

TATIANA SCHMITZ DUARTE

**OSTEOINTEGRAÇÃO DA HIDROXIAPATITA
SINTÉTICA NO PROCESSO ALVEOLAR DA
MANDÍBULA DE CÃES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de “*Magister Scientiae*”.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2003**

TATIANA SCHMITZ DUARTE

**OSTEOINTEGRAÇÃO DA HIDROXIAPATITA
SINTÉTICA NO PROCESSO ALVEOLAR DA
MANDÍBULA DE CÃES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de “*Magister Scientiae*”.

APROVADA: 22 de agosto de 2003

Prof^a. Marlene Isabel Vargas Vilorio
(Conselheira)

Prof. Tarcízio Antônio Rego de Paula
(Conselheiro)

Prof^a. Cristina Maria Ganns Chaves Dias

Prof. Luiz Gonzaga Pompermayer

Prof^a. Andréa Pacheco Batista Borges
(Orientadora)

Aos animais, um pedido sincero de desculpas e muito obrigada.

Aos meus pais e aos meus irmãos
obrigada pelo apoio e pela torcida.

AGRADECIMENTOS

A cidade de Viçosa por ter me acolhido tão bem.

Ao Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, por todos esses anos onde eu me senti em casa.

A Professora Andréa por todas as oportunidades, pela confiança depositada em mim e, sobretudo pela amizade.

A Professora Marlene pela coorientação nessa tese e pelos conselhos de mãe.

Ao Professor Tarcízio pela competente orientação.

Ao Professor Gonzaga pelos ensinamentos técnicos durante a graduação e a pós-graduação e pelos sorrisos animadores de todos os dias.

Ao Professor Zé Antônio pela calma e pela tranquilidade tão confortante.

Ao Professor Ricardo por abrir meus olhos.

Aos amigos da pós-graduação, obrigada pela convivência saudável.

Aos amigos Mário, Esther e Richard um agradecimento infinito pela amizade, pela cumplicidade e pelas diferenças que só me fazem bem.

A amiga Priscilla pelos momentos sempre alegres.

As amigas Michelle e Fabi pelo carinho de sempre.

Ao amigo Alexandre pela ajuda inigualável durante a realização desse trabalho e por toda sua simpatia.

A Gisele pelo apoio durante o experimento.

A toda turma de graduação vet 95 e em especial a Simone, Joesley, Fernando, Jorge e Juliane por terem me acolhido e pela convivência inesquecível.

A amiga Tereza simplesmente todo agradecimento é pouco.

As amigas Ilana, Tatiana e Érika por ser a gente.

Ao amigo Bolivar pela amizade e pelos puxões de orelha.

Aos amigos Andréa, Débora, Santana, Carla, Edílson, Mirella e Zangado pelos bons momentos.

Aos funcionários do DVT obrigada pela atenção durante todos esses anos.

Aos funcionários e amigos Maninha e Cláudio Fialho pelo carinho dentro e fora do trabalho.

Aos estagiários e amigos Fábio, Kelly, Denise e Manuela pela ajuda sempre alegre na realização dessa tese e pela paciência comigo.

As meninas da especialização de 2002, Luciane, Luciana, Janete, Fabrícia Cristiane, Ana Paula e Manuela por me tratarem com tanto respeito e carinho e pelo aprendizado.

Ao Professor Romeu que apesar de distante me deixou ensinamentos para o resto da vida.

A amiga Simone Galvão pelos palpites nesse trabalho e pelo exemplo.

A Rosi pela sua competente ajuda e boa vontade.

BIOGRAFIA

TATIANA SCHMITZ DUARTE, filha de Antonio Faustino Duarte e Terezinha Eliana Schmitz Duarte, nasceu em 17 de Fevereiro de 1975, em Taubaté - SP.

Em Janeiro de 2000, graduou-se Médica Veterinária pela Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

Em Março de 2000, deu início ao curso de Especialização em Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais no Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, concluindo em Julho de 2001.

Em Agosto de 2001, iniciou-se no Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Cirurgia Veterinária, junto ao Departamento de Veterinária, nessa mesma Instituição.

CONTEÚDO

	Página
Resumo	vii
Abstract.....	viii
INTRODUÇÃO.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	3
OSTEOINTEGRAÇÃO DA HIDROXIAPATITA SINTÉTICA NO PROCESSO ALVEOLAR DA MANDÍBULA DE CÃES. ASPECTOS CLÍNICO-CIRÚRGICOS E RADIOGRÁFICOS.....	7
Resumo.....	7
Abstract.....	8
Introdução.....	9
Material e Métodos.....	10
Resultados e Discussão.....	15
Conclusões.....	23
Referências Bibliográficas.....	24
OSTEOINTEGRAÇÃO DA HIDROXIAPATITA SINTÉTICA NO PROCESSO ALVEOLAR DA MANDÍBULA DE CÃES. ASPECTOS HISTOLÓGICOS.....	26
Resumo.....	26
Abstract.....	27
Introdução.....	28
Material e Métodos.....	29
Resultados e Discussão.....	32
Conclusões.....	45
Referências Bibliográficas.....	46
CONCLUSÕES GERAIS.....	50

RESUMO

DUARTE, Tatiana Schmitz, M.S., Universidade Federal de Viçosa, Agosto de 2003.
Osteointegração da hidroxiapatita sintética no processo alveolar da mandíbula de cães. Orientadora: Andrea Pacheco Batista Borges. Conselheiros: Marlene Isabel Vargas Vilória e Tarcízio Antônio Rêgo de Paula.

O desgaste do processo alveolar leva a perda do dente, sendo sua regeneração pré-requisito para o uso de implantes dentários. Com isso, o objetivo deste projeto foi avaliar a hidroxiapatita sintética como substituto ósseo na regeneração do processo alveolar. Para tal, foram utilizados 28 cães adultos, fêmeas e machos saudáveis, pesando entre 10 e 15 Kg e divididos em dois grupos. Foram criados defeitos de aproximadamente 6 x 5 mm 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 enquanto o outro permaneceu sem tratamento sendo utilizado como controle. Foram feitas avaliações clínicas diariamente durante uma semana, assim como exames radiográficos logo após a cirurgia e com oito, 21, 42, 60, 90 e 120 dias do pós-cirúrgico. Aos oito, 15, 21, 42, 60, 90 e 120 dias foram coletados fragmentos ósseos para a análise histológica sob microscopia óptica. A maioria dos animais apresentou algum grau de inflamação, sendo a recuperação no grupo tratado mais lenta se comparada ao grupo controle e, em 100% dos animais houve estímulo ao sangramento na presença da hidroxiapatita. O exame radiográfico apresentou radiopacidade crescente no defeito dos animais do grupo controle. No grupo tratado houve inicialmente, radiopacidade superior ao osso normal, diminuindo gradualmente até se tornar semelhante ao osso vizinho, o que aconteceu 60 dias após a cirurgia. Histologicamente foi observado crescimento ósseo e túneis vasculares no interior dos poros de hidroxiapatita, assim como uma intensa proliferação de osteoblastos e neovascularização na presença do implante. A biocompatibilidade da hidroxiapatita permitiu a sua integração com o processo alveolar através da formação direta de osso lamelar. Portanto, ocorre formação de novo osso à medida que a hidroxiapatita é degradada.

ABSTRACT

DUARTE, Tatiana Schmitz, M.S., Universidade Federal de Viçosa, August of 2003.

Synthetic hydroxyapatite osteointegration in the jaw alveolar process of dogs.

Adviser: Andrea Pacheco Batista Borges. Committee members: Marlene Isabel Vargas Vilória and Tarcízio Antônio Rego de Paula.

The wear of the alveolar process results in the loss of the tooth and its regeneration is required for the use of dental implant. The objective of this project was to evaluate the synthetic hydroxyapatite as bone substitute in the regeneration of the alveolar process. For that, 28 healthy adult dogs, males and females, weighing between 10 and 15 Kg and divided in two groups were used. Defects of approximately 6 x 5 mm were created in the vestibular surface of the alveolar process until reaching the root of the mandibular right fourth premolar. In a group, the defect was totally filled with synthetic hydroxyapatite while in the other it stayed without treatment, being used as control. The animals were submitted to daily clinical evaluations during one week, as well as radiographic exams just after the surgery and on days 8th, 21st, 42nd, 60th, 90th and 120th of postoperative. Bone fragments were collected eight, 15, 21, 42, 60, 90 and 120 days after surgery for the histological analysis under optical microscopy. Most of the animals presented some degree of inflammation, being the recovery slower in the treated group than in the control one. In 100% of the animals there was bleeding stimulus in the presence of hydroxyapatite. The radiographic exams showed growing radiopacity in the animals of control defect group. In the treated defect group there was initially, superior radiopacity when compared to the normal bone, followed by gradual decrease until becoming similar to the neighbor bone, that happened 60 days after the surgery. Microscopically, bone and vasculars tunnels growth was observed inside the hydroxyapatite pores, as well as an intense osteoblast proliferation and neovascularization in the presence of the implant. The hydroxyapatite biocompatibility allowed its integration with the alveolar process through the direct formation of lamellar bone. Therefore, it happens new bone formation as the hydroxyapatite is degraded.

INTRODUÇÃO

Resultados recentes indicam que a hidroxiapatita sintética, pode ser amplamente utilizada como substituto ósseo, seja preenchendo defeitos ou recobrando próteses ortopédicas (Borges, 1998, Rezende et al., 1998, Franco, 2000, Borges et al., 2001). É utilizada como substituto ósseo em defeitos provocados por fraturas, em cirurgias espinhais como espaçadores e em artroplastias (Yamamoto et al., 2000).

A hidroxiapatita tem sido empregada em tratamentos maxilofaciais e orais como no aumento do rebordo alveolar e no preenchimento do alvéolo após a extração do dente (Shareef et al., 1993). Muitas vezes o volume ósseo é insuficiente para suportar um implante dentário, sendo necessário o uso de procedimentos cirúrgicos, por exemplo o preenchimento do processo alveolar com um substituto ósseo como a hidroxiapatita (Mazor et al., 2000). É utilizada também em outras situações onde o volume ósseo é reduzido como resultado de periodontite avançada, traumas, infecções, atrofias e má formações (Benqué et al., 1999).

O desenvolvimento de materiais sintéticos, biologicamente inertes oferece, maiores recursos e menos riscos para o tratamento de defeitos ósseos com o intuito de promover a sua regeneração (Brown et al., 1998). O substituto ósseo ideal deve ser biocompatível, possuir propriedade osteoindutiva ou osteocondutiva e ser, gradualmente, substituído por um novo tecido ósseo (Jensen et al., 1996).

O substituto ósseo hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, pode ter origem nos corais ou algas, pode ser derivado de mineral ósseo natural ou pode ser desenvolvido sinteticamente (Blumenthal et al., 1994; Jensen et al., 1996). Diferentemente da hidroxiapatita natural, a sintetizada em laboratório é livre de impurezas e o tamanho, a forma e a porosidade do produto podem ser pré-determinados (Nelson et al., 1993).

A hidroxiapatita sintética é biocompatível, não é carcinogênica e nem alergênica (Gonzalez et al., 1993; Oonishi et al., 1997), parecendo ser um material seguro e clinicamente aceitável na obliteração de vários defeitos periodontais (Brown et al., 1998). A biocompatibilidade se deve ao fato da hidroxiapatita possuir a mesma estrutura cristalina e química da apatita do osso vivo (Wijs et al., 1993; Ruys et al., 1994; Brown

et al., 1998; Sepulveda et al., 1999). No entanto, possui uma baixa resistência mecânica (Heikkilla, 1993; Sepulveda et al., 1999).

Uma característica da hidroxiapatita é sua capacidade de produzir a osteointegração (Gonzalez et al., 1993; Ruys et al., 1994; Arakaki et al., 1995), atuando 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). Para Green et al. (1995) e D'antonio et al. (1996), a hidroxiapatita sintética possui também efeito osteoindutivo. Kurashina et al. (2002) afirmaram que as cerâmicas de fosfato de cálcio geralmente são osteocondutivas, mas, deve-se considerar que alguns tipos dessas cerâmicas são também osteoindutivas.

Apesar das propriedades da hidroxiapatita serem bem conhecidas, as questões relacionadas com a sua biodegradação não são ainda conclusivas (Jensen et al., 1996). Segundo Oonishi et al. (1997) se existe algum processo de reabsorção da hidroxiapatita, ele é lento e ocorre à medida que há a formação de novo osso. Diferentemente, Borges et al. (2001) constataram que a hidroxiapatita foi degradada após a sua implantação na tíbia de cães.

A taxa de degradação do material pode ser um dos fatores que afetam a capacidade do biomaterial de induzir a osteogênese. A manutenção da estrutura porosa da hidroxiapatita é importante para o crescimento ósseo no interior de seus poros, ou seja, é a porosidade do biomaterial que permite a osteocondução (Kurashina et al., 2002). Tampieri et al. (2001) sugeriram que uma pequena variação nas propriedades físico-químicas e geométricas da hidroxiapatita pode causar respostas biológicas significativamente diferentes.

Denissen et al. (2000) afirmaram que o crescimento ósseo e vascular ocorre no interior dos poros da hidroxiapatita, sendo o implante integrado ao osso hospedeiro. O grande desafio dos fabricantes de hidroxiapatita é fazer com que o gradiente de porosidade da hidroxiapatita seja o mais parecido possível com a estrutura óssea (Tampieri et al., 2001).

O presente trabalho foi elaborado conforme normas da Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade Federal de Minas Gerais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAKAKI, M., YAMASHITA, S., MUTAF, M. et al. Onlay silicone and Hydroxyapatite-Tricalciumphosphate composite (HA-TCP) blocks interfere with nasal bone growth in rabbits. *Cleft Palate-Craniof. J.*, v. 32, n. 4, p. 282-289, 1995.
- BENQUÉ, E., ZAHEDI, S., BROCARD, D. et al. Tomodensitometric and histologic evaluation of the combined use of a collagen membrane and a hydroxyapatite spacer for guided bone regeneration: a clinical report. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, v. 14, n. 2, p. 258-264, 1999.
- BLUMENTHAL, N. C., COSMA, V., SKYLER, D. et al. The effect of cadmium on the formation and properties of hydroxyapatite *in vitro* and its relation to cadmium toxicity in the skeletal system. *Calcif. Tissue Int.*, v. 56, p. 316-322, 1994.
- 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. Belo Horizonte: UFMG, Escola de Veterinária, 1998, 111p. (Tese, Doutorado).
- BORGES, A. P. B.; REZENDE, C. M. F.; RIBEIRO, M. F. B. et al. Hidroxiapatita sintética – HA-91 como substituto ósseo em defeito experimental provocado no terço proximal da tíbia em cão: aspectos à microscopia eletrônica de transmissão. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 52, n. 6, p. 616-620, 2001.
- 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, n. 2, p. 146-157, 1998.

- D'ANTONIO, J. A., TOWNSHIP, M., CAPELLO, W. N. et al. Remodeling of bone around hydroxyapatite coated femoral stems. *J. Bone Joint Surg. Am.*, v. 78, n. 8, p. 1226-1234, 1996.
- 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. Periodontics Restoration Dent.*, v. 20, n. 1, p. 41-49, 2000.
- DENISSEN, H., MONTANARI, C., MARTINETTI, R. et al. Alveolar bone response to submerged bisphosphonate-complexed hydroxyapatite implants. *J. Periodontol.*, v. 71, n. 2; p. 179-286, 2000.
- FRANCO, K. L. Avaliação clínico-cirúrgica, radiológica e histológica da reparação óssea após utilização de HA-91, COL.HA-91 e INT.HA-91 em defeito provocado experimentalmente na tíbia de cães. Viçosa: UFV, Departamento de Veterinária, 2000. 22p. (Monografia, Especialização em Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais).
- GONZALEZ, R. Hidroxiapatita porosa HA-200. Principales características físico-químicas. *Química Nova*, v. 16, n. 6, p. 509-511, 1993.
- GREEN, J. P., WOJNO, M. W., GROSSNIKLAUS, H. E. et al. Bone formation in hydroxyapatite orbital implants. *Am. J. Ophtalmology*, v. 120, n. 5, p. 681-682, 1995.
- HEIKKILLA, J. Bioactive glass versus hydroxylapatite in reconstruction of osteochondral defects in rabbit. *Acta Orthop. Scand.*, v. 64, n. 6, p. 678-682, 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, n. 1, 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.
- MAZOR, Z., PELEG, M., GARG, A. K. et al. The use of hydroxyapatite bone cement for sinus floor aumentation with simultaneous implant placement in the atrophic maxilla. A report of 10 cases. *J. Periodontol.*, v. 71, p. 1187-1194, 2000.
- 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, n. 1, p. 72-79, 1992.
- NELSON, S. R., WOLFORD, L. M., LAGOW, R. J. et al. Evaluation of new high-performance calcium polyphosphate bioceramics as bone graft materials. *Journal Oral Maxillofac. Surg.*, v. 51, p. 1363-1371, 1993.
- OONISHI, H., KUSHITANI, S., YASUKAWA, E. et al. Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute. *Clinical Orthopaedics and related research*, 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.
- REZENDE, C. M. F, BORGES, A P. B., BERNIS, W. O. et al. Aspectos clínico-cirúrgicos e radiográficos da hidroxiapatita sintética na diáfise proximal da tíbia de cães: *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.50, n.5, p. 537-545, 1998.
- RUYS, A. J.; MILTHORPE, B. K.; SORRELL, C. C. High-performance ceramics. Preparation of fibre-reinforced hydroxiapatite. *Interceram.*, v. 43, n. 1, 7-9, 1994.

- SEPULVEDA, P.; PANDOLFELLI, V. C.; ROGERO, S. O. et al. Hidroxiapatita porosa produzida através do gelcasting de espumas visando aplicações biomédicas. *Cerâmicas*, v. 45, n. 296, 1999.
- SHAREEF, M. Y.; MESSER, P. F.; NOORT, R. Fabrication, characterization and fracture study of machinable hydroxyapatite ceramic. *Biomaterials*, v. 14, n. 1, p. 69-75, 1993.
- TAMPIERI, A., CELLOTI, G., SPRIO, S. et al. Porosity-graded hydroxyapatite ceramics to replace natural bone. *Biomaterials*, n. 22, p. 1365-1370, 2001.
- WIJS, F. L. J. A., PUTTER, C., LANGE, G. L. et al. Local residual ridge augmentation with solid hydroxyapatite blocks: Part I – An animal experiment. *J. Prostht. Dent.*, v. 69, n. 5, p. 510-513, 1993.
- YAMAMOTO, T., ONGA, T., MARUI, T. et al. Use of hydroxyapatite to fill cavities after excision of benign bone tumors. *J. Bone Joint. Surg.* V. 82-B, n. oito, p. 1117-20, 2000.

OSTEOINTEGRAÇÃO DA HIDROXIAPATITA SINTÉTICA NO PROCESSO ALVEOLAR DA MANDÍBULA DE CÃES. ASPECTOS CLÍNICO-CIRÚRGICOS E RADIOGRÁFICOS.

DUARTE, Tatiana Schmitz, Universidade Federal de Viçosa.

Resumo

O desgaste do processo alveolar leva a perda do dente, sendo a sua regeneração pré-requisito para o uso de implantes dentários. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a hidroxiapatita sintética como substituto ósseo na regeneração do processo alveolar. Para tal, foram utilizados 28 cães adultos, fêmeas e machos saudáveis pesando entre 10 e 15 Kg divididos em dois grupos. Foram criados defeitos de aproximadamente 6 x 5 mm na superfície vestibular do processo alveolar mandibular direito até atingir a raiz do quarto pré-molar. Em um grupo, o defeito foi totalmente preenchido com hidroxiapatita sintética enquanto o outro permaneceu sem tratamento sendo utilizado como controle. Foram feitas avaliações clínicas diariamente durante uma semana, assim como radiográficas logo após a cirurgia, com 8, 21, 42, 60, 90 e 120 dias do pós-cirúrgico. A maioria dos animais apresentou algum grau de inflamação, sendo a recuperação no grupo tratado mais lenta se comparada ao grupo controle e, em 100% dos animais houve estímulo ao sangramento na presença da hidroxiapatita. O exame radiográfico apresentou radiopacidade crescente no defeito do grupo controle. No defeito do grupo tratado, houve inicialmente radiopacidade superior ao osso normal e diminuição gradual desta até se tornar semelhante ao osso vizinho 60 dias após a cirurgia.

Palavras-chave: hidroxiapatita, processo alveolar, radiopacidade.

**SYNTHETIC HYDROXYAPATITE OSTEOINTEGRATION
IN THE JAW ALVEOLAR PROCESS OF DOGS. CLINICAL,
SURGICALS AND RADIOGRAPHIC ASPECTS.**

DUARTE, Tatiana Schmitz, Universidade Federal de Viçosa.

Abstract

The wear of the alveolar process results in the loss of the tooth and its regeneration is required for the use of dental implant. The objective of this work was to evaluate the synthetic hydroxyapatite as bone substitute in the regeneration of the alveolar process. For that, 28 healthy adult dogs, males and females, weighing between 10 and 15 Kg, divided in two groups were used. Defects of approximately 6 x 5 mm were created in the vestibular surface of the alveolar process mandibular right until reaching the root of the fourth premolar. In a group, the defect was totally filled with synthetic hydroxyapatite while in the other it stayed without treatment, being used as control. The animals were submitted to daily clinical evaluations during one week, as well as radiographic exams just after the surgery and on days 8, 21, 42, 60, 90 and 120 of postoperative. Most of the animals presented some degree of inflammation, being the recovery slower in the treated group than in the control one and, in 100% of the animals there was bleeding stimulus in the presence of hydroxyapatite. The radiographic exams showed growing radiopacity in the defect of the control group. In the defect of the treated group, there was initially superior radiopacity when compared to the normal bone, followed by gradual decrease until becoming similar to the neighbor bone 60 days after the surgery.

Key-words: hydroxyapatite, alveolar process, radiopacity.

Introdução

A doença periodontal, os traumas acidentais e os traumas cirúrgicos provocados pela extração de dentes são algumas das causas da perda do osso alveolar. Cerca de 85% dos cães e gatos com mais de três anos de idade apresentam algum grau de enfermidade periodontal, e essa é sem dúvida a principal causa da perda do osso alveolar e perdas dentais (Emily et al, 1999).

O processo alveolar é um dos componentes do periodonto e, portanto, contribui para a inserção dos dentes na maxila e na mandíbula (Terranova et al., 1997). Ele é formado pela junção do osso alveolar, que consiste em uma fina faixa de osso cortical, com o alvéolo (Emily et al., 1999). O osso alveolar funde-se com as placas corticais nas faces vestibular e lingual através de trabéculas de osso esponjoso. A porção esponjosa do processo alveolar é contínua com a porção esponjosa da maxila e da mandíbula (Terranova et al., 1997).

Os autoenxertos ósseos são bastante requeridos em cirurgias maxilofaciais, craniofaciais, orais e em cirurgias plásticas. No entanto, o principal problema relacionado ao autoenxerto ósseo é a morbidade que acomete o local doador (Orr et al., 2001). Os aloenxertos possuem como desvantagem o risco de transmissão de doenças e rejeição (Jensen et al., 1996).

Com isto, a necessidade da utilização de implantes como forma de tratamento para várias patologias ósseas faz com que se torne fundamental o entendimento da interação do biomaterial com o ambiente vivo. A partir desse conhecimento torna-se possível a produção de implantes compatíveis com a saúde. Cerâmicas como a hidroxiapatita sintética têm sido avaliadas em defeitos intra-ósseos humanos com resultados clínicos positivos (Yukna et al., 2000) e com o intuito de substituir os autoenxertos ósseos em cirurgias ortopédicas (Oonishi et al., 1997).

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da hidroxiapatita sintética na regeneração do osso alveolar, assim como a resposta do tecido vivo ao implante. Para isso, essa cerâmica foi implantada em um defeito intra-ósseo periodontal provocado experimentalmente e a regeneração do processo alveolar e sua biocompatibilidade foram avaliadas por meio de análises clínico-cirurgias e radiológicas.

Material e Métodos

Para a realização deste experimento, foram utilizados 28 cães, clinicamente saudáveis, pesando de 10 a 15 Kg, provenientes do canil experimental do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram examinados antes de iniciar o experimento, e se descartavam aqueles que apresentassem qualquer tipo de doença oral e a ausência do quarto pré-molar inferior direito. Os animais, divididos aleatoriamente em dois grupos iguais, receberam ivermectina¹ (0,3 mg/Kg) como medicação antiparasitária e foram observados clinicamente durante sete dias. Durante essa fase, foram mantidos em baias individuais onde receberam ração comercial² duas vezes ao dia e água a vontade. O grupo 1 foi tratado com hidroxiapatita sintética³ e o grupo dois não recebeu tratamento, sendo utilizado como controle.

A hidroxiapatita utilizada neste experimento, denominada de T290800-1 é constituída da mistura de hidroxiapatita pura de 30mesh (HAP-91) com lipossoma do tipo DRV (rehidração de vesícula) obtendo-se um compósito de hidroxiapatita absorvível.

Os cães receberam, como antibioticoterapia, espiramicina e metronidazol⁴ (1 comprimido para cada 10 Kg) por via oral uma vez ao dia durante os três dias que precederam o procedimento cirúrgico. Após jejum hídrico e sólido de doze horas, os animais foram sedados com acepromazina⁵ na dose de 0,1 mg por Kg de peso vivo, por via intravenosa. Em seguida, os cães receberam indução e manutenção anestésica com pentobarbital sódico⁶ 3% em dose suficiente para permitir a intubação e o procedimento cirúrgico. Após serem posicionados em decúbito lateral esquerdo foi colocado um abre-boca e a área a ser operada foi infiltrada com lidocaína⁷ 2%.

Após a higienização da cavidade oral com solução de clorhexidine 2% foi criado um retalho mucoperiosteal na gengiva aderida correspondente ao quarto pré-molar mandibular direito. Para isso foi feita uma incisão imediatamente ventral ao sulco gengival no sentido rostro-caudal. Essa incisão se estendeu ventralmente partindo das

¹ Ivomec 1% - Merial Ltda.

² Selection Special Croc - Royal Canin Ltda.

³ Hidroxiapatita T290800-1 – J.H.S. Laboratório Químico Ltda.

⁴ Stomorgyl 10 – Merial Ltda.

⁵ Acepran 0,1% - Univet S.A. – Industria Veterinária.

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

⁷ Lidovet – Bravet Ltda.

suas bordas rostral e caudal. O retalho foi então deslocado ventralmente expondo a superfície vestibular do processo alveolar. Um defeito ósseo de aproximadamente 6 x 5 mm foi provocado no processo alveolar até atingir as raízes do quarto pré-molar com o auxílio de uma broca esférica número oito acoplada a um motor de baixa rotação⁸ com irrigação constante de solução salina isotônica (Fig. 1).

O defeito ósseo provocado nos animais do grupo um foi completamente preenchido com a hidroxiapatita sintética (Fig. 2). Para tal procedimento, a hidroxiapatita em forma de grânulos foi misturada a solução salina isotônica em uma placa de Petri e ao sangue do próprio animal tornando-se assim uma massa homogênea. A quantidade de hidroxiapatita utilizada foi de aproximadamente 1 g, suficiente para preencher todo o defeito. Nos animais do grupo dois, o defeito ósseo permaneceu sem tratamento, servindo como controle. Em todos os animais, o retalho mucoperiosteal foi reposicionado sobre o osso alveolar e suturado com pontos simples separados com fio absorvível de poliglactina 4-0⁹ (Fig. 3).

No pós-operatório, os animais receberam tratamento com espiramicina e metronidazol (1 comprimido para cada 10 Kg) por via oral a cada 24 horas durante três dias. Os cães receberam morfina por via oral¹⁰ como analgésico (5 mg/Kg) imediatamente após a recuperação anestésica e ketoprofeno 1%¹¹ (0,1 mg/Kg) injetável por via subcutânea a cada 24 horas durante três dias como medicação antiinflamatória. O local cirúrgico foi higienizado diariamente com solução de clorhexidine a 2% até a cicatrização da ferida cirúrgica.

Os animais foram mantidos em baias individuais e alimentados duas vezes ao dia com ração comercial amolecida e água à vontade durante 14 dias. Posteriormente, passaram para baias coletivas com quatro cães em cada, alimentados com a mesma ração comercial, porém, em sua forma desidratada até o final do experimento.

O exame clínico local constou de observação diária da ferida cirúrgica nos primeiros sete dias do pós-operatório. Foi avaliado o grau de reação inflamatória baseado na presença de edema e dor. Foi avaliado também o grau de hemorragia, de secreção purulenta e de deiscência da sutura. Todas as variáveis, exceto a deiscência de

⁸ Motor de suspensão - Fava Ltda.

⁹ Vicryl 4-0® - Ethicon.

¹⁰ Dimorf – Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda.

¹¹ Ketofen 1% - Rhodia-Mérieux.

sutura, foram classificadas em intensa, moderada, leve e ausente. A deiscência de sutura foi graduada em ausente ou presente.

O edema leve foi caracterizado apenas por um ligeiro aumento de volume no local da incisão cirúrgica. Enquanto que o edema moderado aparecia como um aumento de volume também na região ventral da mandíbula. O edema intenso estendia-se por toda a gengiva da mandíbula.

A dor era considerada como leve quando manifestada após o toque digital no local da incisão cirúrgica. A dor moderada se caracterizou como relutância em permitir a manipulação da gengiva para a higienização e a não aceitação do alimento mesmo manifestando apetite. Além destes sinais, os animais apresentavam-se prostrados quando sentiam dor intensa. Na ausência de dor houve manifestação de apetite imediatamente após o retorno completo da anestesia.

Foram realizadas radiografias da região operada com filme intra-oral utilizando a técnica do paralelismo (Fig. 4), imediatamente após a cirurgia com posicionamento oblíquo ventro lateral-dorso medial direito e nos dias 8, 21, 42, 60, 90 e 120 do pós-operatório visando avaliar o processo de reparação óssea. Os animais foram sedados com acepromazina 1% na dose de 0,1 mg/Kg por via intravenosa e anestesiados com pentobarbital 3% em dose suficiente para permitir o procedimento. Os filmes dentais utilizados foram fixados em um suporte e posicionados na região lingual do quarto pré-molar direito.

As radiografias foram analisadas quanto à radiopacidade em diferentes graus, no centro e na periferia do defeito, comparando o defeito provocado com o osso vizinho, considerado normal. A radiopacidade do defeito acima da radiopacidade do osso vizinho foi atribuído grau 4. A radiopacidade semelhante à do osso vizinho foi graduada como 3. Foi considerada grau 2 quando discretamente abaixo da radiopacidade do osso vizinho e graus 1 e 0 quando intensamente abaixo da radiopacidade do osso vizinho e ausência de radiopacidade, respectivamente.

Os resultados foram estudados por análise descritiva. Foram avaliadas e comparadas as médias dos graus de radiopacidade nas diferentes datas e diferentes grupos. A análise dos resultados clínico-cirúrgicos comparou, de maneira descritiva, a presença e a evolução da resposta inflamatória, da hemorragia e da infecção entre os grupos.



Figura 1- Defeito ósseo de aproximadamente 6 x 5 mm provocado no processo alveolar de cão ate atingir as raízes do quarto pré-molar com o auxílio de uma broca esférica para peça de mão número oito acoplada a um motor de baixa rotação.

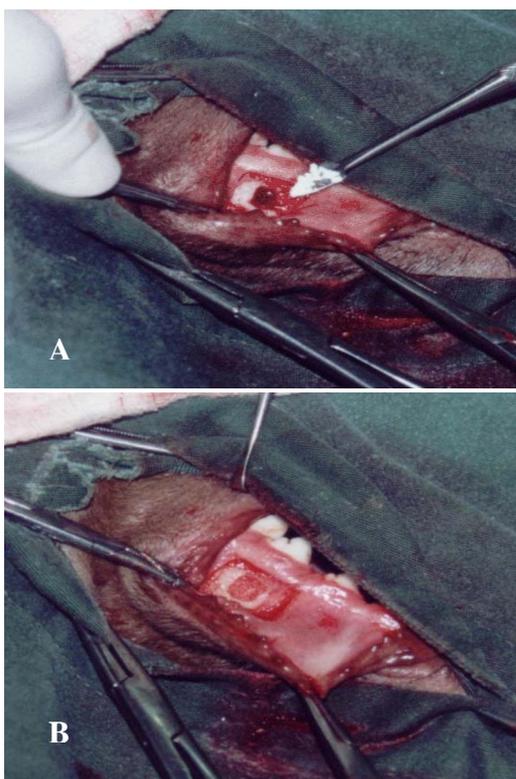


Figura 2- Defeito provocado experimentalmente no osso alveolar da mandíbula de cão sendo preenchido com hidroxiapatita sintética (A). Defeito ósseo após o preenchimento com hidroxiapatita sintética (B).



Figura 3- Retalho mucoperiosteal reposicionado sobre o osso alveolar de cão e suturado com pontos simples separados com fio absorvível de poliglactina 4-0.



Figura 4- Posicionamento para o exame radiográfico do defeito provocado no osso alveolar de cão com filme intra-oral utilizando a técnica do paralelismo. Cão sob efeito de anestesia geral.

Resultados e Discussão

A maioria dos animais, tanto no grupo tratado como no grupo controle, apresentou edema leve a moderado nos dois primeiros dias do pós-cirúrgico como mostra a tabela 1. Cinco animais do grupo tratado e um animal do grupo controle continuaram apresentando edema leve sete dias após o procedimento cirúrgico. No animal do grupo controle, o edema leve perdurou por apenas oito dias. Enquanto que nos animais tratados o edema leve perdurou, em média, mais 13 dias. Os animais do grupo controle mostraram recuperação mais rápida em relação à presença de edema (Tab. 1). No terceiro dia do pós-cirúrgico, a maioria dos cães não apresentou edema.

A maioria dos cães do grupo tratado e seis animais do grupo controle apresentaram dor leve nos dois primeiros dias após o procedimento cirúrgico. Apenas um animal do grupo tratado apresentou dor moderada no primeiro dia após a cirurgia (Tab. 2). A partir do terceiro dia do pós-cirúrgico, nenhum animal, de ambos os grupos manifestou dor. Yamamoto et al. (2000) descreveram em dois pacientes dor atribuída às partículas de hidroxiapatita em contato com tecido mole. No entanto, seus pacientes apresentaram dor por um período de seis meses, ou seja, muito superior ao deste experimento. Segundo esses autores, a hidroxiapatita no tecido mole pode provocar irritação mecânica embora raros pacientes tenham apresentado reação de corpo estranho ao exame histológico. Obviamente que o uso de agentes antiinflamatórios no pós-operatório auxiliou o controle do edema e da dor. Mesmo assim, todos os cães receberam a mesma medicação pelo mesmo período e a maioria teve algum grau de edema e dor no pós-cirúrgico enquanto outros não tiveram.

Alliot et al. (1999) atribuíram a inflamação gengival observada no pós-operatório em seus experimentos à ausência de escovação oral, ou seja, ao acúmulo bacteriano decorrente da ausência de higienização da cavidade oral dos cães. A resposta inflamatória encontrada em diferentes graus na maioria dos animais do presente experimento, diferentemente das conclusões de Alliot et al. (1999), foram atribuídas à manipulação dos tecidos moles durante o procedimento cirúrgico e a presença da hidroxiapatita. Isso porque os animais receberam higienização diária e antibioticoterapia, além do fato de que os animais tratados apresentaram maior grau de inflamação da gengiva e por um tempo mais prolongado do que os animais do grupo controle.

Tabela 1 – Classificação do edema nos primeiros 7 dias após a cirurgia envolvendo o processo alveolar da mandíbula de cães, do grupo tratado com hidroxiapatita (GT) e do grupo controle (GC).

Dias	Leve		Moderado		Ausente	
	nº de animais					
	GT	GC	GT	GC	GT	GC
01	9	9	3	3	2	2
02	9	7	1	0	4	7
03	6	6	1	0	7	8
04	3	4	1	0	10	10
05	4	4	1	0	9	10
06	5	2	0	0	9	12
07	5	1	0	0	9	13

Tabela 2 – Classificação da dor nos primeiros 7 dias após a cirurgia envolvendo o processo alveolar da mandíbula de cães, do grupo tratado com hidroxiapatita (GT) e do grupo controle (GC).

Dias	Leve		Moderado		Ausente	
	nº de animais					
	GT	GC	GT	GC	GT	GC
01	8	6	1	0	5	8
02	2	3	0	0	12	11
03	0	0	0	0	14	14
04	0	0	0	0	14	14
05	0	0	0	0	14	14
06	0	0	0	0	14	14
07	0	0	0	0	14	14

Cem por cento dos animais tratados apresentaram grande sangramento durante a cirurgia no momento em que o biomaterial entrava em contato com a gengiva e com o osso alveolar adjacentes ao defeito. Seis animais do grupo tratado e quatro do grupo controle apresentaram sangramento após o procedimento cirúrgico. Os animais tratados apresentaram hemorragia variando de leve a moderada imediatamente após o procedimento cirúrgico e perdurando até o sétimo dia de avaliação clínica. Os animais do grupo controle tiveram hemorragia leve durando no máximo dois dias após a cirurgia.

A hemorragia encontrada após a implantação da hidroxiapatita não chegou a ser um empecilho para o seu uso como concluiu Oonishi et al. (1997). Esses autores afirmaram que devido ao sangramento era difícil manter o biomaterial no local implantado. Tal fato não está de acordo com o encontrado neste experimento, onde

embora 100% dos animais tratados tiveram hemorragia após a cirurgia, somente um animal mostrou perda total da hidroxiapatita.

Apesar da aplicação de antibiótico antes e após a cirurgia, um animal do grupo tratado e um animal do grupo controle apresentaram secreção purulenta na ferida cirúrgica no quinto dia do pós-cirúrgico, perdurando até o sétimo dia de avaliação clínica. Ambos os animais apresentaram, concomitantemente, edema leve no local da cirurgia. No entanto, apenas no cão do grupo controle ocorreu deiscência de sutura.

Os sinais de infecção em apenas dois animais podem ser decorrentes de uma resposta individual, pois todos os animais tiveram os mesmos cuidados pré e pós-cirúrgicos. A infecção não deve ser atribuída à hidroxiapatita, uma vez que um animal do grupo controle também apresentou secreção purulenta. Sendo a cavidade oral um local bastante contaminado, aliado à resposta individual do animal, a probabilidade de produzir contaminação da ferida é maior do que em outros locais, como demonstrado por Jensen et al. (1996) que não constataram infecção ou deiscência de sutura quando implantaram a hidroxiapatita na tíbia de coelhos. Embora, segundo Brown et al. (1998), a contaminação bacteriana dos poros pode impedir o crescimento ósseo no interior da hidroxiapatita, não foi observado qualquer atraso na regeneração óssea, radiograficamente, nesses cães, no presente experimento.

Cinco animais do grupo tratado e seis animais do grupo controle apresentaram deiscência de sutura. Desses, apenas um cão de cada grupo não apresentou qualquer grau de edema ou de dor nos primeiros sete dias do pós-cirúrgico. Os demais cães tratados tiveram edema classificado de leve a moderado e dor leve. A deiscência aconteceu antes do oitavo dia do pós-cirúrgico em todos os animais. Em um cão pertencente ao grupo controle, no qual a deiscência ocorreu no quinto dia após a cirurgia, havia sinal de cicatrização parcial da ferida cirúrgica. Dois cães do grupo tratado tiveram deiscência da sutura nos dias três e cinco do pós-cirúrgico com perda parcial da hidroxiapatita. Em dois animais de cada grupo ocorreu hemorragia leve em algum momento antes de ocorrer deiscência de sutura. A causa da deiscência pode ser atribuída à grande tensão no local de sutura, associada à presença de edema e hemorragia na gengiva.

Brown et al. (1998) não tiveram, como resultado, sinais clínicos de inflamação ou qualquer reação adversa dos tecidos moles na presença da hidroxiapatita. Apesar da maioria dos animais, neste experimento, terem apresentado algum grau de inflamação

após a cirurgia, os resultados clínicos mostraram que a hidroxiapatita é bem tolerada pelos tecidos periodontais. O mesmo foi observado por Yukna et al. (2000).

Os animais do grupo controle obtiveram, logo após a cirurgia, escore zero quanto ao grau de radiopacidade do defeito (Fig. 5A e Tab. 3). Os defeitos ósseos preenchidos com hidroxiapatita, logo após a cirurgia, mostraram radiopacidade superior à do osso normal, ou seja, grau quatro (Fig. 6A). Da mesma maneira descrita por Yamamoto et al. (2000), as radiografias obtidas imediatamente após o procedimento cirúrgico mostraram que a hidroxiapatita foi bem implantada em relação ao osso hospedeiro. Esses dados mostram que, embora tenha ocorrido sangramento em todos os animais no momento da cirurgia ele não foi suficiente para remover a hidroxiapatita do sítio receptor.

O mesmo quadro se repetiu nas radiografias do oitavo dia pós-cirúrgico nos animais do grupo controle. Segundo Borges (1998), em todo processo de cicatrização óssea, inicialmente se desenvolve tecido fibrovascular no foco da lesão, cuja radiopacidade é insuficiente para ser perceptível ao exame radiográfico, não podendo, portanto, descartar a possibilidade de estar ocorrendo regeneração óssea nesse período.

Com oito dias do pós-cirúrgico, a análise da radiografia do grupo tratado apresentou apenas pontos de radiopacidade três ao centro e radiopacidade zero em toda a periferia (Fig. 6B). Isso sugere um processo de reabsorção da hidroxiapatita na periferia do defeito ou a reabsorção das bordas do defeito, como observaram radiográfica e clinicamente Brown et al. (1998) em seu experimento. Ou ainda, como descreveram Cullun et al. (1988), isto sugere a formação de tecido fibrovascular precedendo a formação óssea na periferia do defeito após a reabsorção da hidroxiapatita. Enquanto isso, a hidroxiapatita permanece parcialmente íntegra no centro mantendo um alto grau de radiopacidade. Um animal deste grupo apresentou radiopacidade zero em todo o defeito (Tab. 3) nesta data. Além disso, apresentou hemorragia moderada nos primeiros oito dias do pós-operatório. Tal fato pode justificar a perda da hidroxiapatita e, conseqüentemente, a radiopacidade zero.

As radiografias subseqüentes do processo alveolar tratado revelaram diminuição da radiopacidade com o passar do tempo. Aos 21 dias a radiopacidade atingiu grau dois no centro e grau zero na periferia do defeito (Fig. 6C). Com 42 dias a radiopacidade voltou a aumentar se apresentando como grau dois (Fig. 6D) até atingir grau três, em todo o defeito, 60 dias após a cirurgia (Fig. 6E). Tal fato se repetiu aos 90 e 120 dias

(Fig. 6F). Yamamoto et al. (2000), afirmaram em seu experimento que a hidroxiapatita foi removida do local por histiócitos e células multinucleadas antes que o tecido fibrovascular fosse substituído por tecido ósseo, diminuindo assim a radiopacidade ao exame radiográfico. Portanto, a diminuição inicial da radiopacidade aconteceu, provavelmente, devido à degradação da hidroxiapatita e deposição de tecido fibrovascular. Com a formação do novo osso, a radiopacidade voltou a aumentar tanto na periferia como no centro do defeito. Aos 60 dias já se pôde observar, radiograficamente, a reparação óssea completa do processo alveolar tratado de todos os cães.

Em consequência ao elevado número atômico dos seus constituintes químicos, a hidroxiapatita apresenta radiopacidade superior à do osso (Rawlings et al., 1998). Por isso, logo após a cirurgia, o defeito tratado apresentou radiopacidade quatro. Assim como observado neste experimento, Brown et al. (1998) observaram que a perda da densidade no interior do defeito ocorreu devido à substituição da hidroxiapatita pelo novo osso formado, ou seja, houve a substituição de um material mais radiopaco por um menos radiopaco. Da mesma forma, as radiografias obtidas por Yamamoto et al. (2000) mostraram, com o tempo, que as zonas de radioluscência na periferia do defeito desapareceram, aumentando a densidade do material e tornando as margens indistintas, o que sugere a biodegradação parcial da hidroxiapatita inicialmente, e a subsequente formação de um novo osso.

Diferentemente, no grupo controle houve aumento gradativo da densidade, devido à formação de novo osso e, conseqüentemente da radiopacidade. O tecido ósseo formado apresentou menor radiopacidade do que a hidroxiapatita e maior do que a do tecido fibrovascular. Portanto, assim como Borges et al. (1998), acredita-se que o crescimento ósseo no grupo tratado e no grupo controle foi caracterizado radiograficamente pela evolução da radiopacidade no defeito.

Aos 21 dias do pós-cirúrgico houve um aumento na radiopacidade dos defeitos no grupo controle, sendo classificada como grau um (Fig. 5B). Com 42 dias, o defeito ainda era perceptível. No entanto, observou-se arredondamento das suas bordas com radiopacidade dois na periferia do defeito e um no centro. Isso mostra que o maior crescimento ósseo acontece primeiramente na periferia do defeito.

Com 60 dias de pós-operatório, os defeitos ainda eram radiograficamente visíveis nos animais do grupo controle, apresentando radiopacidade dois (Fig. 5C). O

mesmo ocorreu nas datas seguintes, ou seja, aos 90 e 120 dias como mostram as figuras 5D e 5E. Portanto, pode-se afirmar que, pelo exame radiográfico, a implantação da hidroxiapatita abreviou o processo de reparação óssea no processo alveolar da mandíbula de cães mantendo a característica de osteocondução citada na literatura (De Vicente et al., 2000 e Orr et al., 2001).

Tabela 3 – Média dos graus de radiopacidade do centro e da periferia do defeito ósseo produzido no processo alveolar da mandíbula tratada com hidroxiapatita (GT) e no processo alveolar controle (GC) de cães submetidos à cirurgia experimental.

Dias do pós-operatório	nº de animais	GC		nº de animais	GT	
		Periferia do defeito	Centro do defeito		Periferia do defeito	Centro do defeito
Logo após a cirurgia	14	0	0	14	4	4
8 dias	14	0	0	14	0	2.78
21 dias	14	1	1	14	0	1.85
42 dias	14	2	1	14	2	2
60 dias	14	2	2	14	3	3
90 dias	14	2	2	14	3	3
120 dias	14	2	2	14	3	3

0-Ausência de radiopacidade

1-Radiopacidade intensamente abaixo da radiopacidade do osso vizinho.

2-Radiopacidade discretamente abaixo da radiopacidade do osso vizinho.

3-Radiopacidade semelhante a radiopacidade do osso vizinho.

4-Radiopacidade acima da radiopacidade do osso vizinho.

Em todos os animais do grupo tratado, o exame radiográfico revelou evidência de regeneração óssea, assim como, a similaridade do defeito com o tecido ósseo vizinho a partir do 60º dia indicou a osteointegração total da hidroxiapatita. Além disso, a diminuição da radiopacidade leva a crer na possibilidade de sua biodegradação, como afirmou Borges et al. (1998) em seus resultados.

As informações descritivas na forma de média dos parâmetros radiológicos mostraram que o tempo de regeneração do processo alveolar foi inferior com o uso da hidroxiapatita sintética.

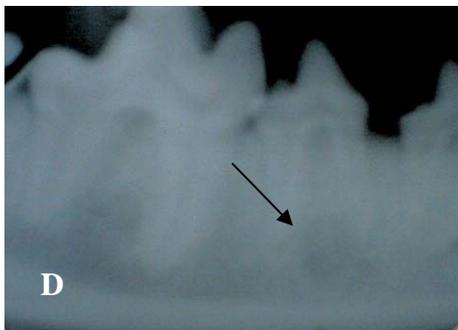
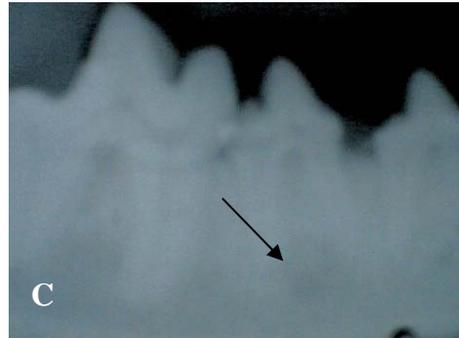
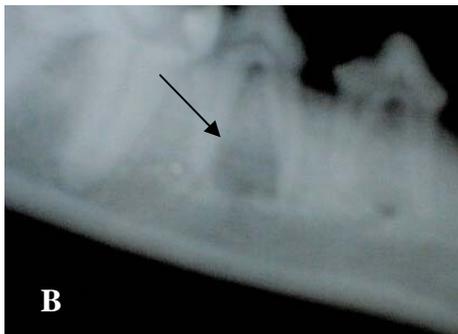
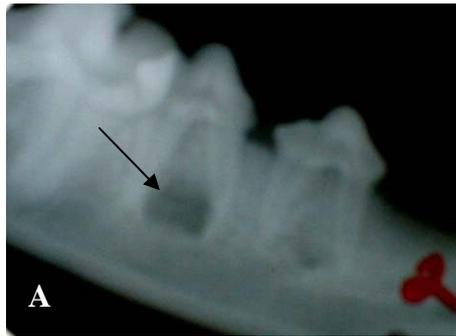


Figura 5- Radiografia da mandíbula de cães do grupo controle. **(A)** Logo após a cirurgia; **(B)** 21 dias após a cirurgia; **(C)** 60 dias após a cirurgia; **(D)** 90 dias após a cirurgia; **(E)** 120 dias após a cirurgia para a confecção do defeito. Filme intra-oral utilizando a técnica do paralelismo. Notar o aumento gradual da radiopacidade do defeito ósseo (setas).

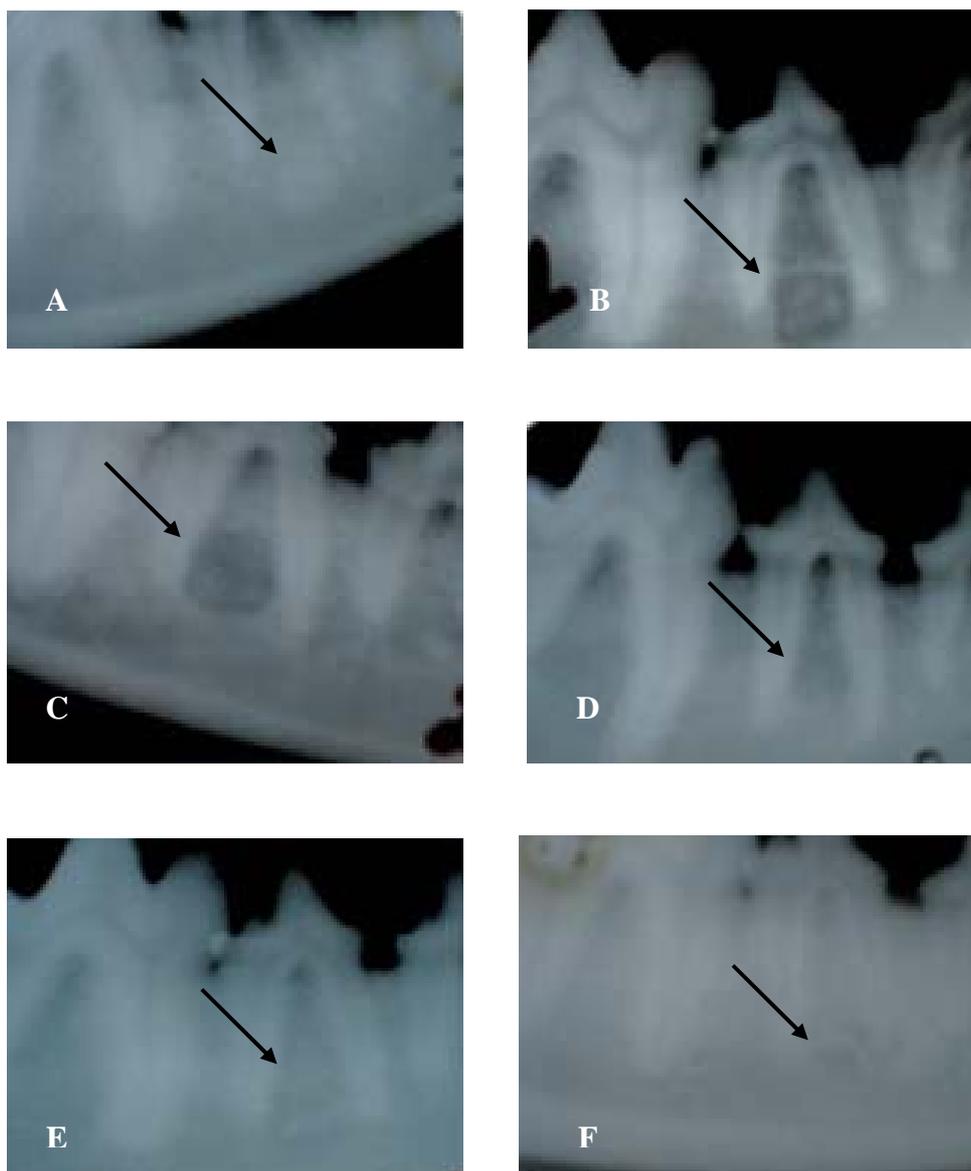


Figura 6- Radiografia da mandíbula de cães tratados com hidroxiapatita. **(A)** Logo após a cirurgia; **(B)** Oito dias após a cirurgia; **(C)** 21 dias após a cirurgia; **(D)** 42 dias após a cirurgia; **(E)** 60 dias após a cirurgia; **(F)** 120 dias após a cirurgia para a confecção de um defeito no processo alveolar do quarto pré-molar direito e a implantação da hidroxiapatita. Notar a evolução da radiopacidade do defeito ósseo (setas). Inicialmente ocorre uma diminuição da radiopacidade (com oito e 21 dias) e posteriormente um aumento gradual da densidade óssea (42, 60 e 120 dias). Filme intra-oral utilizando a técnica do paralelismo.

Conclusões

Com base nos resultados clínico-cirúrgicos e radiográficos, obtidos neste experimento, foi possível chegar às seguintes conclusões:

A hidroxiapatita acelera o preenchimento do defeito provocado no processo alveolar com um tecido de radiopacidade semelhante à do osso.

Embora na presença da hidroxiapatita ocorra hemorragia no trans e no pós-operatório e, o processo inflamatório involua de maneira mais lenta, tais fatos não inviabilizam a sua utilização como substituto ósseo.

A hidroxiapatita sintética é um substituto ósseo eficiente podendo ser recomendada com segurança em cirurgias odontológicas com o intuito de regeneração do processo alveolar no tratamento de defeitos ósseos em cães.

Referências Bibliográficas

- ALLIOT, B., PIOTROWSKI, B., MARIN, P. et al. Regeneration procedures in immediate transmucosal implants: an animal study. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* v. 14, p. 841-848, 1999.
- 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. Belo Horizonte: UFMG, Escola de Veterinária, 1998, 111p. (Tese, Doutorado).
- 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, n. 2, p. 146-157, 1998.
- CULLUN, P. E., FROST, D. E., NEWLAND, T. B. et al. Evaluation of hydroxyapatite particles in repair of alveolar clefts in dogs. *J. Oral Maxillofac. Surg.* v. 46, n. 4, p. 290-296, 1988.
- 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. Periodontics Restoration Dent.*, v. 20, n. 1, p. 41-49, 2000.
- EMILY, P., SAN ROMÁN, F., TROBO, J. I. et al. Periodontia. Enfermidade periodontal. In: ROMÁN, F. S. *Atlas de Odontologia de Pequenos Animais*. Editora Manole. São Paulo, 1999. p. 111-112.
- 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, n. 1, p. 55-66, 1996.

- OONISHI, H., KUSHITANI, S., YASUKAWA, E. et al. Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute. *Clinical Orthopaedics and related research*, 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.
- RAWLINGS, C. E., WILKINS, R. H., HANKER, J. S. et al. Evaluation in cats of a new material for cranioplasty: a composite of plaster of paris and hydroxyapatite. *J. Neurosurg.* v. 69, n. 2, p. 269-275, 1988.
- TERRANOVA, V. P.; GOLDMAN, H. M.; LISTGARTEN, M. A. O aparelho de inserção periodontal. Estrutura, função e química. In: GENCO, R. J.; GOLDMAN, H. M.; COHEN, D. W. *Periodontia Contemporânea*, 2^a ed. São Paulo. Santos Livraria Editora, 1997. cap. 2, p. 33-54.
- YAMAMOTO, T., ONGA, T., MARUI, T. et al. Use of hydroxyapatite to fill cavities after excision of benign bone tumours. *J. Bone Joint. Surg.*, v. 82-B, n. 8, p. 1117-20, 2000.
- YUKNA, R. A., KRAUSER, J.T., CALLAN, D. P. et al. Multi-center clinical comparison of combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix (ABM) / cell binding peptide (P-15) and ABM in human periodontal osseous defects. 6-month results. *J. Periodontol.* n. 71, p. 1671-1679, 2000.

OSTEOINTEGRAÇÃO DA HIDROXIAPATITA SINTÉTICA NO PROCESSO ALVEOLAR DA MANDÍBULA DE CÃES. ASPECTOS HISTOLÓGICOS.

DUARTE, Tatiana Schmitz, Universidade Federal de Viçosa.

Resumo

Objetivando avaliar a hidroxiapatita sintética como substituto ósseo na regeneração do processo alveolar foram utilizados 28 cães adultos, fêmeas e machos sadios pesando entre 10 e 15 Kg divididos em dois grupos. Foram criados defeitos de aproximadamente 6 x 5 mm 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 enquanto o outro permaneceu sem tratamento sendo utilizado como controle. Aos 8, 15, 21, 42, 60, 90 e 120 dias foram coletados fragmentos ósseos para a análise histológica sob microscopia óptica. Histologicamente foi observado crescimento ósseo e vascular no interior dos poros de hidroxiapatita, assim como uma intensa proliferação de osteoblastos e neovascularização na presença do implante. A biocompatibilidade da hidroxiapatita permitiu a sua integração com o processo alveolar através da formação direta de um osso lamelar. Portanto, ocorreu neoformação óssea à medida que a hidroxiapatita foi degradada.

Palavras-chave: reparação óssea, hidroxiapatita, osteocondução, osteoindução.

SYNTHETIC HYDROXYAPATITE OSTEOINTEGRATION IN THE JAW ALVEOLAR PROCESS OF DOGS. HISTOLOGICAL ASPECTS.

DUARTE, Tatiana Schmitz, Universidade Federal de Viçosa.

Abstract

The objective of this work was to evaluate the synthetic hydroxyapatite as bone substitute in the regeneration of the alveolar process. For that, 28 healthy adult dogs, males and females, weighing between 10 and 15 Kg, divided in two groups were used. Defects of approximately 6 x 5 mm were created in the vestibular surface of the alveolar process until reaching the root of the mandibular right fourth premolar. In a group, the defect was totally filled with synthetic hydroxyapatite while in the other it stayed without treatment, being used as control. Bone fragments were collected 8, 15, 21, 42, 60, 90 and 120 days after surgery for the histological analysis under optical microscopy. Microscopically, bone and vascular growth was observed inside the hydroxyapatite pores, as well as an intense osteoblast proliferation and neovascularization in the presence of the implant. The hydroxyapatite biocompatibility allowed its integration with the alveolar process through the direct formation of a lamellar bone. Therefore, it happens bone neof ormation as the hydroxyapatite is degraded.

Key-words: bone regeneration, hydroxyapatite, osteoconduction, osteoinduction.

Introdução

Os enxertos ósseos são comumente utilizados em cirurgias ortopédicas para o tratamento de não-união ósseas, para o preenchimento de cavidades ósseas e para a reposição de osso perdido durante a exérese de neoplasias ou traumas (Oonishi et al., 1997). No entanto, os aloenxertos assim como os autoenxertos apresentam desvantagens como o risco de transmissão de doenças, uma resposta imune incerta e a morbidade que acomete o local doador (Jensen et al., 1996, Orr et al., 2001).

Muitos materiais a base de fosfato de cálcio foram testados nos últimos anos e encontram-se disponíveis para o uso clínico com o intuito de substituir os autoenxertos ósseos em cirurgias ortopédicas (Oonishi et al., 1997). Dentre estes, se encontra 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 um novo tecido ósseo e, preferencialmente, possuir propriedade osteoindutiva ou osteocondutiva (Jensen et al., 1996). A hidroxiapatita sintética é biocompatível, não é carcinogênica e nem alergênica (Gonzalez et al., 1993; Oonishi et al., 1997), sendo um material seguro e clinicamente aceitável na obliteração de vários defeitos periodontais (Brown et al., 1998). As cerâmicas de fosfato de cálcio têm sido amplamente usadas como substituto ósseo devido a sua biocompatibilidade e a sua propriedade de osteointegração (Kurashina et al., 2002).

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). No entanto, Kurashina et al. (2002) afirmam que a hidroxiapatita possui propriedade osteoindutora quando implantada na musculatura de coelhos. Para Ripamonti & Reddi (1992) a propriedade osteoindutora dependeria da forma de apresentação do biomaterial.

A hidroxiapatita sintética pode ser encontrada em diversas formas de apresentação, tais como: densos blocos, blocos macroporosos, grânulos e pó. (Shareef et al., 1993). Os mesmos autores concluíram que a forma de apresentação da hidroxiapatita influencia as suas propriedades. White & Shors (1996) consideram que a porosidade e a

interconectividade entre os poros de hidroxiapatita são fatores importantes para permitir o crescimento ósseo e vascular no seu interior.

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito provocado pela hidroxiapatita sintética na regeneração do osso alveolar. Para isso, essa cerâmica foi implantada em um defeito intra-ósseo periodontal provocado experimentalmente e, a regeneração do processo alveolar foi avaliada histologicamente por microscopia óptica. Pretendeu-se ainda, avaliar o potencial osteocondutor da hidroxiapatita sintética, além de sua biocompatibilidade. E, por último, determinar a capacidade de acelerar o preenchimento da falha óssea com tecido ósseo neoformado ao utilizar o biomaterial supracitado.

Material e Métodos

Para compor o grupo experimental, foram utilizados 28 cães, clinicamente saudáveis, pesando de 10 a 15 Kg, provenientes do canil experimental do departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. Antes de serem introduzidos no experimento, foram examinados descartando assim qualquer tipo de doença oral e a ausência do quarto pré-molar mandibular direito. Os animais, divididos aleatoriamente em dois grupos iguais, receberam ivermectina¹ (0,3 mg/Kg) como medicação antiparasitária e foram observados clinicamente durante 7 dias. Durante essa fase, foram mantidos em baias individuais onde receberam ração comercial² duas vezes ao dia e água a vontade. O grupo um foi tratado com hidroxiapatita sintética³ e o grupo dois não recebeu tratamento sendo utilizado como controle.

A hidroxiapatita utilizada neste experimento, denominada de T290800-1 é a mistura de hidroxiapatita pura de 30 mesh (HAP-91) com lipossoama do tipo DRV (rehidratação de vesícula) obtendo-se um compósito de hidroxiapatita absorvível.

Os cães receberam, como antibioticoterapia, espiramicina e metronidazol⁴ (1 comprimido para cada 10 Kg) por via oral uma vez ao dia durante os três dias que precederam o procedimento cirúrgico. Após jejum hídrico e sólido de doze horas, os

¹ Ivomec 1% - Merial Ltda.

² Selection Special Croc - Royal Canin Ltda.

³ Hidroxiapatita T290800-1 – J.H.S. Laboratório Químico Ltda.

⁴ Stomorgyl 10 – Merial Ltda.

animais foram sedados com acepromazina⁵ na dose de 0,1 mg por Kg de peso vivo, por via intravenosa. Em seguida, os cães receberam indução e manutenção anestésica com pentobarbital sódico⁶ 3% em dose suficiente para permitir a intubação e o procedimento cirúrgico. Após serem posicionados em decúbito lateral esquerdo foi colocado um abre-boca e a área a ser operada foi infiltrada com lidocaína⁷ 2%.

Após a higienização da cavidade oral com solução de clorhexidine 2% foi criado um retalho mucoperiosteal na gengiva aderida do quarto pré-molar mandibular direito. Para isso foi feita uma incisão imediatamente abaixo da parte mais ventral do sulco gengival no sentido rostral-caudal. Essa incisão se estendeu ventralmente partindo das suas bordas rostral e caudal. O retalho foi então deslocado ventralmente expondo a superfície vestibular do processo alveolar. Um defeito ósseo de aproximadamente 6 x 5 mm foi provocado no processo alveolar até atingir as raízes do quarto pré-molar com o auxílio de um motor de baixa rotação⁸ com irrigação constante de solução salina isotônica e uma broca esférica para peça de mão número oito.

O defeito ósseo provocado nos animais do grupo um, foi completamente preenchido com a hidroxiapatita sintética. Para tal procedimento, a hidroxiapatita em forma de grânulos foi misturada a solução salina isotônica e ao sangue do próprio animal em uma placa de Petri tornando-se assim uma massa homogênea. A quantidade utilizada de hidroxiapatita foi suficiente para preencher todo o defeito. Nos animais do grupo dois, o defeito ósseo permaneceu sem tratamento, servindo como controle. Em todos os animais, o retalho mucoperiosteal foi reposicionado sobre o osso alveolar e suturado com pontos simples separados com fio absorvível de poliglactina 4-0⁹.

No pós-operatório, os animais receberam tratamento com espiromicina e metronidazol (1 comprimido para cada 10 Kg) por via oral a cada 24 horas durante três dias. Os cães receberam morfina por via oral¹⁰ como analgésico (5 mg/Kg) imediatamente após a recuperação anestésica e ketoprofeno 1%¹¹ (0,1 mg/Kg) injetável por via subcutânea a cada 24 horas durante três dias como medicação antiinflamatória. O local cirúrgico foi higienizado diariamente com solução de clorhexidine a 2% até a cicatrização da ferida cirúrgica.

⁵ Acepran 0,1% - Univet S.A. – Industria 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.

¹⁰ Dimorf - Cristália Ltda.

¹¹ Ketofen 1% - Rhodia-Mérieux.

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

Dois animais de cada grupo foram eutanasiados aos 8, 15, 21, 42, 60, 90 e 120 dias do pós-operatório para a obtenção de uma amostra contendo o defeito ósseo provocado experimentalmente e o quarto pré-molar mandibular direito. Esses animais seriam eutanasiados para controle populacional e tal procedimento foi realizado através de sobredosagem anestésica. A amostra foi fixada em formol tamponado a 10% durante cinco dias. Completada a fixação, os fragmentos foram colocados em solução descalcificante contendo ácido fórmico a 8% e ácido clorídrico a 8%, durante 30 dias sob vácuo moderado. Após esse período, foi feita a extração manual do dente e o alvéolo mantido por mais sete dias em solução descalcificante. As amostras descalcificadas, após receberem tratamento de rotina de desidratação e diafanização, foram incluídas em parafina, cortadas com espessura de quatro micrômetros e coradas pela técnica de hematoxilina e eosina.

Nas amostras coradas foram avaliados, através da microscopia óptica, o padrão de regeneração óssea, com base nos graus de proliferação e diferenciação celular, nas características da interface implante/osso hospedeiro, na presença de reação fibrovascular e no processo de degradação da hidroxiapatita. O padrão de regeneração óssea foi classificado em graus como mostra o quadro 1.

Quadro 1- Padrão de regeneração óssea do defeito provocado no processo alveolar da mandíbula de cão, no grupo preenchido com hidroxiapatita e no grupo controle.

GRAU	REGENERAÇÃO ÓSSEA
4	Avançada (completa)
3	Avançada (incompleta)
2	Moderada
1	Incipiente
0	Nenhuma

Os resultados obtidos foram estudados por análise descritiva avaliando a média do padrão de reparação óssea qualificando a presença ou não de tecido ósseo neoformado, de biocompatibilidade e de osteointegração da hidroxiapatita.

Resultados e Discussão

No oitavo dia do pós-cirúrgico nos animais do grupo controle foram observados início de reabsorção das bordas do defeito com formação de uma matriz óssea acelular e uma grande proliferação de tecido fibrovascular na sua superfície (Tab. 1). O defeito estava preenchido por um tecido de granulação pouco vascularizado com uma maior quantidade de fibras conjuntivas (Fig. 1), bastante semelhante ao encontrado por Tampieri et al. (2001).

Diferentemente, no grupo tratado, não foi observada formação de matriz óssea com oito dias de implantação. Notou-se apenas o preenchimento do defeito por coágulo. Esse atraso no grupo tratado, quando comparado ao grupo controle, pode ser devido à inibição provocada, inicialmente, pela hidroxiapatita na formação óssea como citado por Donohve & Mascres (1993). Moon et al. (1996) também não observaram formação óssea no oitavo dia do pós-cirúrgico e sim a presença de hidroxiapatita rodeada por um tecido conectivo com um infiltrado de células inflamatórias.

No entanto, Tampieri et al. (2001) observaram, aos oito dias do pós-cirúrgico, a presença de um novo osso ao redor e no interior da hidroxiapatita. Tal osso já se apresentava formado com canais de Havers e com uma estrutura lamelar. Embora estudos em coelhos e em cães não sejam diretamente comparáveis, assim como na tíbia e no processo alveolar, Jensen et al. (1996), diferentemente dos achados do presente experimento, com hidroxiapatita, encontraram com oito dias após a cirurgia um osso trabecular primitivo se estendendo do perióstio e do endóstio da tíbia de coelhos em direção ao implante e no seu interior. Portanto, não foi observada inibição da formação óssea por esses autores.

Aos 15 dias, aproximadamente 90% da borda do defeito tinha sido reabsorvida no grupo controle. No entanto, não se observaram células em sua superfície, mas, houve a formação de novo tecido ósseo que apareceu como uma faixa contínua de trabéculas espessas sobre a superfície do defeito (Fig. 2). Embora houvesse áreas de reabsorção óssea, não foram observados osteoclastos reabsorvendo o osso da superfície.

Tabela 1 – Média dos escores atribuídos à regeneração óssea no processo alveolar da mandíbula, tratada com hidroxiapatita e no processo alveolar controle, de cães submetidos à cirurgia experimental.

Dias do pós-operatório	Número de animais	Grupo tratado	Grupo controle
8 dias	2	0	1
15 dias	2	2	2
21 dias	2	1,5	2
42 dias	2	3	2
60 dias	2	3	2
90 dias	2	3	3
120 dias	2	4	4

Graduação:

0-nenhuma.

1-incipiente.

2-moderada.

3-avançada, mas, incompleta.

4-avançada e completa.

Também aos 15 dias, no grupo tratado, as partículas de hidroxiapatita, mostradas como material amorfo, acelular e bem delimitado, eram rodeadas por um novo osso (Fig. 3) que também estava presente em toda a superfície do defeito permitindo a osteointegração.

Em um outro ponto do defeito, na mesma data, foram vistas partículas de hidroxiapatita rodeadas apenas por tecido fibrovascular sem formação óssea. Isto mostra que parte do biomaterial foi isolada e não integrada ao defeito. Para Callan & Rohrer (1993) esse tecido fibrovascular é precursor do novo tecido ósseo.

Assim como nas observações de Borges (1998), a formação óssea, aos 15 dias, foi traduzida pela presença de osso jovem, com intensa atividade de osteoblastos. O grande número de osteoblastos se encontra nas bordas das trabéculas do novo osso formado como mostra a figura 3. No entanto, este autor somente observou a formação de osso trabecular, 90 dias após a implantação da hidroxiapatita na tíbia de cães enquanto Najjar et al. (1991) observaram com 45 dias. Isso sugere que a osteogênese provocada pelo implante de hidroxiapatita no osso alveolar de cães é mais acelerada do que na tíbia desta espécie. Oonishi et al. (1997) citaram em seu trabalho que a taxa de proliferação óssea depende da espécie, do local e do tamanho das partículas.

Quando se compara histologicamente o grupo tratado com o grupo controle nos 15 dias do pós-cirúrgico, observa-se que a formação óssea e a neovascularização são

muito mais evidentes na presença da hidroxiapatita. Isto sugere que esse biomaterial apresenta propriedade osteocondutora.

Com 21 dias após a implantação da hidroxiapatita, a borda do defeito, em um cão, havia sido parcialmente reabsorvida e houve a formação de uma matriz óssea acelular e a deposição de um tecido conjuntivo hemorrágico sobre a sua superfície (Fig. 4A). Além disso, a hidroxiapatita não foi observada nesta data neste defeito. O outro animal do grupo tratado e os animais do grupo controle apresentaram formação de trabéculas ósseas como mostra a figura 4B. É praticamente impossível que tenha ocorrido a reabsorção ou dissolução da hidroxiapatita como sugerem Oonishi et al. (1997). É mais provável que essa tenha se perdido durante o sangramento que ocorreu neste animal nos primeiros oito dias do pós-operatório. Embora, esses autores, já com 15 e 21 dias tenham observado a reabsorção ou dissolução da hidroxiapatita em seu experimento, eles também observaram a formação de um novo osso entre as partículas da biocerâmica no centro do defeito. A impossibilidade de ter ocorrido reabsorção ou dissolução do biomaterial no presente experimento está de acordo com os achados semelhantes de Duarte (2003 - informe do autor)¹². Esse autor observou tanto aos 21 dias como aos oito dias, radiopacidade zero em todo o defeito, sugerindo a ausência de hidroxiapatita desde o início nesse animal.

Aos 42 dias houve uma grande formação óssea no grupo tratado. Observou-se nitidamente o início da diferenciação de osso trabecular em osso lamelar caracterizado por canais de Havers muito amplos (Fig. 5). No entanto, ainda se observou osso trabecular não remodelado e áreas de grande neovascularização e hemorragia. 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.

Ainda aos 42 dias foram vistas partículas de hidroxiapatita rodeadas por tecido ósseo trabecular e presença de capilares no interior dos seus poros (Fig. 6). Essas características se devem à propriedade osteocondutora da hidroxiapatita como afirmaram Nagahara et al. (1992), De Vicente, et al. (2000) e Orr et al. (2001). Isso faz com que a hidroxiapatita funcione como um suporte para a migração de células osteoprogenitoras originadas no receptor e de túneis vasculares, permitindo a aposição óssea (Jensen et al., 1996, De Vicente et al., 2000).

¹² DUARTE, T.S. Osteointegração da hidroxiapatita sintética no processo alveolar de cães. Aspectos clínico-cirúrgicos e radiográficos, 2003.

O que é bastante evidente no grupo tratado é a grande presença de osteoblastos e a formação de muitos capilares preenchendo o defeito, além de áreas hemorrágicas. Com essas observações parece que a hidroxiapatita está provocando diferenciação celular e, portanto, apresenta propriedade osteoindutora no osso alveolar de cães. Osteoindução é a conversão fenotípica de células mesenquimais em células osteoprogenitoras, ou seja, osteoblastos e condroblastos compreendendo três fases seqüenciais: de quimiotaxia, de mitose e de diferenciação celular (Jensen et al., 1996; De Vicente, et al., 2000). Nelson et al. (1993) atribuíram propriedade indutora à hidroxiapatita, pela presença de tecido fibrovascular. Borges (1998), que encontrou crescimento de tecido fibrovascular acompanhado por células osteogênicas tanto no grupo tratado com hidroxiapatita como no grupo controle, contraria Nelson et al. (1993) afirmando que a presença de tecido fibrovascular acompanhado por células osteogênicas está sempre presente no processo normal de regeneração óssea.

Kurashina et al. (2002) provaram a propriedade osteoindutora da hidroxiapatita ao implantá-la na musculatura de coelhos. Neste experimento os autores encontraram neoformação óssea no músculo após a implantação da hidroxiapatita porosa. Ripamonti & Reddi (1992) afirmaram que a propriedade de osteoindução depende da apresentação da hidroxiapatita. Em seu experimento, esses autores mostraram um potencial osteoindutor da hidroxiapatita quando implantada na forma de cilindro na musculatura de macacos. No entanto, quando implantada na forma de grânulos não tiveram o mesmo resultado. Provavelmente, outros fatores, além da apresentação estão relacionados à propriedade osteoindutiva da hidroxiapatita. Isso porque no presente experimento, onde foi usada hidroxiapatita em grânulos, embora tenha sido implantada em tecido ósseo, pareceu haver osteoindução devido ao grande número de osteoblastos presentes e à grande proliferação vascular.

A porosidade e a interconectividade entre os poros da hidroxiapatita são fatores importantes para o sucesso do implante (White & Shors, 1986). Segundo esses autores o grau de conexão entre os poros e o seu tamanho é fundamental para permitir o crescimento vascular e ósseo no seu interior. A porosidade da hidroxiapatita utilizada nesse 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. Brown et al. (1998) afirmaram que se a porosidade se

encontra entre 200 e 300 micrômetros ocorre crescimento ósseo mineralizado no interior desses poros promovendo a osteointegração.

Com 60 dias a formação de osso lamelar no grupo tratado foi bastante evidente assim como áreas hemorrágicas (Fig. 7). A hidroxiapatita não foi mais vista, o que pode sugerir que ela já tenha sido biodegradada neste momento, embora não tenha sido observada a presença de macrófagos em qualquer momento deste experimento para comprovar tal hipótese. A probabilidade da hidroxiapatita ter se perdido totalmente devido ao sangramento observado ao exame clínico nos primeiros oito dias do pós-cirúrgico é mínima. Resultado semelhante foi encontrado por Duarte (2003 - informe do autor)¹². A pequena probabilidade de perda do biomaterial foi justificada pela avaliação radiológica do defeito no oitavo dia do pós-operatório em seu experimento, onde, na mesma data, encontrou radiopacidade no centro do defeito sugerindo a presença do biomaterial. A hipótese de reabsorção da hidroxiapatita é reforçada pelos achados de Jensen et al. (1996), onde em seu experimento, praticamente todo o implante de hidroxiapatita foi reabsorvido ainda aos oito dias do pós-cirúrgico. Os poucos fragmentos restantes estavam em plena conexão com o osso cortical vizinho, ou seja, osteointegrados.

Diferente de Borges (1998) que encontrou partículas de hidroxiapatita no interior de macrófagos, Donohve & Mascres (1993) e Arakaki et al. (1995) também não observaram sinais de fagocitose da hidroxiapatita o que poderia sugerir a sua biodegradação. As controvérsias relacionadas à biodegradação encontradas entre vários experimentos podem ser justificadas pela diferença das características físicas dos tipos da hidroxiapatita (Mora & Ouhayoun; 1995). Além disso, o mecanismo de reabsorção da hidroxiapatita é incerto, podendo estar envolvida a fratura das bordas das suas partículas à medida que ocorre a formação do novo osso no interior dos poros intragranulares (Oonishi, et al; 1997). Ou ainda, segundo White & Shors (1986), a degradação da hidroxiapatita pode ocorrer por reabsorção mediada por osteoclastos ou através de dissolução química.

Aos 90 dias, tanto no grupo tratado quanto no grupo controle, a periferia do defeito foi totalmente preenchida por osso lamelar. Apenas ao centro se observou osso trabecular.

Cento e vinte dias após o procedimento cirúrgico não havia mais um limite entre as margens do defeito e o novo osso formado, ou seja, a linha de cimentação havia

desaparecido em ambos os grupos. Portanto, o defeito estava completamente preenchido com osso compacto lamelar nos animais tratados e nos animais do grupo controle. Os resultados publicados por Yukna et al. (2000), em humanos, mostraram que o defeito ósseo periodontal foi apenas 65% preenchido com novo osso após seis meses de implantação. Os diferentes resultados obtidos neste experimento e nos de Yukna et al. (2000), podem estar também relacionados às diferenças entre espécies analisadas, aos tamanhos dos defeitos e aos tipos de hidroxiapatita utilizados por esses autores.

Oonishi et al. (1997) consideraram que o tecido formado na presença de hidroxiapatita não é totalmente ósseo e sim um composto formado por osso e por um material aloplástico que não é totalmente biodegradado ou reabsorvido. Está afirmação é contrária aos resultados obtidos neste experimento. O novo tecido formado no osso alveolar da mandíbula de cães é um tecido com características de osso compacto, e, o material utilizado, ou seja, a hidroxiapatita sintética não é mais observada a partir dos 60 dias após a sua implantação. O implante foi totalmente substituído por osso compacto aos 120 dias.

Quanto às inúmeras áreas hemorrágicas observadas histologicamente nos animais tratados, inclusive ainda aos 120 dias, podem ser devido ao traumatismo provocado pelos alimentos durante a mastigação. Devido à intensa angiogênese observada nesses animais, a ração dura foi suficiente para provocar microlesões, nos vasos recém formados, durante a mastigação e a saída de hemácias para o tecido conjuntivo circunvizinho. Portanto, talvez o período pelo qual os animais tenham sido alimentados com ração amolecida não foi suficiente para evitar tais lesões.

Em nenhum momento se observou, histologicamente qualquer reação de corpo estranho ou infecção, embora tenham sido observadas partículas de hidroxiapatita isoladas por tecido conjuntivo apenas. Diferentemente de Moon et al. (1996); Borges (1998) e Yamamoto et al. (2000), esse tecido não apresentou celularidade alguma que indicasse uma reação de corpo estranho ou um processo de biodegradação da hidroxiapatita como a presença de células gigantes e células mononucleares do tipo fagocitárias. Também não foram observadas necrose óssea, nem desintegração da matriz e osteoclasia e nem formação tipo sarcomatosa como foi citado por Borges (1998). Portanto, a ausência de células inflamatórias indica que a hidroxiapatita é biocompatível. Isto pode ser devido provavelmente à similaridade entre a estrutura física e química da hidroxiapatita sintética utilizada e o osso receptor.

Kurashina et al. (2002) observaram pouca reabsorção ou degradação da hidroxiapatita quando implantada no tecido muscular. O material apresentou a mesma forma seis meses após a implantação sendo observados apenas poucos fragmentos livres e células multinucleadas no interior da musculatura. Esses mesmos autores sugeriram que a biodegradabilidade é um fator importante para a função osteogênica das biocerâmicas, sendo fundamental a manutenção da estrutura porosa. Ripamonti (1996) enfatizou a importância da estrutura tridimensional do implante na osteogênese ectópica. De acordo com esses autores pode-se então justificar alguns resultados deste experimento. Embora não se tenha observado sinais de degradação ou reabsorção da hidroxiapatita, ela não foi observada aos 21 dias, onde também o crescimento ósseo foi mais lento. Onde a biocerâmica estava presente, a formação óssea, assim como a neovascularização foi nitidamente mais intensa. Moon et al. (1996) também não observaram sinais de reabsorção da hidroxiapatita. No entanto, o biomaterial foi visto rodeado por um tecido conectivo que foi gradualmente substituído por tecido ósseo.

Benqué et al. (1999) afirmaram que vários fatores devem influenciar a resposta dos tecidos ao implante de hidroxiapatita e a sua degradação. Dentre eles, o tamanho dos grânulos e a estrutura física da hidroxiapatita, determinando assim a sua bioabsorção, a sua biodegradação e a formação óssea. Jensen et al. (1996) afirmaram que o substituto ósseo ideal, além de outras características deve manter seu volume na fase inicial da regeneração óssea e então ser totalmente absorvido. Baseada nessa afirmação conclui-se que a hidroxiapatita usada no atual experimento se encaixa no conceito de substituto ósseo ideal segundo esses autores. Isso porque manteve seu volume constante até próximo aos primeiros 42 dias de regeneração do defeito e, posteriormente não foi mais vista, podendo ter sido reabsorvida ou degradada por completo. As características relacionadas à reabsorção da hidroxiapatita usada no presente experimento foram benéficas para a regeneração óssea embora não se tenha observado, histologicamente, diferença quanto ao tempo para o preenchimento total do defeito em relação ao grupo controle. No entanto, foi bastante nítida a diferença no número de osteoblastos e no grau de vascularização na presença da hidroxiapatita. O número de osteoblastos encontrado nas superfícies das trabéculas ósseas, assim como, a quantidade de capilares neoformados entre os grânulos de hidroxiapatita foi muito maior ao encontrado no grupo controle.

Um fator que interfere no processo de osteointegração da hidroxiapatita, segundo Brown et al. (1998), é a estabilidade do implante no local receptor. Baseado em seus resultados, esses autores afirmaram que 50 a 100 micrômetros de micromovimentos do implante no sítio receptor é suficiente para não permitir a osteointegração. A estabilidade do implante é essencial para promover a angiogênese precoce, ponto essencial para a formação óssea e conseqüentemente a osteointegração. Moon et al. (1996) atribuíram a regeneração do osso alveolar, em seu experimento, à estabilização da ferida cirúrgica através de uma membrana de poliglatina implantada sobre a hidroxiapatita. Essa membrana permitiu a maturação do coágulo no defeito periodontal.

O sangramento encontrado ao exame histológico no presente experimento, provavelmente, propiciou algum grau de instabilidade entre a hidroxiapatita e o defeito provocado. Embora, os animais tenham sido mantidos com alimentação pastosa durante duas semanas, a hidroxiapatita pode ter sofrido algum grau de movimentação como resultado da força de oclusão normal. No entanto esses fatores de instabilidade parecem não ter influenciado a regeneração óssea neste experimento, já que o único atraso observado foi em um cão, aos 21 dias, e se deve provavelmente a perda da hidroxiapatita.

Com quatro meses de avaliação é possível afirmar, histologicamente, que o osso alveolar foi reconstruído com o preenchimento total do defeito por tecido ósseo lamelar, tanto no grupo controle como no grupo tratado e, a hidroxiapatita foi toda reabsorvida ou biodegradada, embora, não tenham sido vistas células fagocitárias. Portanto, os resultados deste experimento estão de acordo com os resultados de Yukna et al. (2000), ou seja, quatro meses foram suficientes para a formação de um novo osso.

Embora na presença da hidroxiapatita a resposta óssea tenha sido mais evidente, ou seja, foi observado grande aumento na neovascularização e no número de osteoblastos, o tempo necessário para a regeneração óssea foi o mesmo para o grupo controle e para o grupo tratado. A avaliação da média dos parâmetros histológicos não apresentou diferença entre grupos em relação ao tempo necessário para o preenchimento do defeito com osso maduro.

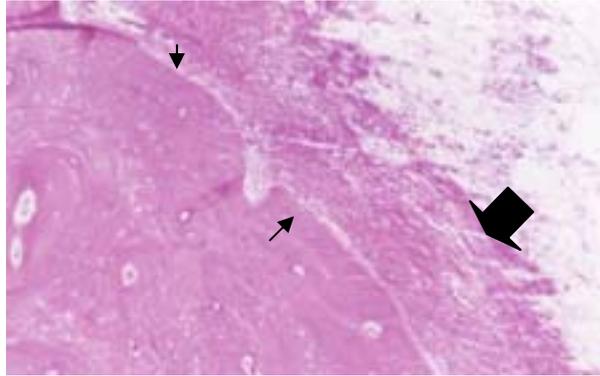


Figura 1- Início de reabsorção das bordas do defeito no processo alveolar de um animal do grupo controle, oito dias após a cirurgia para a confecção do defeito no processo alveolar direito da mandíbula (setas curtas). Formação de uma matriz óssea acelular e uma grande proliferação de tecido conjuntivo frouxo na sua superfície (seta longa). HE. 100X.

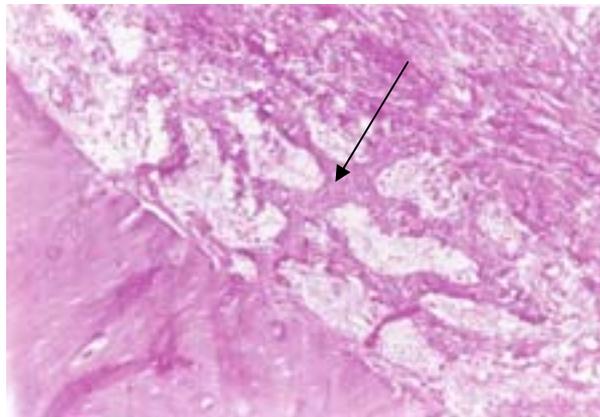


Figura 2- Formação de novo tecido ósseo trabecular, como uma faixa contínua espessa sobre a superfície do defeito (seta longa) 15 dias após a cirurgia para a confecção do defeito no processo alveolar direito da mandíbula de um cão do grupo controle. HE. 100X.

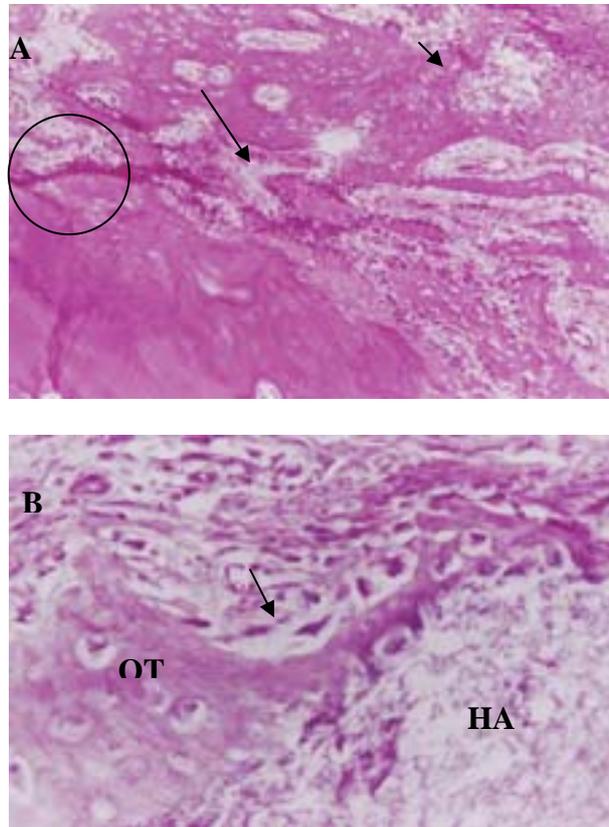


Figura 3- **(A)** Partículas de hidroxiapatita, mostradas como material amorfo, acelular e bem delimitado, rodeadas por um novo osso (seta pequena) 15 dias após a cirurgia. Observar o grande número de osteoblastos nas bordas das trabéculas do novo osso formado (seta maior) e na borda do defeito (círculo). HE. 100X. **(B)** Em maior aumento observar partículas de hidroxiapatita (HA) rodeada por um osso trabecular (OT) e osteoblastos em sua periferia (seta). HE. 400X.

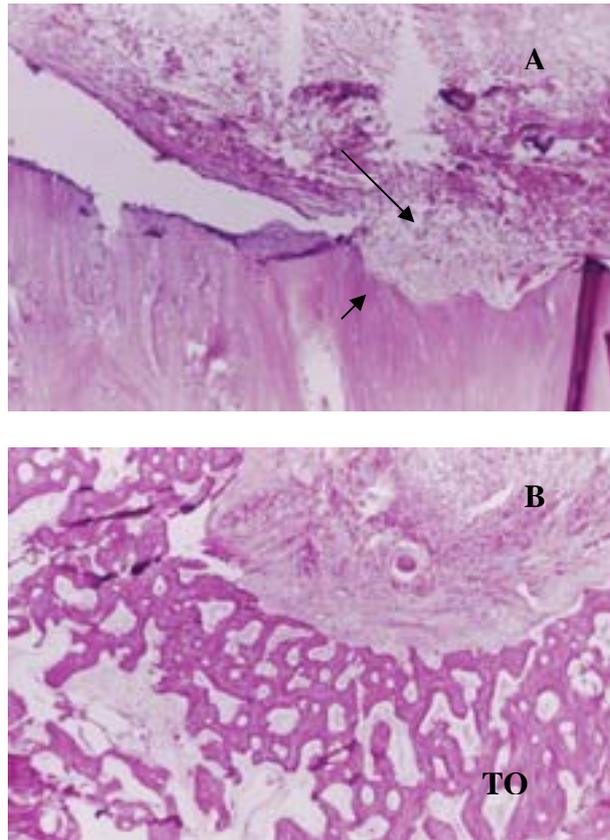


Figura 4- (A) Tecido conjuntivo hemorrágico (seta grande) sobre a superfície absorvida (seta pequena) 21 dias após a implantação da hidroxiapatita. HE. 100X. (B) Periferia do defeito sem tratamento, 21 dias após a cirurgia para a confecção do defeito, preenchida por trabéculas ósseas (TO). HE. 400X.

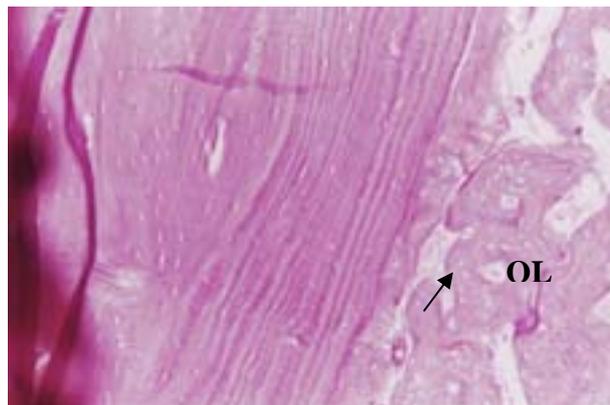


Figura 5- Início da transformação de osso trabecular em osso lamelar (OL) com canais de Havers muito amplos (seta). Quarenta e dois dias após a cirurgia. HE. 100X.

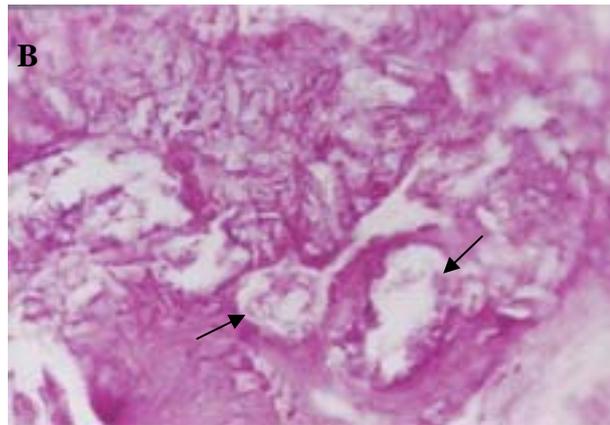
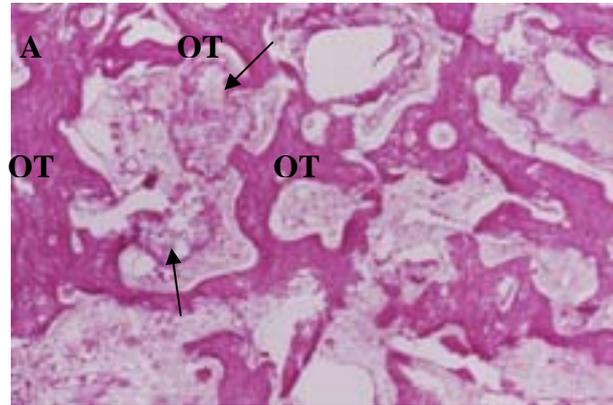


Figura 6- **(A)** Partículas de hidroxiapatita (setas) rodeadas por tecido ósseo trabecular (OT), 42 dias após a sua implantação. HE. 100X. **(B)** Presença de capilares (setas) no interior dos poros de hidroxiapatita. HE. 400X.

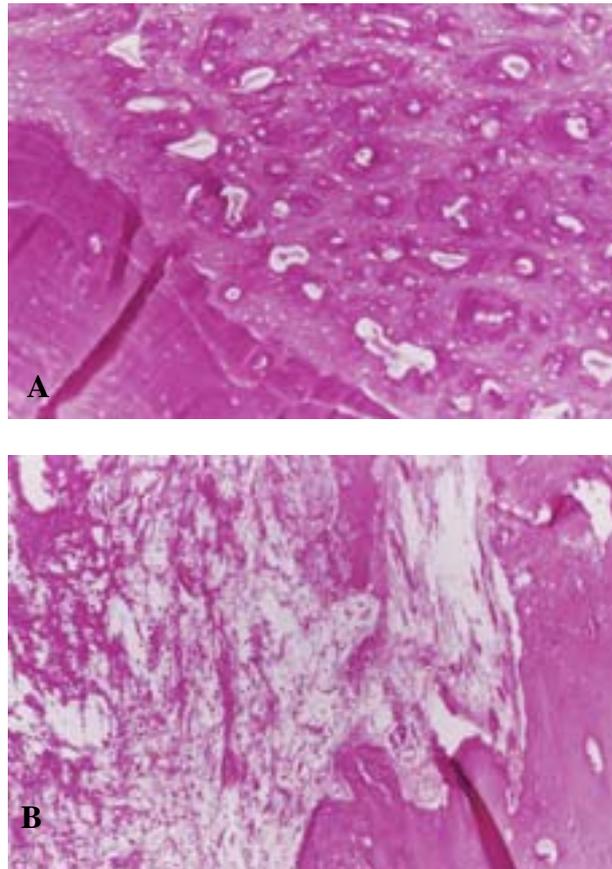


Figura 7- (A) Formação de osso lamelar no grupo tratado 60 dias após a cirurgia. HE. 100X. (B) Área hemorrágica na periferia do defeito 60 dias após a cirurgia para a implantação da hidroxiapatita. HE. 400X.

Conclusões

Com base nos resultados histológicos, obtidos neste experimento, foi possível chegar às seguintes conclusões:

A hidroxiapatita sintética é um substituto ósseo eficiente em cirurgias odontológicas com o intuito de regeneração do processo alveolar. O número de osteoblastos e de capilares neoformados é muito maior na presença da hidroxiapatita. No entanto, o tempo necessário para a regeneração óssea completa não foi menor na sua presença.

A integração da hidroxiapatita ao osso do processo alveolar ocorre através do crescimento ósseo direto no interior dos poros presentes em sua estrutura, ou seja, a sua osteointegração acontece devido a sua propriedade osteocondura.

O tipo de tecido encontrado na osteointegração da hidroxiapatita, ou seja, tecido fibrovascular e tecido ósseo trabecular e lamelar comprovam a propriedade biocompatível desse biomaterial. Portanto, a hidroxiapatita pode ser recomendada, com segurança, no tratamento de defeitos ósseos em cães.

Referências Bibliográficas

- ARAKAKI, M., YAMASHITA, S. e MUTAF, M. et al. Onlay silicone and Hydroxyapatite-Tricalciumphosphate composite (HA-TCP) blocks interfere with nasal bone growth in rabbits. *Cleft Palate-Craniof. J.* v. 32, n. 4, p. 282-289, 1995.
- BENQUÉ, E., ZAEHDI, S., BROCARD, D. et al. Tomodensitometric and histologic evaluation of the combined use of a collagen membrane and a hydroxyapatite spacer for guided bone regeneration: a clinical report. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, v. 14, n. 2, p. 258-264, 1999.
- 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. Belo Horizonte: UFMG, Escola de Veterinária, 1998, 111p. (Tese, Doutorado).
- 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, n. 2, 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, n. 6, 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. Periodontics Restoration Dent.*, v. 20, n. 1, p. 41-49, 2000.
- DONOHVE, W. B., MASCRES, 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, n. 1, p. 75-82, 1993.

- GONZALEZ, R. Hidroxiapatita porosa HA-200. Principais características físico-químicas. *Química Nova*. v. 16, n. 6, 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, n. 1, 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.
- MOON, I., CHAI, J., WIKESJO, U. M. et al. Effects of polyglactin mesh combined with resorbable calcium carbonate or repleminiform hydroxyapatite on periodontal repair in dogs. *J. Clin. Periodontol.* n. 23, p. 945-951, 1996.
- MORA, F., OUHAYOUN, J. P. Clinical evaluation of natural coral and porous hydroxyapatite implants in periodontal bone lesions: results of a 1-year follow-up. *J. Periodontol.* v.22, n.11, p. 877-884, 1995.
- NAJJAR, T. A.; LERDRIT, W.; PARSONS, J. R. Enhanced osseointegration of hydroxyapatite implant material. *Oral Surg. Oral Méd. Oral Pathol.* v. 71, p.9-15, 1991.
- 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, n. 1, p. 72-79, 1992.
- NELSON, S. R., WOLFORD, L. M., LAGOW, R. J. et al. Evaluation of new high-performance calcium polyphosphate bioceramics as bone graft materials. *Journal Oral Maxillofac. Surg.*, v. 51, p. 1363-1371, 1993.

- OONISHI, H., KUSHITANI, S., YASUKAWA, E. et al. Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute. *Clinical Orthopaedics and related research*, 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., REDDI, A. H. The critical role of geometry of porous hydroxyapatite delivery system in induction of bone by osteogenin, a bone morphogenetic protein. *Matix*. n. 12, p. 202-212, 1992.
- 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, n. 1, p. 69-75, 1993.
- TAMPIERI, A., CELLOTI, G., SPRIO, S. et al. Porosity-graded hydroxyapatite ceramics to replace natural bone. *Biomaterials*, n. 22, p. 1365-1370, 2001.
- WHYTE, E., SHORS, E. C. Reconstructive implant surgery and implant prosthodontics I. Biomaterial aspects of Interpore-200 porous hydroxyapatite. *Dental Clinics of North America*. v. 30, n. 1, p. 49-67, 1986.
- YAMAMOTO, T., ONGA, T., MARUI, T. et al. Use of hydroxyapatite to fill cavities after excision of benign bone tumours. *J. Bone Joint. Surg.*, v. 82-B, n. 8, p. 1117-20, 2000.
- YUKNA, R. A., KRAUSER, J.T., CALLAN, D. P. et al. Multi-center clinical comparison of combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix (ABM)

/ cell binding peptide (P-15) and ABM in human periodontal osseous defects. 6-month results. J. Periodontol. n. 71, p. 1671-1679, 2000.

CONCLUSÕES GERAIS

Os achados clínico-cirúrgicos coincidiram com os achados obtidos na microscopia óptica. Do mesmo modo, os achados radiográficos coincidiram com as evidências clínico-cirúrgicas. Com base nesses resultados foi possível chegar às seguintes conclusões:

A hidroxiapatita acelera o preenchimento do defeito provocado no processo alveolar com um material de radiopacidade semelhante a do osso. Além disso, a proliferação celular e a neovascularização são muito maiores na presença da hidroxiapatita.

A integração da hidroxiapatita ao osso do processo alveolar ocorre através do crescimento ósseo direto no interior dos poros presentes em sua estrutura, ou seja, a sua osteointegração acontece devido a sua propriedade osteocondura.

Embora na presença da hidroxiapatita ocorra grande hemorragia no trans-operatório que perdura, com menor intensidade no pós-operatório e, o processo inflamatório involua de maneira mais lenta, tais fatos não inviabilizam a sua utilização como substituto ósseo.

O tipo de tecido encontrado na osteointegração da hidroxiapatita, ou seja, tecido fibrovascular e tecido ósseo trabecular e lamelar representam a propriedade biocompatível desse biomaterial. Portanto, por sua propriedade osteocondutora e, por ser biocompatível, a hidroxiapatita sintética é um substituto ósseo eficiente podendo ser recomendada com segurança em cirurgias odontológicas com o intuito de regeneração do processo alveolar no tratamento de defeitos ósseos em cães.