

AVALIAÇÃO DE UM COMPLEXO
DE HIDROXIAPATITA/COLÁGENO COMO
MATERIAL PARA AUMENTO DE CONTORNO
ÓSSEO EM IMPLANTES SUBPERIOSTEAIS.
ESTUDO HISTOLÓGICO EM RATOS

Marisa Aparecida Cabrini GABRIELLI*

Gilberto GÓISSIS**

Tetuo OKAMOTO***

Mário Francisco Real GABRIELLI*

Eduardo HOCHULI-VIEIRA*

- RESUMO: O presente estudo avaliou histologicamente o comportamento biológico de um composto experimental de hidroxiapatita-colágeno implantado em posição subperiosteal em calotas cranianas de ratos. Cinco animais foram sacrificados para cada período experimental, aos 5, 15, 30, 60 e 120 dias de pós-operatório, sendo obtidos cortes semi-seriados dos espécimes para exame histológico. Os resultados demonstraram que o material estudado é biocompatível e sofre reabsorção intensa. Nos períodos tardios, os grânulos de hidroxiapatita do composto apresentaram-se cercados por osteoblastos que aparentemente depositavam matriz orgânica em sua superfície.
- PALAVRAS-CHAVE: Materiais biocompatíveis; hidroxiapatita; colágeno; implantes aloplásticos.

* Departamento de Diagnóstico e Cirurgia – Faculdade de Odontologia – UNESP – 14801-903 – Araraquara – SP.

** Departamento de Físico-Química – Faculdade de Química da USP – 13560-970 – São Carlos – SP.

*** Departamento de Diagnóstico e Cirurgia – Faculdade de Odontologia – UNESP – 16015-050 – Araçatuba – SP.

Introdução

Atualmente há um grande interesse nos biomateriais que poderiam ser utilizados como substitutos dos enxertos ósseos para diversas aplicações cirúrgicas em áreas do crânio e da face. Quando necessitamos algum tipo de material para as finalidades acima descritas, certas propriedades mecânicas e biológicas são desejáveis, porém, às vezes, difíceis de serem obtidas. Essas propriedades incluem biointegridade, resistência às forças musculares ou mastigatórias atuantes, fácil aplicação e estabilidade a longo prazo.¹⁶

A ausência ou mínima resposta de infiltrado inflamatório e ausência de reação de corpo estranho no hospedeiro à hidroxiapatita, é ilustrada em inúmeros trabalhos na literatura, mostrando que o material não apresenta toxicidade sistêmica ou local, tendo, portanto, excelente biocompatibilidade.^{8, 12}

A hidroxiapatita é um material cerâmico, radiopaco, biocompatível, não reabsorvível, podendo ser classificado como uma cerâmica policristalina, pelo fato de ser composta por cristais de fosfato de cálcio.^{8, 19} Dentre os materiais sintéticos, a hidroxiapatita apresenta-se com grande semelhança à porção mineral do tecido ósseo, sendo constituída por íons cálcio e fosfato. É encontrada em blocos ou grânulos, com a estrutura de seus cristais porosa, permitindo que por esses poros se formem arcabouços para crescimento de tecido ósseo.^{5, 24}

O uso de hidroxiapatita em bloco em áreas recobertas por tecidos moles cria irregularidades superficiais, em razão de suas proeminências, que prejudicam a estética, principalmente na região frontal do crânio e rebordos orbitários, onde a musculatura é bastante delgada. Por outro lado, a hidroxiapatita granular, quando misturada e em forma de pasta, pode ser facilmente aplicada e moldável, refazendo adequadamente o contorno da área a ser reconstruída, mesmo em regiões recobertas por tecidos moles delgados. Marchac,²⁰ Byrd et al.⁷ e Burstein et al.⁶ descrevem a utilização de hidroxiapatita granular para uma variedade de pequenos defeitos no esqueleto craniofacial, em diferentes localizações anatômicas, substituindo enxertos ósseos autógenos e evitando, assim, para o paciente, uma segunda área cirúrgica, mais morbidade e aumento do tempo operatório.

Uma das dificuldades da utilização da hidroxiapatita em grânulos é manter as partículas confinadas ao leito receptor. Nas cirurgias reconstrutivas, algumas complicações são freqüentes, dentre elas o deslocamento

e migração dos grânulos, a falta de estabilidade e a desconfiguração anatômica da área reconstruída, considerados desvantagens desse tipo de material.¹⁰ Por isso, materiais para confinar os grânulos da hidroxiapatita têm sido utilizados. A literatura mostra diversas associações da hidroxiapatita com materiais biocompatíveis que serviriam para impedir a migração das partículas até que fossem envolvidas por tecido do hospedeiro.^{3, 13, 17} Nesse sentido, Bell & Bernie⁴ verificaram a viabilidade da mistura de colágeno como matriz para partículas de hidroxiapatita, sem haver observado diferenças na resposta tecidual em relação ao uso das cerâmicas individualmente.

Recentemente, Vargas Neto* testou uma associação de hidroxiapatita/colágeno em defeitos ósseos de três paredes preparados no arco zigomático do rato, material produzido pelo Instituto de Química de São Carlos (USP), que demonstrou maior atividade osteogênica em relação a uma marca comercial de hidroxiapatita existente no mercado. O presente estudo visa avaliar o mesmo material em implantes subperiosteais, como material alternativo para reconstrução de contornos ósseos.

Material e método

Para o presente estudo foram utilizados 25 ratos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar), alimentados, no pré e pós-operatório dos períodos experimentais, com ração sólida** e água ad libitum. Após indução de anestesia geral por infiltração intraperitoneal de hidrato de cloral*** a 10%, na dosagem aproximada de 0,4 ml/100grs de peso corporal, foram realizadas depilações das calotas cranianas dos animais, bem como desinfecção do campo operatório com Merthiolate incolor****. Realizou-se, então, uma incisão no sentido crânio-caudal de 0,5 cm de comprimento sobre o osso frontal de cada animal, incluindo o perióstio (Figura 1).

Após incisão, o perióstio foi rebatido do lado direito da calota craniana, criando bolsa subperiosteal de aproximadamente 1 cm de compri-

* VARGAS NETO, J. (Faculdade de Odontologia, UNESP – Campus de Araraquara). Comunicação pessoal, 1999.

** Ração Atividade Produtor, Anderson Clayton S.A.

*** Sal cloral hidrato puro – Reagen – Quimibras Indústrias Químicas S.A.

**** Lilly

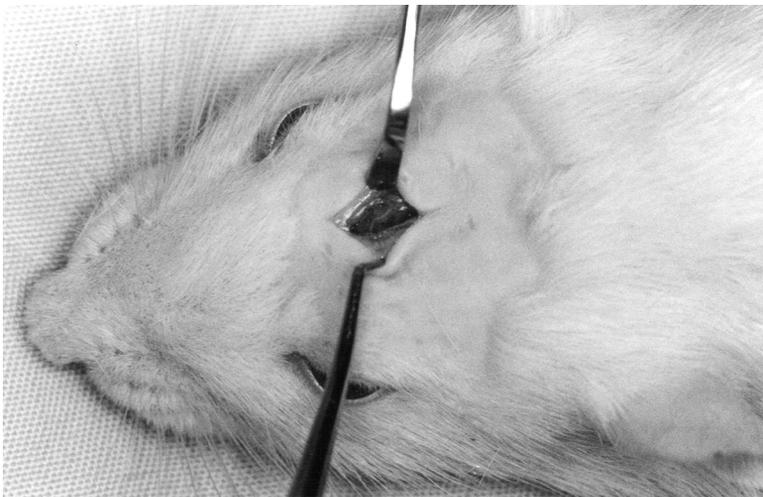


FIGURA 1 – Incisão sobre a calota craniana.

mento, respeitando a linha média craniana. Nesse espaço foi implantado um complexo de HA/colágeno* (Figura 2). O periósteo foi então suturado com polivicril 4-0** e a pele com fio de seda 3-0*, ambos montados em agulha de 1,5 cm. No final do procedimento cirúrgico, cada animal recebeu dose única de penicilina benzatina***, na dosagem de 0,4 mg para cada 100 g de peso corporal, em injeção intraperitoneal.

Cinco animais foram sacrificados aos 5, 10, 30, 60 e 120 dias de pós-operatório por inalação de éter sulfúrico. A calota craniana de cada animal foi removida como um todo, incluindo os tecidos moles. Os espécimes obtidos, após lavados em soro fisiológico, foram fixados em formol a 10% e descalcificados em solução de citrato de sódio e ácido fórmico a 50%, seguindo tramitação laboratorial de rotina para coloração pela hematoxilina e eosina. Cortes semi-seriados de 6 micrometros de espessura foram preparados para avaliação histológica.

Resultado

* Material produzido pelo Instituto de Química da USP de São Carlos. Dr. Gilberto Góissis – Departamento de Química e Física Molecular IQSc/USP – Av. Dr. Carlos Botelho, n. 1465, São Carlos – SP – Brasil – 13560-970 – C.P. 780

** Ethicon

*** Benzetacil. Fontoura Wyeth

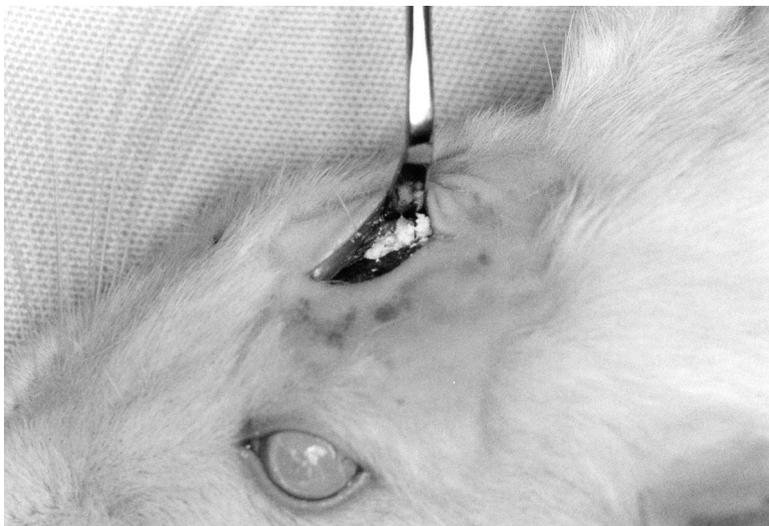


FIGURA 2 – Implantação do material experimental.

5 DIAS

O material implantado encontra-se no leito receptor observando-se, nas proximidades, tecido conjuntivo imaturo exibindo moderado número de polimorfonucleares neutrófilos, macrófagos e linfócitos. Em alguns pontos, observam-se fibroblastos em número elevado, ao lado de pequenos capilares neoformados.

15 DIAS

O implante acha-se no leito receptor notando-se, nas proximidades, tecido conjuntivo mais desenvolvido quando comparado ao estágio anterior. Em alguns pontos, observam-se finos feixes de fibras colágenas contornando o material. Alguns macrófagos e linfócitos, ao lado de células gigantes multinucleadas englobando pequenas partículas do implante, (Figura 3) podem ser notados na região.

30 DIAS

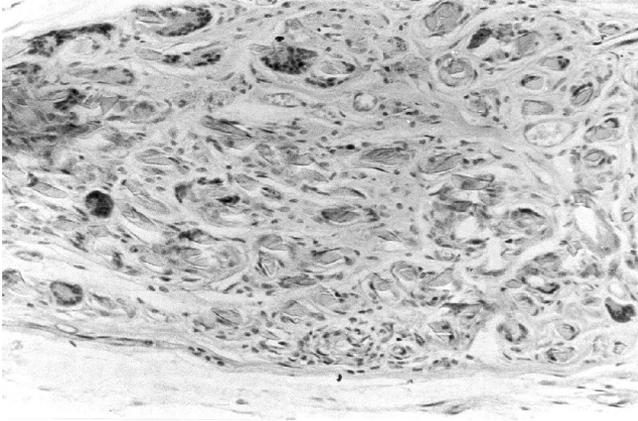


FIGURA 3 – 15 dias – Células gigantes englobando partículas do complexo hidroxiapatita/colágeno (HE 64x).

Quando comparado aos estádios anteriores, verifica-se uma diminuição da quantidade de material implantado. O tecido conjuntivo junto ao implante exhibe, em diversos pontos, feixes de fibras colágenas (Figura 4) e o número de fibroblastos é discreto (Figura 5). Notam-se, ainda, algumas células gigantes multinucleadas englobando pequenas partículas do material.

60 DIAS

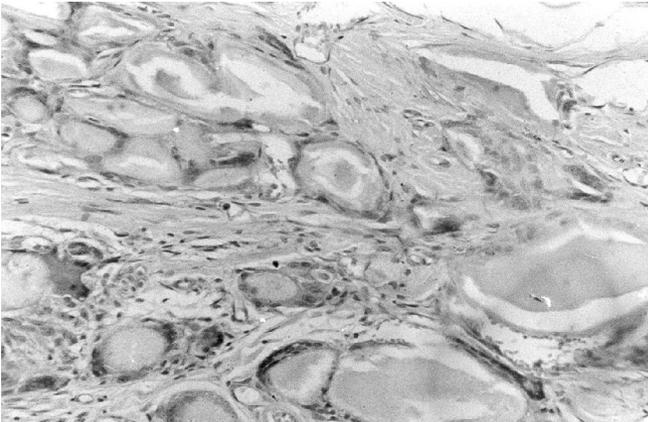


FIGURA 4 – 30 dias – Feixes de fibras colágenas envolvendo o material (HE 160x).

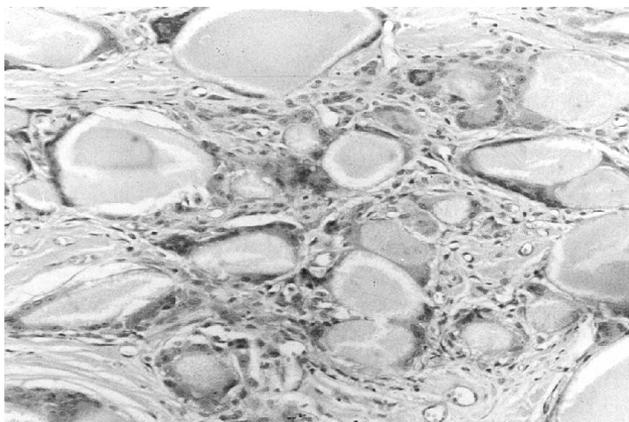


FIGURA 5 - 30 dias - Presença de discreto número de fibroblastos próximos aos implantes (HE 160x).

Comparando ao estágio anterior, nota-se, na maioria dos casos, uma diminuição da quantidade do material implantado (Figura 6). Nas proximidades, evidencia-se tecido conjuntivo fibroso com feixes de fibras colágenas (Figuras 6 e 7). Algumas células gigantes multinucleadas englobando pequenas partículas do implante podem ser observadas.

120 DIAS

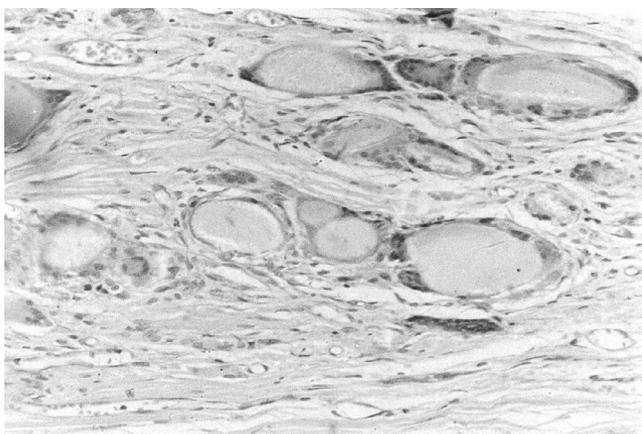


FIGURA 6 - 60 dias - Redução da quantidade do material implantado em comparação ao período anterior (HE 160x).

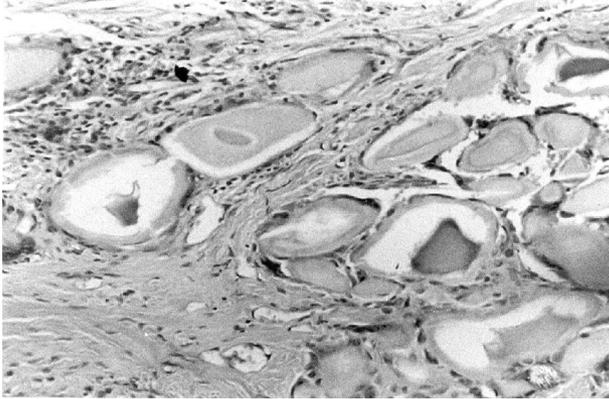


FIGURA 7 - 60 dias - Persistência do tecido fibroso envolvendo as partículas do complexo hidroxiapatita/colágeno (HE 160x).

Em todos os espécimes verifica-se uma diminuição considerável do implante quando comparado aos estádios anteriores. Contornando o material, observam-se espessos feixes de fibras colágenas (Figuras 8 e 9) com orientação paralela à superfície do implante. Junto às bordas das partículas do implante, observa-se, em diversos casos, a presença de células com características de osteoblastos que parecem depositar matriz orgânica sobre a superfície do material (Figuras 9 e 10).

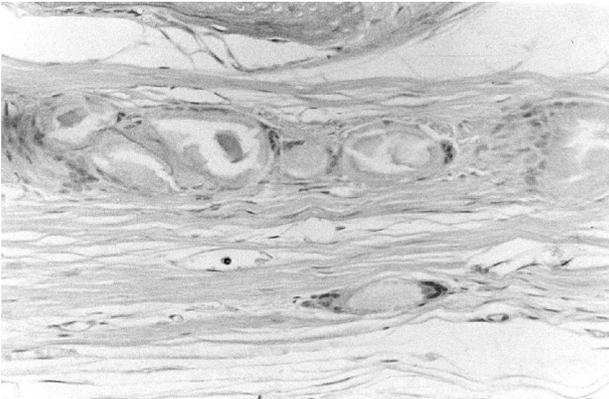
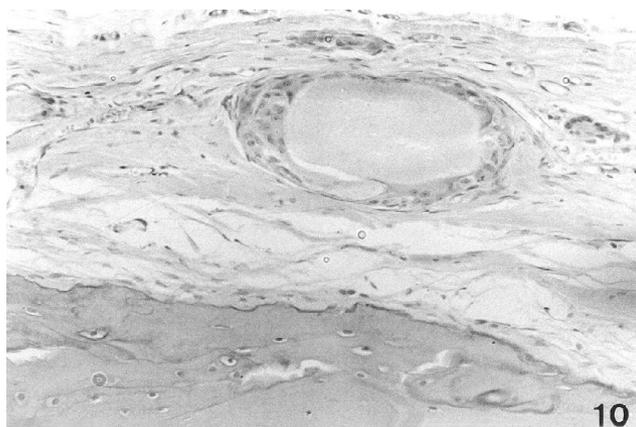
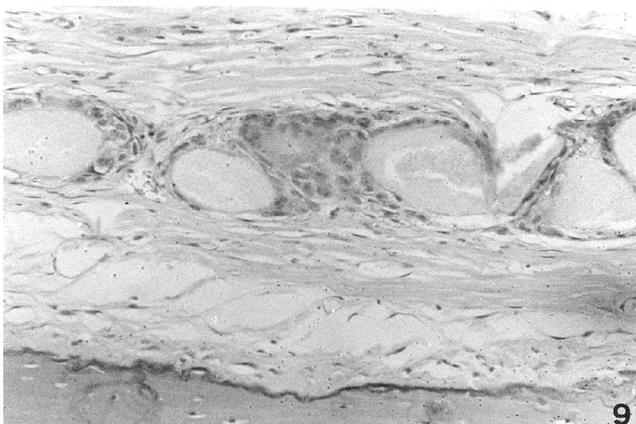


FIGURA 8 - 120 dias - Considerável diminuição da quantidade do material implantado, envolto por fibras colágenas dispostas paralelamente umas às outras (HE 160x).



FIGURAS 9 e 10 - 120 dias - Em algumas áreas, o implante está envolto por matriz orgânica e numerosos osteoblastos (HE 160x).

Discussão

As cerâmicas de hidroxiapatita têm sido citadas, na literatura, como tendo capacidade osteogênica.²² É considerado osteogênico o enxerto ou implante que seja capaz de fornecer ao leito receptor osteoblastos viáveis, isto é, capazes de neoformação óssea.²¹ O comportamento osteoindutivo de um material é traduzido pela sua capacidade

de “estimular” tecidos subjacentes a produzir osteoblastos e conseqüentemente neoformação óssea. Por outro lado, osteocondução ocorre quando células mesenquimais indiferenciadas invadem materiais implantados ou enxertados, provocando, posteriormente, neoformação óssea, processo este caracterizado às vezes por reabsorção progressiva do implante e ao mesmo tempo invasão por tecido conjuntivo e vasos sanguíneos, com posterior ossificação.²

Como demonstra a literatura, dentre os comportamentos acima citados, a hidroxiapatita empregada assume apenas a propriedade osteocondutiva, que se traduz na possibilidade de o material servir como uma matriz, na qual ocorreria formação de osso sobre si e/ou seu interior.

A instabilidade dos grânulos de hidroxiapatita, tanto no transoperatório, quanto no pós-operatório, constitui assunto de importância para um grande número de pesquisas na área de implantes aloplásticos. Nesse sentido, observa-se muita discussão a respeito de veículos, substâncias ou meios, que, associados à hidroxiapatita, não promovam respostas biológicas indesejáveis, não interfiram sobre o processo de reparo da área e ao mesmo tempo permitam estabilidade das partículas, sendo, preferencialmente, reabsorvidos em curto período de tempo.¹¹ Além disso, o colágeno é descrito como um possível agente de indução óssea.²³ Dessa forma, o material experimental, nesse estudo, foi uma associação de hidroxiapatita com colágeno bovino, produzindo uma mistura pastosa.

Nos achados histológicos dos 5 dias de pós-operatório, o material implantado encontra-se em grande quantidade no leito cirúrgico, promovendo uma moderada reação inflamatória e já exibindo tendência de envolvimento fibroso. A utilização do mesmo material em cavidades ósseas de arco zigomático de ratos revelou resposta inflamatória muito branda, como é descrito por Vargas Neto.* A diferença dos resultados talvez possa ser explicada pelo fato de o material, em nosso estudo, estar sobreposto ao tecido ósseo e não acomodado numa cavidade óssea, permitindo assim mobilidade e uma irritabilidade maior para os tecidos adjacentes. Da mesma forma, o colágeno heterógeno, em associação ou não a materiais cerâmicos, é considerado, por alguns autores, imunogênico.⁹ Também, possibilidades de variações na preparação devem ser consideradas, por se tratar de um material experimental.

* VARGAS NETO, J. (Faculdade de Odontologia, UNESP – Campus de Araraquara). Comunicação pessoal, 1999.

Aos 15 dias de pós-operatório, observa-se, com mais evidência, pela presença de feixes de fibras colágenas, o encapsulamento das partículas do material implantado. Também é nítida a presença de infiltrado inflamatório, com características de reação de corpo estranho pela presença de células englobando partículas do implante.

No período de 30 dias ocorreu a persistência de reação inflamatória, porém muito menos intensa. Além disso a quantidade de material implantado existente apresentou-se menor quando comparada ao período anterior. Da mesma forma, ainda é observada uma diminuição gradativa do material à medida que caminhamos para períodos pós-operatórios mais longos, como aos 60 dias, quando a maioria dos espécimes apresentou, possivelmente, uma tentativa de fagocitose evidenciada pela ação de células multinucleadas. Aliás, a fagocitose de materiais cerâmicos é bem descrita na literatura.^{14, 15} Por outro lado, o colágeno associado é heterógeno e pode ser imunogênico, colaborando na manutenção dessa reação inflamatória que pode ser considerada persistente.

Aos 120 dias, encontra-se acentuada redução do material, coincidindo com resultados obtidos com a implantação de hidroxiapatita associada a um colágeno semelhante em cavidades ósseas, onde, no mesmo período, o material estava praticamente ausente e a cronologia de reparo da cavidade muito retardada, em comparação a outros materiais testados.¹²

Como não foi observada, em nenhum dos animais, expulsão mecânica através da pele ou presença de abscesso, é de se supor que o material tenha sido fagocitado ou reabsorvido. A resposta histológica, ao longo dos períodos considerados, nos faz acreditar na primeira situação, visto que a fagocitose é possível dependendo do tamanho da partícula de hidroxiapatita implantada.¹⁵ Ainda, pode ser que as partículas de hidroxiapatita tenham sofrido, além da fagocitose, dissolução química,^{18, 24} já que materiais com macroporosidades apresentam possibilidade de significativo aumento da sua degradação à medida que permitem crescimento ósseo no seu interior.¹

Ao mesmo tempo, as partículas do implante ainda existentes no local apresentam-se encapsuladas por tecido conjuntivo fibroso. Porém, junto a essas partículas, inúmeros osteoblastos aderidos à sua superfície depositam matriz orgânica. Esse achado histológico não pode ser considerado como osteoindução, uma vez que o implante foi instalado subperiostealmente e, portanto, a origem dos osteoblastos em questão é provavelmente de responsabilidade do periosteio que recobre o implante,

diferentemente do processo de osteoindução no qual o material implantado estimula células para formação óssea em lugares onde normalmente não se formaria osso. Como os osteoblastos foram evidenciados apenas no período de 120 dias, seriam necessárias avaliações mais tardias para verificarmos a intensidade da provável neoformação óssea resultante.

Uma outra questão é o fato da presença do colágeno que, por um lado, teve colaboração positiva permitindo estabilização das partículas de hidroxiapatita no leito receptor, até que elas tivessem sido encapsuladas, ou seja, nos períodos iniciais. Por outro lado, a presença do colágeno deve ter provocado reação inflamatória mais persistente e atraso da estimulação e aparecimento dos osteoblastos ao redor da hidroxiapatita implantada. Dessa forma, outros grupos de animais são necessários para determinar se a presença de colágeno, além de contribuir para a redução nítida e gradativa da quantidade de material implantado pela sua reabsorção, estimulou, de alguma forma, a dissolução ou reabsorção do componente cerâmico do material.

Conclusão

Com base nos resultados obtidos e nos limites das condições experimentais utilizadas, pode-se concluir que:

- o complexo hidroxiapatita-colágeno estudado apresentou-se biocompatível;
- o colágeno atuou eficientemente como material de estabilização mecânica das partículas de hidroxiapatita implantadas;
- a mistura hidroxiapatita-colágeno apresentou intensa reabsorção;
- a hidroxiapatita do complexo apresentou tardiamente atividade osteoblástica ao seu redor, que pode ter sido atrasada pela presença do colágeno.

GABRIELLI, M. A. C. et al. Subperiosteal implantation of a hidroxiapatite-collagen compound. Histological study in rats. Rev. Odontol. UNESP (São Paulo), v.28, n.2, p.345-358, 1999.

- ABSTRACT: The present study evaluated the biological behavior of an experimental compound of hydroxyapatite and collagen implanted in subperiosteal pockets on the skull of rats. Five animals were sacrificed for each experimen-

tal period, after 5, 15, 30, 60 and 120 days postoperatively and the specimens were submitted to histological analysis. The results showed that the material was biocompatible and suffered some degree of reabsorption. The last periods of observation presented osteoblasts around the granules of hydroxylapatite and seemed to deposit organic matrix on their surface.

- **KEYWORDS:** Biocompatible materials; hydroxyapatites; collagen; material implants.

Referências bibliográficas

- 1 BAJPAI, P. K. Biodegradable scaffolds in orthopedic, oral and maxillofacial surgery. In: RUBIN, L. R. (Ed.). *Biomaterials in reconstructive surgery*. St. Louis: Mosby, 1983. p.312.
- 2 BAYS, R. A. The pathophysiology and anatomy of edentulous bone loss. In: FONSECA, R. J., DAVIS, W. H. *Reconstructive preprosthetic oral and maxillofacial surgery*. Philadelphia: Saunders, 1986. cap.1, p.1-39.
- 3 BEIRNE, O. R., CURTS, T. A. Patient satisfaction with dentures following alveolar ridge augmentation with hydroxylapatite. *CDA Journal*, v.13, p.45-9, 1985.
- 4 BELL, R., BERNIE, R. Effect of hydroxylapatite tricalcium phosphate and collagen on the healing of defects in the mandible. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v.46, p.589-94, 1988.
- 5 BLUMENTHAL, N. M. The effect of supracrestal tricalciumphosphate ceramic-microfibrillar collagen grafting on post surgical soft tissue levels. *J. Periodontol.*, v.59, p.18-22, 1988.
- 6 BURSTEIN, F. D. et al. The use of porous granular hydroxyapatite in secondary orbitocranial reconstruction. *Plast. Reconstr. Surg.*, v.100, p.869-74, 1997.
- 7 BYRD, H. S., HOBAR, C. P., SHEWMAKE K. Augmentation of the craniofacial skeleton with porous hydroxyapatite granules. *Plast. Reconstr. Surg.*, v.91, p.15-22, 1993.
- 8 COOB, C. M. et al. Restoration of mandibular continuity defects using combinations of hydroxylapatites and autogenous bone: microscopic observations. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v.48, p.268-75, 1990.
- 9 DE LUSTRO, F. et al. A comparative study of the biologic and immunologic response to medical devices derived from dermal collagen. *J. Biomed. Mater. Res.*, v.20, p.109-20, 1986.
- 10 EL DEEB, M. Comparison of three methods of stabilization of particulate hydroxylapatite for augmentation of the mandibular ridge. *J. Oral. Maxillofac. Surg.*, v.46, p.758-66, 1988.

- 11 FRAME, J. W., LAIRD, W. R. E. Management of the mobile fibrous ridge in the atrophic maxilla using porous hydroxylapatite blocks: a preliminary report. *Br. Dent. J.*, v.162, p.185-9, 1987.
- 12 GABRIELLI, M. A. C. Implantes de hidroxiapatita associados ou não a colágeno, em arco zigomático de ratos. Estudo histológico. Araraquara, 1995. 101 p. Dissertação (Mestrado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.
- 13 GONGLOFF, R. R., MONTGOMERY, C. K. Experimental study of the use of collagen tubes for implantation of particulate hydroxylapatite. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v.43, p.843-849, 1985.
- 14 GRANJEIRO, J. M. et al. Hidroxiapatita para uso clínico. Caracterização físico-química. *RGO*, v.40, p.130-4, 1992.
- 15 GREGOIRE, M., ORLY, I., MENANTEAU, J. The influence of calcium phosphate biomaterials on human bone cell activities. An in vitro approach. *J. Biomed. Mater. Res.*, v.24, p.165-77, 1990.
- 16 HABAL, M. B., REDDI, A. H. Bone grafts and bone induction substitutes. *Clin. Plast. Surg.*, v.21, p.525-42, 1994.
- 17 HARVEY, W. K. et al. Evaluation of a subcutaneously implanted hydroxylapatite – avitene mixtures in rabbit. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v.143, p.277-80, 1985.
- 18 HOLMES, R. E., MOONEY, V. Bone regeneration in canine defects by coralline implants and illiac grafts. *Trans. Soc. Biomater.*, v.7, p.15-24, 1984.
- 19 LEGEROS, R. S. Calcium phosphate materials in restorative dentistry: a review. *Adv. Dent. Res.*, v.2, p.164-80, 1988.
- 20 MARCHAC, D. Correction of skeletal minor contour deformities with injected subperiosteal coral granules. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF PLASTIC SURGEONS, San Antonio, Tex., 1991.
- 21 MARX, R. E., SNYDER, R. M., KLINE, S. N. Cellular survival of human marrow during placement of marrow-cancellous bone grafts. *J. Oral Surg.*, v.37, p.712-7, 1979.
- 22 NADE, S. et al. Osteogenesis after bone and bone marrow transplantation. The ability of ceramic materials to sustain osteogenesis from transplanted bone marrow cells: preliminary studies. *Clin. Orthop.*, v.181, p.255, 1983.
- 23 SUGAYA, A. et al. Effects on wound healing of tricalcium phosphate-collagen complex implants in periodontal defects in the dog. *J. Periodontal Res.*, v.25, p.60-3, 1989.
- 24 WITHE, E., SHORS, E. C. Biomaterial aspects of Interpore-200 – porous hydroxylapatite. *Dent. Clin. North Am.*, v.30, p.49-57, 1986.

