisões longitudinais, com afastamento de 3 cm uma da outra, com lâmina de bisturi, intercambiável nº 15, na região dorsal, acompanhando a linha mediana, numa extensão de 2 cm. A divulsão, em nível de tecido conjuntivo subcutâneo, foi realizada com tesoura curva de ponta romba, o suficiente para a colocação do material a ser testado. As incisões foram suturadas com pontos interrompidos com Mononylon* procurando uma reparação por primeira intenção.

c) Estudo histológico

Os animais foram sacrificados nos prazos de 7, 14, 21 e 30 dias para a remoção da porção de tecido conjuntivo contendo o material implantado. As peças foram

* Johnson & Johnson – Ethicon.

imediatamente fixadas em solução de formol a 10% por um mínimo de 48 horas, descalcificadas e processadas rotineiramente para corte histológico com cerca de 5 μ de espessura e coradas pela hematoxilina e eosina.

Resultado

Os cortes histológicos mostraram fragmentos de pele, cuja epiderme era constituída por epitélio pavimentoso estratificado ortoqueratinizado. Anexos cutâneos, representados por pêlos e glândulas sebáceas, estavam presentes. Na derme notou-se tecido conjuntivo fibroso contendo feixes de fibras colágenas dispostos em direções variadas, com fibroblastos e fibrócitos de permeio. Na profundidade havia algumas células adiposas abaixo das quais verificou-se camada de fibras musculares estriadas. Os grânulos de HA foram observados no tecido conjuntivo frouxo subjacente a essa delgada camada muscular.

7 dias

Grupo HA-40: no tecido conjuntivo foram observados diversos espaços claros, previamente ocupados pelas partículas de HA. Estes exibiam dimensão variada e contorno irregular. Margeando os espaços e delineando seu contorno, notou-se pigmento negro, finamente granular, por vezes formando aglomerados mais densos. Em alguns locais houve proliferação de tecido conjuntivo frouxo para o interior destes espaços, com pigmento negro associado. Em torno das partículas observou-se tecido de granulação contendo numerosos fibroblastos e vasos sanguíneos neoformados, com moderado infiltrado inflamatório mononuclear difuso, constituído predominantemente por macrófagos e com poucas células gigantes multinucleadas de permeio (Figura 1). Um dos espécimes exibiu eosinófilos no infiltrado inflamatório. Em algumas regiões notou-se rede de fibrina contendo hemácias em torno das partículas. Escassa formação de fibras foi observada perifericamente.

Grupo Coral: no tecido conjuntivo subcutâneo notaram-se diversos espaços anteriormente ocupados pelas partículas de HA, com contorno irregular e dimensão variada. Em torno destes, na interface com as partículas, viu-se tecido de granulação contendo infiltrado inflamatório mononuclear predominantemente macrofágico. Células gigantes multinucleadas estavam presentes, assim como edema, focos de hemorragia e rede de fibrina (Figura 2). Um dos espécimes apresentou eosinófilos em meio ao infiltrado inflamatório. Em algumas regiões houve proliferação de tecido conjuntivo frouxo para o interior dos espaços e mais externamente discreta fibrose. Áreas localizadas em apenas dois cortes examinados mostraram escassa quantidade de pigmento negro, pulverizado no interior dos espaços.

14 dias

Grupo HA-40: em torno dos espaços claros, na interface com o material implantado, notou-se infiltrado inflamatório mononuclear predominantemente macrofágico, contendo alguns linfócitos e plasmócitos. Células gigantes multinucleadas estavam presentes, assim como alguns eosinófilos e discreta fibrose mais externamente. Projetando-se para o interior dos espaços claros, notou-se crescimento de tecido conjuntivo frouxo, formando algumas traves, com infiltrado inflamatório mononuclear discreto. Os espaços claros e essas traves de tecido conjuntivo achavam-se contornados por pigmento negro, finamente granular, por vezes formando grumos mais grosseiros. Em algumas regiões via-se o pigmento disperso sobre o tecido ou no interior dos espaços claros. Nestes casos não se observou qualquer reação especificamente em torno do material depositado (Figura 3).

Grupo Coral: os espaços claros irregulares estavam contornados por infiltrado inflamatório, que na interface com o material implantado era predominantemente macrofágico, com algumas células gigantes multinucleadas. Caminhando para a periferia, notaram-se também alguns linfócitos e plasmócitos, de permeio com fibroblastos dispostos paralelamente e discreta formação de fibras colágenas (Figura 4). Áreas de edema e infiltrado eosinofílico foram observados, assim como discreto crescimento de tecido conjuntivo para o interior dos espaços claros.

21 dias

Grupo HA-40: os espaços claros irregulares estavam contornados por tecido conjuntivo frouxo, com infiltrado inflamatório predominantemente macrofágico, contendo algumas células gigantes multinucleadas e escassos linfócitos e eosinófilos. Traves de tecido conjuntivo frouxo projetavam-se para o interior dos espaços, com infiltrado inflamatório associado. Focos de hemorragia intersticial, congestão vascular e áreas de edema foram observados, assim como discreta fibrose periférica. Pigmento negro, finamente granular, contornava os espaços claros, por vezes distribuído difusamente sobre o tecido (Figura 5).

Grupo Coral: os espaços claros estavam contornados por tecido conjuntivo exibindo infiltrado inflamatório mononuclear, predominantemente macrofágico, com formação de células gigantes multinucleadas. Este infiltrado era em geral menos intenso do que aos 14 dias. Em situação periférica notavam-se alguns linfócitos, plasmócitos e eosinófilos. Áreas de proliferação vascular, focos de hemorragia, congestão e edema foram observados. Externamente ao infiltrado inflamatório em torno dos espaços, notou-se fibrose, ora discreta, ora mais espessa (Figura 6). Discretas traves de tecido conjuntivo frouxo, contendo escasso infiltrado inflamatório mononuclear com algumas células gigantes multinucleadas, projetavam-se para o interior dos espaços claros.

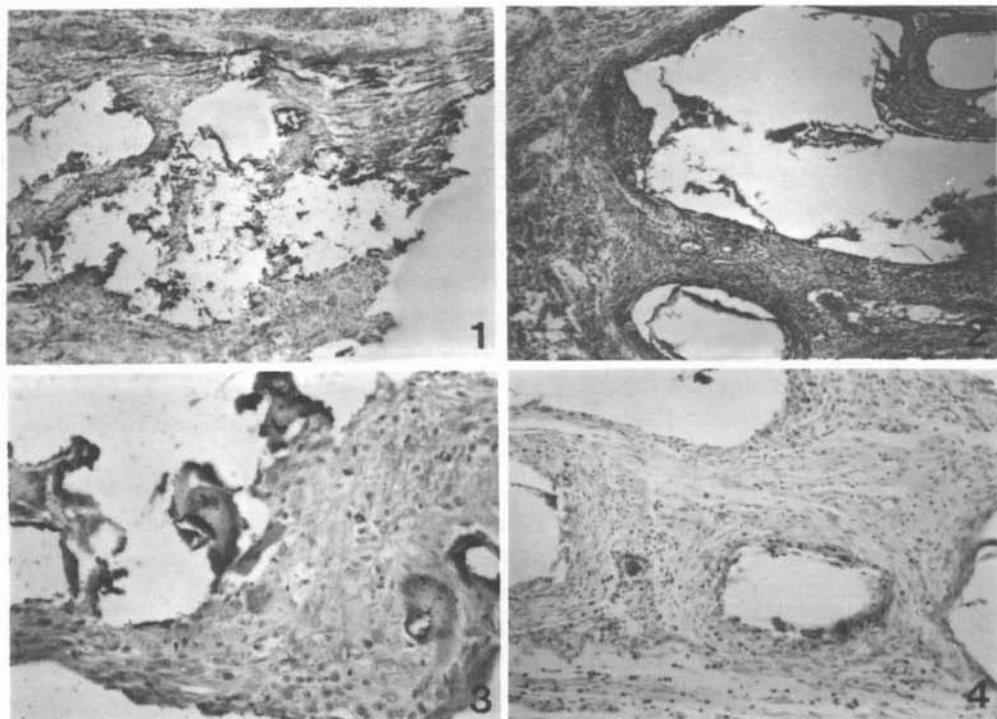


FIGURA 1 - Hidroxiapatita HA-40, 7 dias. Espaços correspondentes às partículas, irregulares, contornados por pigmento negro e circundados por tecido de granulação com infiltrado inflamatório mononuclear. HE, $\pm 90 \times$.

FIGURA 2 - Hidroxiapatita de coral, 7 dias. Espaços correspondentes às partículas, circundados por tecido de granulação com infiltrado inflamatório mononuclear e discreta fibrose externa. Ausência de pigmento negro. HE, $\pm 80 \times$.

FIGURA 3 - Hidroxiapatita HA-40, 14 dias. Pigmento negro observado em torno dos espaços correspondentes às partículas, difusamente em meio ao tecido de granulação e em algumas células gigantes multinucleadas. HE, $\pm 325 \times$.

FIGURA 4 - Hidroxiapatita de coral, 14 dias. Tecido de granulação com discreto infiltrado inflamatório mononuclear e discreta fibrose periférica em torno dos espaços correspondentes às partículas. Ausência de pigmento negro. HE, $\pm 175 \times$.

30 dias

Grupo HA-40: os espaços claros irregulares estavam contornados por tecido conjuntivo contendo infiltrado inflamatório predominantemente macrófagico, com algumas células gigantes multinucleadas de permeio. O infiltrado era mais discreto que nos prazos anteriores e mais circunscrito, com fibrose periférica discreta, áreas de tecido de granulação, focos de hemorragia e escassos linfócitos e eosinófilos. Traves de tecido conjuntivo frouxo contendo infiltrado inflamatório projetavam-se para o

interior dos espaços claros. Pigmento negro, finamente granular, foi observado contornando os espaços claros (Figura 7).

Grupo Coral: os espaços claros irregulares estavam circundados por infiltrado inflamatório macrofágico, com células gigantes multinucleadas de permeio. Este infiltrado estava bem circunscrito por fibrose e era menos intenso do que nos períodos anteriores de observação (Figura 8). Áreas de tecido de granulação, com proliferação fibroblástica e vascular com raros linfócitos e eosinófilos de permeio, foram observadas. Não foi notada proliferação tecidual para o interior dos espaços.

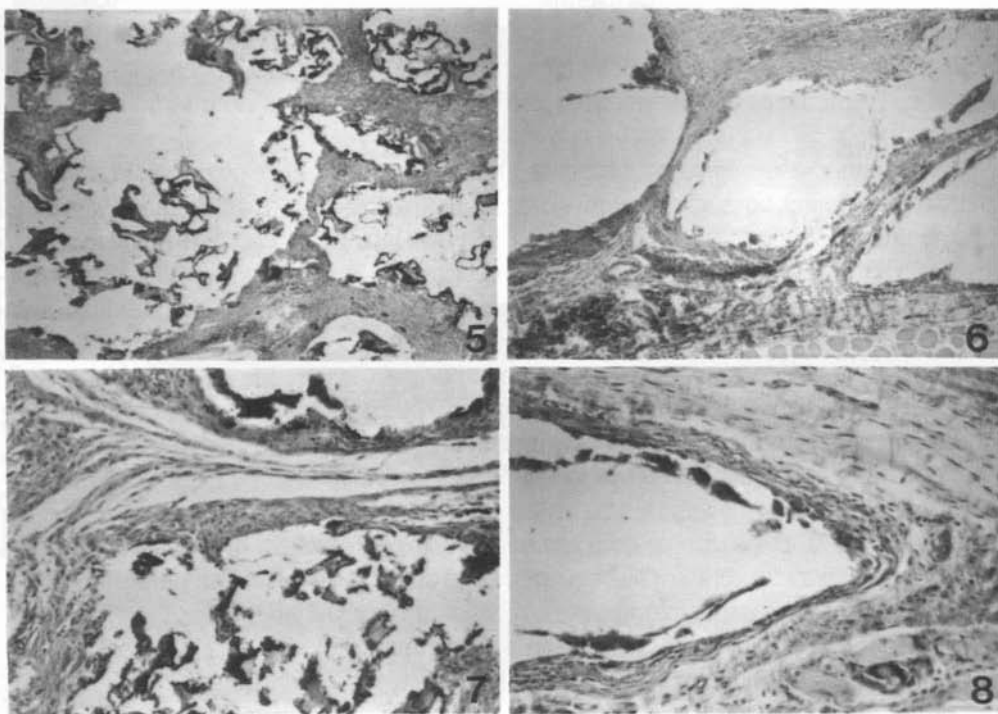


FIGURA 5 – Hidroxiapatita HA-40, 21 dias. Traves de tecido conjuntivo contendo infiltrado inflamatório mononuclear e algumas células gigantes multinucleadas, projetando-se para o interior dos espaços das partículas, margeados por pigmento negro. HE, $\pm 70 \times$.

FIGURA 6 – Hidroxiapatita de coral, 21 dias. Fibrose em torno dos espaços correspondentes às partículas, com escasso infiltrado inflamatório mononuclear contendo algumas células gigantes multinucleadas. Ausência de pigmento negro. HE, $\pm 80 \times$.

FIGURA 7 – Hidroxiapatita HA-40, 30 dias. Espaços correspondentes às partículas margeados por pigmento negro e circundados por fibrose e escasso infiltrado inflamatório mononuclear. HE, $\pm 175 \times$.

FIGURA 8 – Hidroxiapatita de coral, 30 dias. Fibrose e escasso infiltrado inflamatório mononuclear contendo algumas células gigantes multinucleadas em torno do espaço correspondente à partícula. Ausência de pigmento negro. HE, $\pm 200 \times$.

Discussão

O exame macroscópico da pele removida dos animais mostrou que em muitos casos o material implantado estava localizado imediatamente abaixo da incisão e sutura. Tal fato, porém, não parece ter interferido na reação ocorrida em torno das partículas implantadas, conforme se observou ao exame microscópico. Neste constatou-se que a reação era semelhante à observada nos animais em que os fragmentos estavam distantes da incisão. Não houve reação supurativa em qualquer dos espécimes examinados.

O exame microscópico dos fragmentos demonstrou a localização das partículas implantadas no tecido subcutâneo. As partículas de hidroxiapatita foram removidas pelos procedimentos de descalcificação, restando no local espaços claros, cujo contorno e dimensões eram mais irregulares no caso da HA-40 do que no da HA de coral.

Margeando estes espaços, notou-se, nos diversos prazos de observação, infiltrado inflamatório mononuclear, com predomínio de macrófagos. Células gigantes multinucleadas foram também observadas nos diversos períodos, algumas das quais exibiam vacúolos claros no citoplasma, sugerindo atividade fagocitária. A reação inflamatória foi mais intensa nos períodos iniciais, tendo-se notado aos 30 dias uma redução desta intensidade, porém, com persistência do infiltrado inflamatório, nos dois grupos experimentais. Este estudo corrobora as descrições de outros autores⁷ que mostraram o envolvimento dos grânulos de HA com tecido conjuntivo. Concordeando com El Deeb et al.,² não observamos osteogênese nos tecidos subcutâneos, o que demonstra que a HA não é um material osteoindutivo.

De modo geral, nos animais do grupo HA-40 a reação inflamatória em torno dos espaços claros foi mais difusa, com menor fibrose periférica do que no grupo coral, em que se notou maior tendência à circunscrição do processo e fibrose periférica. Este aspecto foi verificado especialmente nos prazos de 21 e 30 dias, porém, tal tendência à maior delimitação do processo em torno dos grânulos do material implantado foi notada já aos 7 e 14 dias.

Proliferação de tecido conjuntivo frouxo nos espaços claros foi observada, o que aparentemente representa o crescimento tecidual para o interior dos poros do material implantado. Nos implantes de HA-40 este crescimento tecidual foi mais intenso, proporcionando, após a descalcificação, um aspecto tecidual reticular. Tal fato sugere, de acordo com o raciocínio acima, que a HA-40 parece ser mais porosa do que a de coral. Entretanto, como demonstrado por Granjeiro et al.,⁴ os grânulos de HA-40 são formados por várias partículas menores agregadas entre si provavelmente por algum tipo de material aglutinante, o que produz a formação de pequenos espaços por onde os tecidos podem se proliferar.

Em todos os espécimes do grupo HA-40 notou-se a presença de pigmento negro, finamente granular, depositado na interface do grânulo de HA com o tecido circundante. Por vezes o pigmento era observado no interior dos espaços claros ou difuso

sobre o tecido, aparentemente como resultado da dispersão dos pigmentos após a remoção da HA por descalcificação. Não se observou reação especificamente em torno destes pigmentos. Não foi possível determinar, pelo método empregado, a natureza de tais pigmentos encontrados apenas no grupo HA-40. Granjeiro et al.⁴ demonstraram, por espectrometria de infravermelho e fluorescência de raios X, a presença de contaminantes e impurezas, como: titânio, estrôncio, ferro, enxofre e potássio; é bem provável que os pigmentos encontrados correspondam aos contaminantes descritos.

Levando em consideração os resultados descritos e a literatura disponível, seria aconselhável procurar outros materiais com propriedades osteoindutivas como os enxertos autógeno e alogênico, ou outra modalidade de tratamento de defeitos ósseos periodontais como a regeneração tecidual dirigida.

Conclusão

- Os dois tipos de materiais utilizados induziram respostas inflamatórias que persistiram por todo o período de estudo.
- A HA de coral demonstrou menor reação inflamatória do que a HA-40.
- A HA-40 apresentou pigmentos escuros, de natureza granular, que podem corresponder a contaminantes ou impurezas.
- As HAs estudadas não apresentam potencial osteoindutivo, o que, somado a outras características dos materiais cerâmicos, não justifica a sua utilização como material de implante para substituir o tecido ósseo.

Agradecimento

Mônica Maria de Oliveira Guimarães (Auxiliar Acadêmica)
Guilherme Ortiz Mello (Técnico de Laboratório)

MACEDO, N. L. de, JARDINI, M. A. N., CARVALHO, Y. R. Study of the tissue reaction to the subcutaneous implantation of two kinds of hydroxyapatite in rats. *Rev. Odontol. UNESP (São Paulo)*, v.24, n.1, p.19-28, 1995.

- **ABSTRACT:** *The authors studied the tissue reaction to the hydroxyapatite (HA) implant in rats. Granules of the coral HA and HA-40 were implanted in the animals. Histologic analyse after 7, 14, 21 and 30 days showed inflammatory reaction in all experimental periods. Coral HA presented lower inflammation than HA-40. Both materials did not present osteogenic induction.*
- **KEYWORDS:** *Hydroxyapatites; wound healing.*

Referências bibliográficas

- 1 BONACHELA, W. C. et al. Manutenção do rebordo alveolar com hidroxiapatita microgranular. *R. G. O.*, v.40, p.212-3, 1992.
- 2 EL DEEB, M., ROSZKOWSKI, M., EL HAKIN, I. Tissue response to hydroxylapatite in induced diabetic and nondiabetic rats: histologic evaluation. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v.48, p.476-81, 1990.
- 3 ELLINGER, R. F., NERY, E. B., LYNCH, K. L. Histological assessment of periodontal osseous defects following implantation of hydroxyapatite and biphasic calcium ceramics. A case report. *Int. J. Periodont. Restorat. Dent.*, v.6, p.22-33, 1986.
- 4 GRANJEIRO, J. M. et al. Hidroxiapatita para uso clínico: caracterização físico-química. *R. G. O.*, v.40, p.130-4, 1992.
- 5 GRIFFITHS, G. R. New hydroxyapatite ceramic materials: Potential use for bone induction and alveolar ridge augmentation. *J. Prosthet. Dent.*, v.53, p.109-14, 1985.
- 6 KENNEY, E. B. et al. The use of a porous hydroxylapatite implant in periodontal defects. II. Treatment of class II furcation lesions in lower molars. *J. Periodontol.*, v.59, p.67-72, 1988.
- 7 MEFFERT, R. M. et al. Hydroxylapatite as an alloplastic graft in the treatment in the human periodontal osseous defects. *J. Periodontol.*, v.56, p.63-71, 1985.
- 8 MINABE, M. et al. Histological study of the hydroxylapatite-collagen complex implants in periodontal osseous defect in dogs. *J. Periodontol.*, v.59, p.671-8, 1988.
- 9 RABALAIS, M. L., YUKNA, R. A., MAYER, E. T. Evaluation of durapatite ceramic as an alloplastic implant in periodontal osseous defects. I. Initial six-month results. *J. Periodontol.*, v.52, p.680-9, 1981.
- 10 STAHL, S. S., FROUM, S. Histological and clinical responses to porous hydroxylapatite implants in human periodontal defects. Three to twelve months postimplantation. *J. Periodontol.*, v.58, p.689-95, 1987.
- 11 YUKNA, R. A. et al. Six month evaluation of Calcitite (hydroxyapatite ceramic) in periodontal osseous defects. *Int. J. Periodont. Restorat. Dent.*, v.6, p.34-45, 1986.
- 12 WEBER, J. N., WHITE, E. W. Replamineform: a new process for preparing porous ceramic, metal, and polymer prosthetic materials. *Science*, v.176, p.922-4, 1972.
- 13 WHITE, E. W. et al. Replamineform porous biomaterials for hard tissue implant applications. *Biomed. Mater. Res. Symposium*, v.6, p.23-7, 1975.

Recebido em 9.5.1994.