

AVALIAÇÃO DO EFEITO OSTEOINDUTOR DA HIDROXIAPATITA E DO BIOVIDRO IMPLANTADOS EM TECIDO SUBCUTÂNEO DE CÃO

Emily Correna Carlo¹
Andrea Pacheco Batista Borges²
Cleuza Maria de Faria Rezende³
José do Carmo Lopes Moreira²
Cláudio César Fonseca²
Kelly Cristine Sousa Pontes²
Tatiana Schimtz Duarte²

RESUMO

Grandes defeitos ósseos ocorrem em número crescente de pessoas e animais, sendo necessários bons substitutos ósseos para a sua correção cirúrgica. Com o objetivo de estudar o efeito osteoindutor do biovidro (BV) e da hidroxiapatita sintética (HA), esses biomateriais foram implantados no tecido subcutâneo de cães. Foram utilizados oito animais, quatro deles receberam HA e os outros quatro receberam BV particulado. Os materiais foram misturados a gotas de sangue do próprio animal operado, formando uma massa que foi implantada no tecido subcutâneo. Os animais foram submetidos a avaliações clínicas diárias, realizando-se biópsias em dois deles de cada grupo aos 8, 15, 30 e 45 dias após a cirurgia, e o material foi então processado para observação à microscopia óptica. Nas lâminas que continham a hidroxiapatita foram observados infiltrado celular intenso, com células gigantes do tipo corpo estranho, e reação inflamatória exsudativa inicial importante, que posteriormente se tornou granulomatosa. Nas lâminas dos animais com o biovidro, até os 30 dias, verificou-se infiltrado discreto, predominantemente macrófago, e, aos 45 dias, predominava infiltrado fibroso. Em nenhuma lâmina foi contestada qualquer evidência de degradação das partículas dos biomateriais analisados ou formação ectópica de tecido ósseo; portanto, conclui-se que os dois biomateriais não são osteoindutores.

Palavras-chave: Osteoindução, biomateriais, cerâmicas.

ABSTRACT

OSTEOINDUCTIVE EFFECT OF HYDROXYAPATITE AND BIOGLASS IMPLANTED IN SUBCUTANEOUS TISSUE OF DOGS

Large bone defects occur in both animals and humans, bringing the need for good bone substitutes for surgical procedures. The objective of this work was to study the osteoinduction properties, if any, of separately and subcutaneously implanted particulate bioglass and synthetic hydroxyapatite in dogs. Eight dogs were divided into two groups; four animals received synthetic hydroxyapatite and the others received bioglass. During surgery, each of these biomaterials was mixed with drops of the animal's own blood and the ensuing mass was implanted into the subcutaneous tissue. The animals were subjected to daily clinical evaluations. Biopsies were performed in two dogs at 8, 15, 30 and 45 days after surgery and the collected materials processed for analyses with optical microscopy. Microscopy showed an intense cell infiltrate in the hydroxyapatite group, with multinucleated giant cells and an initially inflammatory exudation, which later became granulomatous. With the bioglass, a slight macrophage infiltrate was observed on days 8, 15, and 30, which later changed into a fibrous infiltrate. There was no indication of bioglass or hydroxyapatite degradation. It was concluded that neither bioglass nor hydroxyapatite promotes osteoinduction as no evidence of heterotopic bone formation was found *in situ* throughout the experiment.

Key words: Osteoinduction, biomaterials, ceramics.

¹ Departamento de Veterinária – Universidade Federal de Viçosa - Av. P. H. Rolfs, s/n, CEP 36570-000 - Viçosa, MG. Mestranda - Bolsista CAPES. E-mail: emilycarlo@yahoo.com.br

² Departamento de Veterinária – Universidade Federal de Viçosa - Viçosa, MG

³ Departamento de Clínica e Cirurgia - Escola de Veterinária - UFMG - Av. Antônio Carlos, 6627- CEP 30123-970 - Belo Horizonte - MG

INTRODUÇÃO

Um número cada vez maior de pessoas e animais sofre de afecções ósseas e necessita de intervenções cirúrgicas, e os grandes defeitos ósseos resultantes dessas afecções neoplásicas, congênicas, infecciosas e traumáticas representam os maiores desafios para os cirurgiões (Eid *et al.*, 2001; Xynos *et al.*, 2001). Tais problemas geram contínua demanda por substitutos ósseos eficientes nas cirurgias ortopédicas, craniomaxilofaciais, plásticas reconstrutivas e odontológicas (Shapoff *et al.*, 1997; Ilan & Ladd, 2003; ElBatal *et al.*, 2003).

Numerosos materiais têm sido desenvolvidos para resolver esses problemas, sendo alguns utilizados para corrigir defeitos ósseos e outros para fabricar ou recobrir próteses (Karatzas *et al.*, 1999; Eid *et al.*, 2001). Dentre os materiais, os sintéticos ou implantes atualmente vêm ganhando mais aceitação, já que são substâncias que podem ser fabricadas em quantidade ilimitada, são imunologicamente inertes e bem tolerados pelo organismo (Piecuch, 1982; Hattar *et al.*, 2005). O biovidro e a hidroxiapatita são materiais bioativos estudados para utilização na odontologia, principalmente no tratamento da doença periodontal, preenchendo falhas ósseas, diminuindo a profundidade das bolsas periodontais com ganho na adesão gengival e também no recobrimento de implantes. Na ortopedia, são utilizados em fraturas com perda óssea, defeitos metafisários, uniões retardadas, não-uniões, artrodeses e no recobrimento de próteses. Em otorrinolaringologia e cirurgia maxilofacial, são úteis para fabricação de próteses e preenchimento de falhas ósseas (Hench & Wilson, 1984; Oliva *et al.*, 1998; MacNeill *et al.*, 1999; Eid *et al.*, 2001; Ilan & Ladd, 2003; Bosetti & Cannas, 2005).

Um biomaterial é aquele que provoca resposta biológica específica na interface do material com o tecido (ElBatal *et al.*, 2003). Sabe-se que nenhum material implantado em tecido vivo é inerte. Todos provocam alguma resposta do tecido. Quatro tipos de respostas são possíveis: se o material é tóxico, o tecido circundante morre; se não é tóxico e dissolve, o tecido circundante irá substituí-lo; se não é tóxico e biologicamente inativo, uma cápsula fibrosa se forma; e se não é tóxico e biologicamente ativo, forma-se uma ligação entre eles (Hench & Wilson, 1984). As biocerâmicas, dentre elas o biovidro e a hidroxiapatita, são os únicos materiais que fornecem integração biológica com o tecido onde são implantadas (Kim, 2003).

O biovidro é um material biocompatível, e sua reatividade química em fluidos teciduais é a base de sua excelente ligação com os tecidos. Sua forma particulada (90-710 μm) é composta de óxidos de cálcio e sódio, pentóxido de fósforo e dióxido de silício (DeForge, 1997; Greer & Pearson, 1998). Inicialmente ocorre uma troca de íons com concomitantemente dissolução do dióxido de silício. Ocorre então a formação de um gel de silício que serve como núcleo para a formação de uma camada de fosfato de cálcio (CaP). Essa camada cristaliza em uma estrutura de apatita, onde colágeno, sulfato de condroitina e glicosaminoglicanos do microambiente local são incorporados por essa camada crescente, o que produz uma ligação mecânica muito forte entre o material implantado e o tecido do hospedeiro. Estudos indicaram que a ligação do colágeno ao gel de silício ocorre muito rapidamente, sendo esse um dos fatores importantes para a bioatividade destas cerâmicas (Hench & Wilson, 1984; Gao *et al.*, 1995; Shapoff *et al.*, 1997; Karatzas *et al.*, 1999; Silver *et al.*, 2001; Lossdörfer, 2004).

A hidroxiapatita sintética tem sido estudada desde o início dos anos 1970, já que sua forma natural é um elemento essencial dos componentes calcificados do esqueleto, e é o principal mineral do osso, esmalte, cimento e dentina (Greer & Pearson, 1998; Ono *et al.*, 2000; Cehreli *et al.*, 2003). Sua estrutura é representada pela fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, e há deposição de cálcio e fósforo no microambiente da interface entre o osso e essa cerâmica onde os componentes são osteoblastos, uma camada de fibras colágenas livres, outra de colágeno, porém um pouco mais organizada e matriz (Gao *et al.*, 1995; Kim, 2003). Comparada a hidroxiapatita sintética, a camada na superfície bioativa do biovidro é mais similar à apatita do tecido ósseo em termos de cristalinidade e, conseqüentemente, a ligação deste com o osso tem se mostrado melhor (Oliva *et al.*, 1998).

A camada rica em cálcio e fósforo, que ocorre na interface das biocerâmicas, formada nos primeiros estágios após a implantação em um tecido, é a responsável pela propriedade osteocondutora (Schepers *et al.*, 1998). Esse tipo de camada não é observada na interface de implantes de metal ou polímeros (Kim, 2003). As partículas de biovidro sofrem erosões internamente, provocadas por células que fagocitam o material, entrando por pequenas rachaduras e formando um local protegido que permite fácil adesão de células osteoprogenitoras (Schepers *et al.*, 1998; Macneill *et al.*, 1999). A hidroxiapatita é osteocondutora, também atuando como uma matriz passiva para o crescimento ósseo em que

células osteoprogenitoras se fixam (ElDeeb *et al.*, 1989; Yamasaki & Sakai, 1992). Osteocondução é o processo pelo qual o tecido ósseo cresce das margens de um defeito ósseo sobre um material suporte, ocorrendo migração de células osteoprogenitoras (Piatelli *et al.*, 2000; Eid *et al.*, 2001; Ilan & Ladd, 2003).

Piatelli *et al.* (2000) demonstraram a osteocondutividade do biovidro quando observaram que no centro do defeito ósseo tratado com esse biomaterial havia formação óssea, enquanto no grupo controle a formação óssea ocorreu somente na periferia do defeito. Tsiomis (2004) também o fez ao demonstrar que a formação óssea a ele associada ocorria a partir das bordas do defeito ósseo de forma mais acentuada que no grupo não tratado, enquanto Hattar *et al.* (2005) demonstraram o estímulo da função de células semelhantes a osteoblastos promovendo a proliferação e diferenciação celular. Fehlberg (2001) demonstrou a osteocondutividade da hidroxiapatita quando a utilizou em fraturas no terço médio da tibia de cães, assim como Borges *et al.* (2000) em defeito experimental no terço proximal da tibia de cães.

A partir da observação da propriedade osteocondutora dos enxertos e implantes, foi proposta a capacidade osteoindutora. Osteoindução pode ser definida como indução de células progenitoras não diferenciadas que não estão ainda comprometidas com a linhagem osteogênica, a formar células osteoprogenitoras, ou seja, as células osteogênicas, e então osteoblastos e osteoclastos, como na ossificação intramembranosa (Dellmann & Brown, 1982; Habibovic, 2005). Osteoindução não é apenas o processo pelo qual células imaturas são recrutadas e estimuladas a formar novo osso, mas também a capacidade de induzir a formação de osso em diversos lugares. É altamente impróprio falar de osteoindução quando um material é implantado em um local esquelético como tendão, ligamento ou músculo ou quando em cultura de osteoblastos. Somente o critério de formação de osso em tecido vivo em locais extra-esqueléticos ectópicos comprova a verdadeira capacidade osteoindutora de um material (Zaffe, 2005).

Estudos sobre a propriedade osteoindutora das biocerâmicas são controversos. Abiraman *et al.* (2002) implantaram o biovidro em músculo de coelhos, associado à cola de fibrina, onde observaram formação óssea. Quando não-associado à cola, não houve formação óssea. Yamasaki & Sakai (1992) utilizaram hidroxiapatita porosa e densa no subcutâneo de cães e observaram

formação óssea heterotópica apenas ao redor do tipo poroso, com grande variação no tempo de formação. Nihouannen *et al.* (2005) implantaram a biocerâmica fosfato de cálcio microporoso bifásico em músculo de ovelhas e verificaram trabéculas ósseas em contato íntimo com os grânulos do material implantado.

Apesar das controvérsias a respeito da capacidade osteoindutora, estudos indicam grande eficácia de utilização das biocerâmicas no tratamento de vários defeitos ósseos, mesmo se conhecendo apenas partes dos mecanismos pelos quais elas atuam (Zaffe, 2005). DeForge (1997) observou excelente regeneração óssea quando utilizou o biovidro na manutenção do processo alveolar da mandíbula e maxila de cães após extrações dentárias e tratamentos de defeitos ósseos, e Oonish *et al.* (1999), trabalhando com diversos substitutos ósseos, relataram proliferação óssea mais rápida do que a hidroxiapatita sintética. Franco *et al.* (2001) utilizaram o último em defeitos provocados em tibia de cães e obtiveram ótimos resultados na formação de trabéculas ósseas. Fujishiro *et al.* (1997) utilizaram esses dois biomateriais separadamente em fêmur de coelho e constataram que o biovidro estimula uma formação trabecular mais rápida.

Com tantos estudos demonstrando a eficácia dessas cerâmicas, porém sem a certeza se além da osteocondução possuem também como propriedade a osteoindução, este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a resposta a esses implantes, com especial atenção ao possível efeito osteoindutor. Então, além de avaliar a resposta geral aos implantes, procurou-se qualquer evidência histológica de formação óssea sobre seus grânulos implantados em tecido mole, sem direta aproximação com o tecido ósseo.

MATERIAL E MÉTODOS

Para realização deste experimento foram utilizados oito cães adultos clinicamente sadios entre dois e quatro anos de idade, sem raça definida, pesando em média 15 kg, provenientes do Canil Experimental do Departamento de Veterinária da UFV, com aprovação da Comissão de Ética do DVT / UFV, processo número 08/2006.

A hidroxiapatita sintética (HAP-91)³ foi acondicionada em frascos de vidro com tampa rosqueada, em quantidade pré-determinada, e colocada em autoclave a 120-130 °C, sob 1,5 atmosfera de pressão, durante 30 minutos. Não foi necessária nenhuma preparação prévia do biovidro⁴ particulado, já que este é fornecido pelo fabricante pronto para utilização.

³ HAP-91- J. H. S. Laboratório Químico Limitada. Belo Horizonte, Br.

⁴ Consil® Bioglass®- USBiomaterials. Edgewood, USA.

Os procedimentos clínicos, cirúrgicos e o acompanhamento preventivo foram realizados por médico veterinário durante todo o processamento experimental. Os animais foram divididos em dois grupos de quatro cada, onde no primeiro foi utilizada a HAP- 91 e no outro empregou-se o biovidro. Os animais foram sedados, utilizando acepromazina⁵ pela via endovenosa e tricotomizados na região caudal da última costela de ambos os antímeros. Foram anestesiados com tiopental⁶ também pela via endovenosa e então posicionados primeiramente em decúbito lateral direito. A exposição do subcutâneo ocorreu através de incisão longitudinal de pele, logo após a última costela. Aproximadamente 0,5 grama de uma das cerâmicas foi misturada a duas ou três gotas do sangue do próprio animal, como orientação do fabricante, imediatamente antes de sua utilização, formando uma massa que foi então introduzida em um túnel feito no subcutâneo. A incisão foi suturada com pontos simples separados utilizando-se fio de náilon⁷. O mesmo procedimento foi realizado no antímero esquerdo.

Todos os animais foram submetidos a avaliações clínicas diárias, com avaliação da ferida cirúrgica, observando-se a presença de reação inflamatória, edematosa e sensibilidade dolorosa. Não foi utilizado antibiótico ou antiinflamatório durante o experimento, devido à possibilidade de interferência na reação do tecido adjacente aos materiais, permanecendo o técnico responsável de plantão para salvaguardar qualquer alteração que pudesse vir a causar desconforto aos animais, com procedimentos direcionados ao retorno do seu bem-estar, inclusive a eutanásia, se necessário fosse. Os pontos foram todos retirados no oitavo dia após a cirurgia.

Para realização de biópsias, os animais foram sedados com acepromazina e anestesiados com tiopental, assim como nos procedimentos cirúrgicos descritos anteriormente. Todo o pós-operatório foi acompanhado por médico-veterinário de plantão. No ato da biópsia, retirou-se toda a área contendo o material implantado e o tecido adjacente. Elas foram realizadas em dois animais de cada grupo aos oito dias após a cirurgia, no antímero esquerdo e aos 15 dias, no direito. Aos 30 e 45 dias após a cirurgia, a biópsia foi realizada nos outros dois cães restantes de cada grupo, respectivamente nos antímeros esquerdo e direito. As amostras coletadas foram fixadas em formol a 10%, neutro e tamponado.

Após completa fixação, as amostras foram desidratadas, clarificadas, incluídas em parafina e seccionadas a 7 µm. De cada bloco de parafina foram obtidas pelo menos duas lâminas, para que fossem submetidas às técnicas de coloração pela hematoxilina-eosina, visando análise histológica da amostra.

Os parâmetros analisados foram: infiltração de células inflamatórias, vascularização, invasão celular com agregação de células mesenquimais, tipo de tecido infiltrado entre as partículas, nível de degradação do material e formação ectópica de tecido ósseo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tecido subcutâneo do flanco foi eleito como modelo experimental, pois é de fácil exposição e menor traumatismo cirúrgico, contribuindo para uma resposta fisiológica mais rápida. Além disso, fazia-se necessário implantar os materiais em um tecido onde existissem células progenitoras não-comprometidas com a linhagem osteogênica que comprovassem a existência ou não da propriedade osteoindutora.

De acordo com Beresford *et al.* (1993), a formação de osso *in vivo* é dependente do recrutamento de precursores mesenquimais que sofrem diversas fases proliferativas antes da diferenciação a um fenótipo que suporta a deposição de matriz e sua mineralização. O tecido subcutâneo tem sido utilizado para testar a atividade osteoindutora de diversos materiais, já que fornece os precursores mesenquimais necessários para diferenciação em células osteoprogenitoras (Calhoun & Stinson, 1982; Stevenson, 1998; Eid *et al.*, 2001), estando de acordo com Zaffe (2005), o qual afirmou que só se pode falar de osteoindução em locais extra-esqueléticos, onde não existem células progenitoras já comprometidas com a linhagem osteogênica.

Durante o procedimento cirúrgico, observou-se que tanto o biovidro como a hidroxiapatita são de fácil manuseio e aplicação. Vogel *et al.* (2001) referiram-se a essa propriedade como especialmente importante para sua utilização no preenchimento de falhas ósseas. O mesmo foi relatado por DeForge (1997), Shapoff *et al.* (1997), Schepers *et al.* (1998) e Tsiomis (2004). No caso da HAP-91, logo no início de sua aplicação sobre a lesão ocorreu estímulo do sangramento; entretanto, a simples compres-

⁵ Acepran® 1% - Univet SA Indústria Veterinária. São Paulo, Br.

⁶ Tiopental® 1g - Cristália. Itapira, Br.

⁷ Technofio. São Paulo, Br.

são foi suficiente para promover a hemostasia. MacNeill *et al.* (1999) e Borges *et al.* (2000) tiveram conclusão semelhante utilizando a hidroxiapatita em defeitos ósseos provocados em tibia de cães e coelhos, respectivamente. Duarte (2003) descreve grande sangramento durante a cirurgia no momento em que essa cerâmica entrou em contato com a gengiva e o osso alveolar adjacentes ao defeito provocado experimentalmente em mandíbula de cães, também observado por Fehlberg (2001) em falha óssea provocada na tibia de cães. No presente experimento o biovidro se comportou-se de maneira inversa, ao passo que, ao ser aplicado, notou-se contenção do sangramento normal dos tecidos incisados. Este efeito hemostático também foi observado por Karatzas *et al.* (1999), MacNeill *et al.* (1999) e Tsiomis (2004). Shapoff *et al.* (1997) atribuíram esse efeito à grande capacidade de coesão das partículas deste material, resultando em melhor compactação.

Em um animal do grupo em que se utilizou o biovidro, foi observado, logo após o término da cirurgia, discreto aumento de volume no local da aplicação do material apenas do antímero esquerdo, possivelmente pela ruptura accidental de um vaso, que persistiu por dois dias sem, contudo, apresentar nenhum sinal de dor ao toque, hemorragia ou sinais clínicos de rejeição. Em todos os animais a cicatrização da ferida cirúrgica ocorreu por primeira intenção, normalmente sem nenhum sinal de reação inflamatória ou evidência de rejeição, hemorragia, dor ou edema. Shapoff *et al.* (1997) observaram que os tecidos moles (gengiva, neste caso) toleraram bem a presença do biomaterial, assim como Karatzas *et al.* (1999). Neste experimento ambos os materiais apresentaram-se imóveis e facilmente palpáveis debaixo da pele, o que também foi observado por Piecuch (1982).

Aos 30 dias em um animal que recebeu a HAP-91 observou-se aumento de volume e exsudato viscoso de coloração amarelada no local de implantação do material, sugestivo de reação inflamatória purulenta.

Na análise histológica, aos oito dias após a cirurgia, observou-se nas adjacências da HAP-91 um infiltrado de células mono e predominantemente polimorfonucleares, edema e vasocongestão, caracterizando uma reação exsudativa. Ainda nesse grupo, foram verificadas algumas células gigantes multinucleadas. No grupo em que se utilizou o biovidro, existiu predomínio de células mononucleares (macrófagos) no interstício, porém esse infiltrado apresentou-se em quantidade muito menor quando comparado ao da hidroxiapatita (Fig. 1). Não foi observado nenhum fenômeno exsudativo significativo.

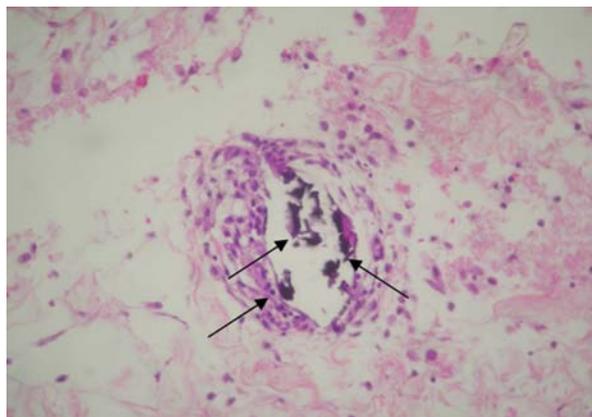


Figura 1. Análise histológica do grupo contendo biovidro aos oito dias após a cirurgia: infiltrado celular discreto; partículas de biovidro (setas) com aspecto amorfo, acelular, bem delimitado e basofílico. 400X.

Ambos os materiais apresentavam-se com aspecto amorfo, acelular, bem delimitado e basofílico, demonstrando que eram materiais calcificados (Fig. 1).

Nas amostras obtidas aos 15 dias após a cirurgia observou-se, ao redor das partículas da HAP-91, reação inflamatória com redução do número de mononucleares em comparação às lâminas aos oito dias e grande número de células gigantes multinucleadas quando comparado com biovidro. Os fenômenos exsudativos observados aos oito dias estavam sendo substituídos por uma discreta proliferação fibroblástica, formação de tecido fibroso e nítida tendência ao encapsulamento. É interessante salientar que a HAP-91 foi verificada no citoplasma dessas células gigantes multinucleadas (Fig. 2A). Analisando as lâminas do grupo em que se utilizou o biovidro, notou-se maior vascularização no tecido localizado entre as partículas do material em relação aos oito dias. Existia pequena população de macrófagos no interstício, com reação exsudativa muito discreta quando comparado à HAP-91. Não foi observada formação de pseudocápsula.

Na análise do material coletado, aos 30 dias, notou-se que a população de neutrófilos havia diminuído consideravelmente, comparativamente às lâminas anteriores, sendo estes substituídos por uma reação granulomatosa com grande número de células gigantes multinucleadas, tipo corpo estranho, e uma pseudocápsula ao redor da HAP-91. Confirmou-se reação inflamatória purulenta naquele animal que apresentou exsudato amarelado aos 30 dias, ao ser observada microscopicamente uma reação inflamatória caracterizada predominantemente por neutrófilos. Já nas lâminas de biópsia que continham biovidro, foram observados, ao redor do material, septos

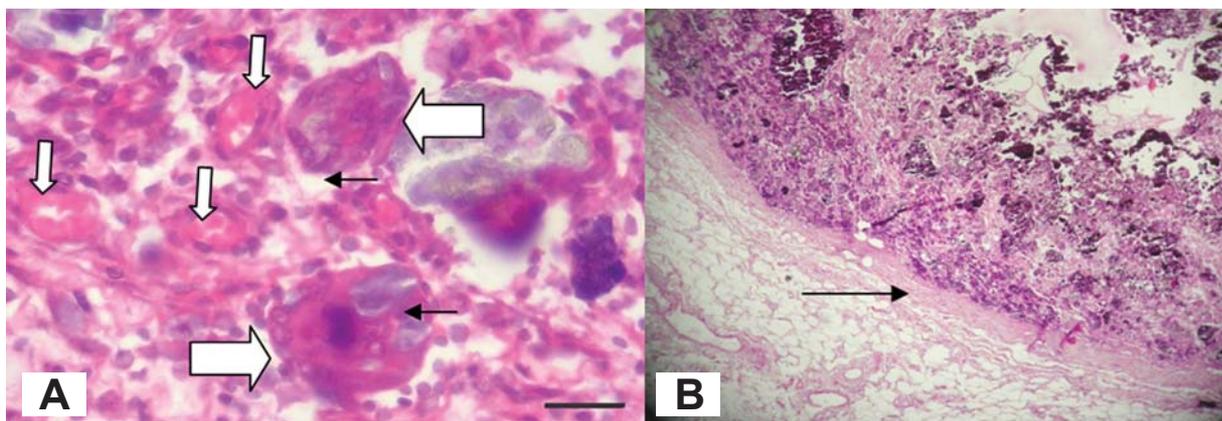


Figura 2. Análise histológica do grupo contendo hidroxiapatita. **A-** 15 dias após cirurgia: vasocongestão (setas finas brancas), células gigantes tipo corpo estranho (setas largas brancas) contendo partícula do biomaterial em seu citoplasma (setas finas pretas). Barra = 22 μ m, 400X. **B-** 45 dias após a cirurgia. Pseudocapsula (seta). 100X.

de um tecido conjuntivo frouxo com vascularização ainda maior que aos 15 dias. Day *et al.* (2004) estudaram o comportamento desse biomaterial *in vitro* e *in vivo* no tecido subcutâneo de ratos e concluíram que ele estimula neovascularização. Piatelli *et al.* (2000) utilizando-o na tibia de coelhos, e Schepers *et al.* (1998) e Tsiomis (2004), empregando-o em mandíbula de cães, observaram vascularização abundante e sugeriram que essa propriedade auxilia no fornecimento das células osteoprogenitoras necessárias para a osteointegração do implante, relacionando esse fato aos bons resultados obtidos com esse biomaterial. No presente experimento, notou-se predomínio de macrófagos mononucleados, presença de fibroblastos e pequeno número de outras células como neutrófilos e linfócitos. Notaram-se, então, características de tecido de granulação, e somente nesta data observou-se uma tendência ao encapsulamento do material, sendo a espessura dessa cápsula visualmente menor do que a constatada envolvendo a hidroxiapatita, assim como o pequeno número de células gigantes multinucleadas observadas.

Aos 45 dias, nas lâminas contendo HAP-91, não foram observadas reações inflamatórias nem sinal de degradação do material. Notou-se tendência ao encapsulamento da HAP-91 ainda mais evidente (Fig. 2B) e presença de tecido conjuntivo fibroso adjacente a ela, uma reação proliferativa e não exsudativa como nas primeiras lâminas. De acordo com MacNeill *et al.* (1999), é comum a formação de tecido fibroso ao redor das partículas de hidroxiapatita até mesmo quando implantada em tecido ósseo, o que foi confirmado pelos achados de Gao *et al.* (1995), Borges *et al.* (2000), Fehlberg (2001), Duarte (2003) e Vital *et al.* (2006). Macrófagos e células gigantes

multinucleadas ainda estavam presentes em grande número. No grupo em que se utilizou biovidro, houve formação de um tecido conjuntivo denso com redução no número de macrófagos. Ainda foi observada uma pseudocápsula, porém muito menos espessa. A população celular constituía-se basicamente de fibroblastos e macrófagos, onde foi observado pequeno número de células inflamatórias, sendo a vascularização normal.

Em relação ao biovidro, precisa-se ressaltar que até aos 30 dias havia infiltrado predominantemente macrófago discreto, não suficiente para caracterizar reação tipo corpo estranho, e depois, aos 45 dias, predominava um infiltrado fibroso. A pseudocápsula só foi observada aos 30 e 45 dias. Células inflamatórias e gigantes multinucleadas existiam em número muito pequeno em relação à hidroxiapatita. Karatzas *et al.* (1999) e Tsiomis (2004) não encontraram células tipo corpo estranho ou qualquer sinal de inflamação associado ao biovidro. Ao contrário, Vogel *et al.* (2001) observaram tecido de granulação em alguns locais circundando aquele biomaterial quando implantado em fêmur de coelhos e observaram presença de células gigantes, a partir dos 28 dias, circundando esse material, e a formação de uma cápsula altamente celular apenas em alguns pontos da região ventral da amostra aos 84 dias após cirurgia. MacNeill *et al.* (1999) verificaram algumas células gigantes do tipo corpo estranho quando utilizado na tibia de coelhos.

É necessário destacar que nas lâminas da HAP-91 existiu reação exsudativa importante que não ocorreu no biovidro e houve infiltrado celular muito mais intenso. Foi observada reação inflamatória inicial e depois granulomatosa, com presença de células gigantes tipo corpo estranho. Com base nesses resultados, pode-se

sugerir que o último é mais biocompatível no tecido subcutâneo de cães do que a primeira, já que aquele incitou resposta muito mais branda.

Abiraman *et al.* (2002) também observaram tendência ao encapsulamento da hidroxiapatita porosa, assim como neste experimento, quando a implantou em músculo de ratos. Porém, Piecuch (1982), ao implantar tal cerâmica proveniente de coral no subcutâneo de cães, verificou tecido conjuntivo circundando as partículas, mas não constatou presença de células gigantes nem de reação inflamatória. Células gigantes multinucleadas e tecido conjuntivo fibroso também foram observados circundando esse biomaterial implantado em subcutâneo de cães por Yamasaki & Sakai (1992) e no músculo de macacos por ElDeeb *et al.* (1989); entretanto, seu significado não foi definido. De acordo com Kim (2003), um material sintético é geralmente isolado do tecido circundante pela formação de uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso. Gao *et al.* (1995) observaram a presença de células gigantes do tipo corpo estranho em defeitos ósseos em ovelhas e sugeriram que participassem de sua biodegradação. Contudo, tanto a HAP-91 quanto o biovidro foram verificados até a última data, 45 dias, não se notando assim sua degradação. Estudos mostram que o tempo de degradação do biovidro é mais longo que os 45 dias de observação deste experimento (DeForge, 1997; Karatzas *et al.*, 1999). Além disso, Borges *et al.* (2000) verificaram a formação de tecido fibrovascular rodeando o implante de hidroxiapatita implantado em tibia de cães e pequena quantidade de células gigantes tipo corpo estranho contendo o material em seu citoplasma. Contudo, além de obterem bons resultados na consolidação dos defeitos ósseos, observaram atividade osteoclástica sobre as partículas, uma tendência de diminuição da quantidade e densidade e notaram que partículas que acidentalmente haviam sido depositadas no tecido conjuntivo apresentavam maior densidade. Estes autores concluíram que a biodegradação desse material ocorre por ação osteoclástica, discordando de Gao *et al.* (1995). Os achados de Duarte (2003) corroboram com essa conclusão, ao passo que ele não mais observou a cerâmica na falha óssea na mandíbula de cães aos 60 dias e em nenhum momento verificou células gigantes multinucleadas.

Em todas as lâminas notou-se ambos os biomateriais calcificados, mas em nenhuma delas foi observada formação ectópica de tecido ósseo, osteoblastos ou osteoclastos, o que condiz com os achados de ElDeeb *et al.* (1989) e Piecuch (1982). Contudo, os estudos sobre osteoindução são muito controversos tanto pelos resul-

tados quanto pela metodologia. Nihouanenn *et al.* (2005), utilizando fosfato de cálcio bifásico (associação de hidroxiapatita e fosfato beta-tricálcico), encontraram formação ectópica de osso em músculo de ovelha após seis meses de implantação. Deve-se analisar esse resultado com cautela: não se pode afirmar se houve formação óssea, porque foi implantado em tecido esquelético ou devido ao longo tempo de permanência no local, causando formação óssea semelhante à ossificação distrófica. Heughebaert *et al.* (1988) encontraram formação ectópica de um material semelhante a osso após 12 meses, quando implantaram hidroxiapatita porosa em tecido mole de cobaia; entretanto, observaram que o tecido formado não possuía características histológicas e morfológicas de osso verdadeiro. Yuan *et al.* (1999) utilizaram dois tipos da última em músculo de cães por três e seis meses e encontraram formação óssea na forma que apresentava macro poros com paredes ásperas e não houve formação de osso no tipo em que as paredes dos macroporos eram lisas. Novamente, foi implantado em músculo, mas é interessante a afirmação de que a microestrutura é fator importante quando se fala de osteoindução. O mesmo foi sugerido por Habibovic *et al.* (2005) quando implantaram hidroxiapatita e fosfato de cálcio bifásico em músculo de cabra por 6 e 12 semanas e encontraram diversos graus de formação óssea. Yamasaki & Sakai (1992) utilizaram hidroxiapatita densa e porosa no subcutâneo de cães e constataram formação óssea em seis dos 10 animais que receberam o tipo poroso após três meses e em todos esses animais após seis meses. No tipo denso não observaram formação óssea. Eles sugeriram que fatores físicos, incluindo estrutura tridimensional, e químicos seriam importantes na formação ectópica de tecido ósseo, o mesmo foi sugerido por ElDeeb *et al.* (1989). Piecuch (1982) refere-se à porosidade da estrutura das biocerâmicas como fator importante e até mesmo determinante para o tipo de tecido que crescerá sobre ela.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados clínico-cirúrgicos e histológicos, foi possível chegar às seguintes conclusões:

O biovidro e a hidroxiapatita incitam respostas toleráveis no organismo, sendo o primeiro um material mais biocompatível do que o segundo no tecido subcutâneo de cães.

O biovidro estimulou neovascularização.

Ambos os biomateriais não foram osteoindutores no período de 45 dias.

REFERÊNCIAS

- Abiraman S, Varma HK, Umashankar PR & John A (2002) Fibrin glue as an osteoinductive protein in a mouse model. *Biomaterials* 23:3023-3031.
- Beresford JN, Graves SE & Smoothy CA (1993) Formation of mineralized nodules by bone derived cells in vitro: a model of bone formation? *American Journal of Medical Genetics*, 45:163-178.
- Borges APB, Rezende CMF, Ribeiro MFB, Melo EG & Nóbrega Neto PI (2000) Hidroxiapatita sintética como substituto ósseo em defeito experimental provocado no proximal da tibia de cão: aspectos à microscopia de transmissão. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 52:616-620.
- Bosetti M & Cannas M (2005) The effect of bioactive glasses on bone marrow stromal cells differentiation. *Biomaterials* 26:3873-3879.
- Calhoun ML & Stinson ALW (1982) Tegumento. In: Dellman HD & Brown EM (Eds.) *Histologia Veterinária*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. p. 360-388.
- Cehreli MC, Sahin S, Kesenci K, Tuzlakoglu K, Pinsky E, Ozturk S, Ruacan S, Caner B & Bozkurt MF (2003) Biological reactions to a poly(L-lactide)-hidroxiapatite composite: A study in canine mandible. *Journal of Biomaterials Applications*, 17:265-276.
- Day RM, Boccaccini AR, Shurey S, Roethen JA, Forbes A, Hench LL & Gabe SM (2004) Assessment of polyglycolic acid mesh and bioactive glass for soft-tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*, 25:5857-5866.
- DeForge DH (1997) Evaluation of Bioglass®/Perioglas™ (Consil™) synthetic bone graft particulate in the dog and cat. *Journal of Veterinary Dentistry*, 14:141-145.
- Dellmann HD & Brown EM (1982) Tecidos Conjuntivos e de Sustentação. In: Dellmann, HD & Brown, EM (Eds.) *Histologia Veterinária*, Guanabara Koogan. p. 36-64.
- Duarte TS (2003) Osteointegração da hidroxiapatita sintética no processo alveolar da mandíbula de cães. Tese de mestrado. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 50p.
- Eid K, Zelicof S, Perona BP, Sledge CB & Glowacki J (2001) Tissue reactions to particles of bone-substitute materials in intraosseous and heterotopic sites in rats: discrimination of osteoinduction, osteocompatibility, and inflammation. *Journal of Orthopaedic Research*, 19:962-969.
- ElBatal HA, Azooz MA, Khali EMA, Monem AS & Hamdy YM (2003) Characterization of some bioglass-ceramics. *Materials Chemistry and Physics*, 80:599-609.
- ElDeeb M, Mahamoud H & Mohamed S (1989) Osteogenesis in composite grafts of allogenic demineralized bone powder and porous hydroxyapatite. *Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* 47:50-56.
- Fehlberg AF (2001) Hidroxiapatita sintética na regeneração de falha óssea provocada em fratura completa de terço intermédio de tibia imobilizada pela fixação percutânea em cães. Tese de mestrado. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 42p.
- Franco KL, Borges APB, Vilória MIV, Fernandes ES & Fehlberg AF (2001) Hidroxiapatita sintética pura, hidroxiapatita sintética associada ao colágeno e hidroxiapatita sintética associada ao lipossoma como substitutos ósseos em defeitos provocados na tibia de cães: aspectos da osteointegração à microscopia de luz transmitida. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 53:431-436.
- Fujishiro Y, Hench LL & Oonishi H (1997) Quantitative rates of in vivo bone generation for Bioglass, and hydroxyapatite particles as bone graft substitute. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 8:649-652.
- Gao TJ, Lindholm B, Kommonen P, Ragni P, Paronzini A & Lindholm TC (2005) Microscopic evaluation of bone implant contact between hydroxyapatite, bioactive glass and tricalcium phosphate implanted in sheep diaphyseal defects. *Biomaterials*, 16:1175-1179.
- Greer RT & Pearson PT (1998) Biomateriais. In: Slatter D (Ed) *Manual de cirurgia de pequenos animais*. São Paulo, Editora Manole. p.133-142.
- Habibovic P, Yuan H, Valk CMVD, Meier G, Blitterswijk CAV & Groot KD (2005) 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials*, 26:3565-3575.
- Hattar S, Asselin A, Greespan D, Oboeuf M, Berdal A & Sautier JM (2005) Potential of biomimetic surfaces to promote in vitro osteoblast-like cell differentiation. *Biomaterials* 26:839-848.
- Hench LL & Wilson J (1984) Surface-active biomaterials. *Science* 226:630-640.
- Heughebaert M, Le Geros RZ, Gineste M, Guilhem A & Bonel G (1988) Physicochemical characterization of deposits associates with HA ceramics implanted in nonosseous sites. *Journal of Biomedical Materials Research*, 22:257-268.
- Ilan DI & Ladd AL (2003) Bone graft substitutes. *Operative Techniques in Plastic and Reconstructive Surgery*, 9:151-160.
- Karatzas S, Athanasios Z, Greespan D & Amar S (1999) Histologic observations of periodontal wound healing after treatment with Perioglas in nonhuman primates. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, 19:489-499.
- Kim HM (2003) Ceramic bioactivity and related biomimetic strategy. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 7:289-299.
- Lossdörfer S, Schwartz Z, Lohmann CH, Greespan DC, Ranly DM & Boyan BD (2004) Osteoblast response to bioactive glasses in vitro correlates with inorganic phosphate content. *Biomaterials*, 25:2457-2555.
- Macneill SR, Cobb CM & Rapley JW (1999) In vivo comparison of synthetic osseous graft materials. A preliminary study. *Journal of Clinical Periodontology*, 26:239-245.
- Nihouannen DL, Daculsi G, Saffarzadeh A, Gauthier O, Deolplace S, Pilet P & Layrolle T (2005) Ectopic bone formation by microporous calcium phosphate ceramic particles in sheep muscles. *Bone*, 36:1086-1093.

- Oliva A, Salerno A, Locardi B, Riccio V, Raginone FD, Lardino P & Zappia V (1998) Behavior of human osteoblasts cultured on bioactive glass coatings. *Biomaterials*, 19:1019-1025.
- Ono I, Tateshita T & Nakajima T (2000) Evaluation of a high density polyethylene fixing system for hydroxyapatite ceramic implants. *Biomaterials*, 21:143-151.
- Oonishi H, Hench LL, Wilson J, Sugihara F, Kushitani S & Iwaki H (1999) Comparative bone ingrowth behavior in granules of bioceramic material of various sizes. *Journal of Biomedical Materials Research*, 44:31-43.
- Piatelli A, Scarano A, Piatelli M, Coraggio F & Matarasso S (2000) Bone regeneration using bioglass: an experimental study in rabbit tibia. *Journal of Oral Implantology*, 26:257-261.
- Piecuch JF (1982) Extraskelatal Implantation of a Porous Hydroxyapatite Ceramic. *Journal of Dentistry Research*, 61:1458-1460.
- Schepers E, Barbier L & Ducheyne P (1998) Implant placement enhanced by bioactiveglass particles of narrow size range. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 13:655-665.
- Shapoff CA, Alexander DC & Clark AE (1997) Clinical use of a bioactive glass particulate in the treatment of human osseous defects. *Compendium*, 18:352-363.
- Silver IA, Deas J & Ereciska M (2001) Interactions of bioactive glasses with osteoblasts in vitro: effects of 45S5 Bioglass, and 58S and 77S bioactive glasses on metabolism, intracellular ion concentrations and cell viability. *Biomaterials*, 22:175-185.
- Stevenson S (1998) Enxertos ósseos. In: Slatter D (Ed). *Manual de cirurgia de pequenos animais*. São Paulo, Editora Manole. p.2006-2017.
- Tsiomis AC (2004) Biovidro particulado no processo alveolar da mandíbula de cães. *Avaliações clínico-cirúrgica, radiográfica e histológica*. Tese de mestrado. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 40p.
- Vital CC, Borges APB, Fonseca CC, Tsiomis AC, Duarte TS, Fontes EB, Sena MPT & Fofano G (2006) Biocompatibilidade e comportamento de compósitos de hidroxiapatita em falha óssea na ulna de coelhos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 58:135-144.
- Vogel M, Voigt C, Batten JJ & Müller-Mai CM (2001) In vivo comparison of bioactive glass particles in rabbits. *Biomaterials*, 55:357-362.
- Xynos ID, Hukkanen MVJ, Batten JJ, Buttery LD, Hench LL & Polak JM (2001) Bioglass®45S5 stimulates osteoblast turnover and enhances bone formation *in vitro*: implications and applications for bone tissue engineering. *Calcified Tissue International*, 55:151-157.
- Yamasaki H & Sakai H (1992) Osteogenic response to porous hydroxyapatite ceramics under the skin of dogs. *Biomaterials*, 13:308-312.
- Yuan H, Kurashima K, Bruijn JD, Yubao L, Groot KD & Zhang X (1999) A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials*, 20:1799-1806.
- Zaffe D (2005) Review- Some considerations on biomaterials and bone. *Micron*, 36:583-592.