

## AVALIAÇÃO DE HIDROXIAPATITA NANOMÉTRICA CARBONATADA EM REPARO ALVEOLAR

*Evaluation of carbonated nanometric hydroxiapatite in alveolar repair*

Érica Polyana dos PASSOS<sup>1</sup> | Carla Fabiana TENANI<sup>2</sup> | Maria Helena Ribeiro DE CHECCHI<sup>3</sup> | Alessandra ESTEVES<sup>4</sup> | Wagner Costa ROSSI JÚNIOR<sup>5</sup>

### RESUMO

Esta pesquisa foi realizada no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Alfnas (UNIFAL – MG), tendo como objetivo avaliar o potencial osteogênico da hidroxiapatita nanométrica carbonatada após extração de 1º molar superior direito de 10 ratos machos raça Wistar. Os animais foram divididos em dois grupos, um tratado e um controle, nos quais foi realizada a exodontia do primeiro molar superior direito. Os alvéolos foram preenchidos ou não com hidroxiapatita, conforme os grupos. Após 40 dias, os animais sofreram eutanásia para coleta do material, o qual foi radiografado e preparado para avaliação histológica. Os resultados permitiram observar semelhantes aspectos macroscópicos e radiográficos, em ambos os grupos, porém com algumas diferenças sob o ponto de vista histológico, o que leva a sugerir que a Hidroxiapatita Nanométrica Carbonatada apresentou resultados positivos quando comparada ao grupo controle.

**Palavras-chaves:** Odontologia. Hidroxiapatita. Cirurgia Bucal. Rato.

### ABSTRACT

This research was conducted at the Biomedical Sciences Institute, Federal University of Alfnas (UNIFAL - MG) and evaluated the carbonated nanometric hydroxyapatite osteogenic potential posteriorly exodontie of first upper right molar in ten Wistar male rats. The animals were divided into two groups, treated and control group, which was realized the extraction of first upper right molar. The alveoli was filled or not with hydroxyapatite. The animals were euthanized after 40 days, to collect of material, which was x-rayed and prepared for histological evaluation. The results showed similar macroscopic and radiographic aspects, in both groups, but with some differences in histological analysis, which allow suggest that carbonated nanometric hydroxyapatite showed positive results compared to control group.

**Keyword:** Dentistry. Durapatite. Surgery. Oral; Rats.

<sup>1</sup> Cirurgiã-Dentista, Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alfnas UNIFAL-MG. Brasileira. E-mail: erica\_polyana@hotmail.com;

<sup>2</sup> Cirurgiã Dentista, Doutoranda em Odontologia em Saúde Coletiva da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-FOP/UNICAMP. Brasileira. E-mail: carlatenani@hotmail.com;

<sup>3</sup> Profª Doutora do Instituto de Ciências e Saúde da Universidade Federal do Amazonas ISB/UFAM. Brasileira. E-mail: mariahelenard@hotmail.com;

<sup>4</sup> Profª. Doutora do Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Alfnas UNIFAL-MG. Brasileira. E-mail: alessandra.esteves@unifal-mg.edu.br;

<sup>5</sup> Prof. Doutor do Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Alfnas UNIFAL-MG. Brasileiro. E-mail: wagner.rossi@unifal-mg.edu.br

## INTRODUÇÃO

A cicatrização de uma fratura óssea é um dos mais interessantes processos de reparo que ocorre na natureza, não havendo simplesmente a formação de uma cicatriz, mas a reconstituição total dos tecidos injuriados, que podem retomar sua forma original. É conclusivo dizer que todos os mecanismos envolvidos neste processo não estejam elucidados, pois se acredita que envolvam problemas de homeostasia celular que sofrem a influência de vários fatores.

O reparo alveolar após exodontia tem início com o preenchimento do alvéolo pelo coágulo e obliteração das extremidades dos vasos sanguíneos rompidos nas primeiras horas que sucedem a cirurgia. Restos celulares e alimentares estão aderidos à superfície do coágulo. Passados 30 dias, o alvéolo está totalmente reparado, mas continua a ocorrer o processo de calcificação e reabsorção remodeladora do osso presente. Os remanescentes do ligamento periodontal são de importantes para o início da proliferação do tecido de granulação e para o reparo alveolar (DEVLIN et al., 1996; GUGLIELMOTTI, CABRINI, 1985; HSIEH et al., 1994; SMITH, 1974).

Green et al. (1969), realizaram estudo do processo de reparo alveolar após extração dos terceiros molares superiores esquerdos em ratos utilizando o radioisótopo estrôncio-85 em períodos de 0 a 42 dias e concluíram que o período de maior formação óssea ocorreu entre o 10° e o 14° dia após extração. As primeiras evidências histológicas de neoformação óssea ocorreram na área óssea perialveolar entre o 3° e o 7° dia após a extração. No alvéolo, o período de maior atividade radioativa foi entre o 10° e o 14° dia. A incorporação de radioisótopos continuou até o 35° e 42° dias após a extração, indicando que a maturação óssea continua mesmo após ter ocorrido a reparação histológica, que se completa por volta do 21° dia.

Nas últimas décadas, a partir dos avanços da bioengenharia óssea tecidual, diferentes materiais têm sido sugeridos como substitutos ósseos, no sentido de funcionarem como arcabouço de matriz extracelular e permitirem neoformação óssea. Diversas propriedades são necessárias a estes substitutos, tais como: 7 bioatividade, osteocondução, osteoindução, biocompatibilidade e biodegradação. Adicionalmente, devem ter custos acessíveis, e que sejam facilmente produzidos e moldados (BURG et al., 2000; FERNANDES, 2011; LE GEROS et al., 1995; PILLIAR et al., 2001).

Diversos biomateriais estão sendo testados por apresentar habilidade de regeneração óssea tais como a hidroxiapatita de cálcio e o fosfato tricálcico (SCHUKNECHT, 1974). Todos esses substituintes porosos sintéticos compartilham vantagens em relação aos, auto e aloenxertos, incluindo sua fácil esterilização e armazenamento além de sua ilimitada disponibilidade. Já as suas desvantagens incluem delicado manuseio, graus variáveis de reabsorção, pobre desempenho em defeitos diafisários, além de potenciais efeitos adversos no remodelamento ósseo (DERLACKI, CLEMIS, 1965).

Em relação aos enxertos ósseos autógenos, as desvantagens incluem quantidade limitada, reabsorção indevida e alta morbidade no sítio doado, por isso há evidências de um constante impeto à pesquisa de enxertos ósseos (LEVENSON et al., 1988).

Osório (2013), realizou um estudo que, propôs-se avaliar as características do reparo de alvéolos com perda da parede vestibular e testar a influência do tratamento imediato com enxerto de material aloplástico. Observou-se que, a perda de parede interferiu negativamente no volume alveolar final. A colocação imediata do enxerto aloplástico foi capaz de reduzir a contração alveolar para locais com paredes alveolares preservadas e perdidas, podendo ser uma opção para tratamento de perdas ósseas durante o processo de exodontia. O perióstio apresentou limitação na contenção das partículas de enxerto no interior do alvéolo quando da ausência de parede óssea.

Carvalho et al. (1997), testaram a biocompatibilidade do polímero da mamona (*Ricinus communis*) implantado no interior do alvéolo dental de ratos. Os resultados sugeriram que o material testado é biocompatível, sendo progressivamente osseointegrado no decorrer do reparo da ferida de extração dental.

O trabalho de Queiroz (2002), teve como objetivo de avaliar o efeito da implantação de um pool de proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) usando o colágeno tipo 1 como carreador, ambos de origem bovina, no reparo do alvéolo dentário de incisivos de ratos. Este evidenciou que o material implantado nos 7 alvéolos mostrou atividade osteoindutora acelerando o processo de reparo no alvéolo dentários de ratos.

Hidroxiapatita de cálcio sintética,  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ , (HCS), consiste em um material inorgânico comumente usados em falhas ósseas e constituinte da fase mineral dos tecidos calcificados. O seu equivalente sintético possui propriedades de biocompatibilidade e de osteocondução que o coloca entre os mais importantes substitutos ósseos da atualidade. Pode ser utilizada em defeitos ósseos sem carga ou em falhas nas quais cargas, estresses torcionais ou cisalhamentos são neutralizados por implantes rígidos, como placas e parafusos (HAMERSCHMIDT, 2010).

A busca por um enxerto ósseo ideal com fonte inesgotável, de fácil aplicação e que ofereça uma qualidade óssea satisfatória, como também com capacidade de acelerar a neoformação óssea no local enxertado, é o que se almeja quando existe perda óssea, especialmente em se tratando de reparo alveolar onde há grande risco de invaginação de tecidos moles, com perda de integridade e resistência do alvéolo. Assim, como estão sendo realizados estudos utilizando-se uma forma de hidroxiapatita carbonatada nanométrica em fraturas ósseas com defeitos críticos, no qual foram obtidos excelentes resultados, este trabalho se justifica para que possam ser feitas comparações com as demais formas comercialmente obtidas bem como com os demais componentes osteogênicos utilizados atualmente em odontologia.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o reparo ósseo em alvéolos dentais preenchidos com uma forma de hidroxiapatita nanométrica carbonatada produzida na Universidade federal de Alfenas.

## **DESENVOLVIMENTO**

### **METODOLOGIA - DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO E MANUSEIO DOS ANIMAIS**

Foram utilizados 10 ratos (*Ratus norvegicus albinus*, Wistar) machos, com 2 a 3 meses de idade e cerca de 200 a 300 gramas de peso. Foram constituídos 2 grupos com 5 ratos sendo um grupo controle e outro com aplicação da hidroxiapatita nanométrica carbonatada.

Cada rato recebeu medicação pré-anestésica (cloridrato de xylazina 2%, Virbac®, 5mg/kg, intraperitoneal). Após verificados os sinais de sedação, o animal foi anestesiado com cloridrato de ketamina 10% (Agener ®' 10mg/kg, intramuscular) e posicionado conforme aparato especialmente confeccionado (figura 1).

Figura 1: Aparato utilizado para estabilização do rato durante exodontia do molar



Fonte: (PASSOS, 2015).

Tão logo os sinais de anestesia foram observados, gaze umedecida foi colocada sobre os olhos dos animais a fim de evitar o ressecamento e opacificação das córneas. A gengiva ao redor do primeiro molar superior direito foi descolada com hollemback 3ss e o dente seccionado no sentido vestibulolingual com auxílio de broca Carbide esférica 1/4 em turbina de alta rotação. Irrigação constante com soro fisiológico estéril foi mantida com o objetivo de manter a loja cirúrgica limpa e evitar superaquecimento dos tecidos. A avulsão das raízes foi realizada com o auxílio de micro cinzel cirúrgico e pinça Kelly curva adaptada como fórceps, seguida por aplicação de etil cianoacrilato para evitar que o material se espalhasse na boca. Durante o procedimento cirúrgico foram tomados cuidados para remoção do excesso de sangue e debris da cavidade bucal do rato.

Os animais foram mantidos em observação em gaiolas individuais após a cirurgia e receberam água e ração ad libitum até a recuperação total da anestesia. Os animais receberam ração moída durante a primeira semana do pós-cirúrgico para reduzir o trauma pós-operatório. Todas as medidas possíveis foram tomadas para evitar sofrimento desnecessário dos animais, bem como para reduzir as perdas durante o trans e pós-operatório e, conseqüentemente, o número de animais utilizados durante o experimento. Sinais de dor, como prostração e falta de apetite, foram notados levemente nos dois primeiros dias após a cirurgia, mas não houve administração de nenhuma medicação para tal.

Ambos os grupos foram sofrerem eutanásia com sobredose de anestésico, 40 dias após a extração dental.

#### **PROCESSAMENTO DO MATERIAL**

Após o sacrifício, as hemi-maxilas direitas foram removidas, dissecada, fixada em formol tamponado a 10% por 24 horas em embalagens individuais identificadas (Figura 2).

Figura 2: Exemplo de hemi-maxila dissecada .



Fonte: (PASSOS, 2015)

Após serem radiografadas em aparelho Marca Dabi-Atlante modelo Spectro 70X, com tempo de exposição de 0,3" a uma distância de foco de 18 centímetros estas foram reveladas automaticamente pelo Processadora automática marca Air Techniques, modelo AT2000XR, e posteriormente, as radiografias foram avaliadas em lupa.

A hemi-maxila direita foi descalcificada em solução de ácido fórmico e citrato de sódio a 20%, por 3 semanas. A secção prévia da hemi-maxila foi realizada com lâmina descartável de micrótomo, a 2,0mm da face mesial do I molar e a inclusão foi realizada em posição para corte vestibulo-linguais (transversais). Foram realizados cortes seriados de 7 µm e os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para posterior análise.

## **REVISÃO DE LITERATURA**

### **ASPECTOS HISTOLÓGICOS E FISIOLÓGICOS DO TECIDO ÓSSEO E DO REPARO ALVEOLAR**

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado em constante processo de reabsorção e neoformação (GARG, 2004). Como o osso é uma mistura de fibras tenazes (fibrilas de colágeno do tipo I) e partículas sólidas (cristais de fosfato de cálcio), ele apresenta boa resistência tanto a cargas compressivas quanto a cargas trativas, podendo assumir diferentes morfologias e funções, de acordo com sua localização no esqueleto humano (SILVA, 2008).

O osso representa o maior reservatório de cálcio do corpo humano. Conseqüentemente, além das funções de sustentação e proteção de órgãos vitais, ele desempenha um terceiro papel, no metabolismo, realizando a troca de minerais com o sangue. A quarta função do osso é filtrar os íons gerados no sangue que podem substituir íons de cálcio ou ser incorporados à rede dos cristais de apatita, ou ainda serem aderidos à matriz orgânica (SOMCHAI, 1992).

A matriz óssea é composta por um arranjo complexo de fibras colágenas impregnadas com sais minerais, em sua grande maioria, nanopartículas de fosfato de cálcio (85% pp), carbonato de cálcio (10% pp) e pequena quantidade de fluoreto de cálcio e magnésio fluoretado (5% pp) (DALEN, OLSSON, 1974). Macroscopicamente, o tecido ósseo pode ser dividido em dois tipos, baseado na densidade e quantidade de porosidade (GARG, 2004).

O osso cortical corresponde a 85% do osso do corpo humano e é constituído por uma estrutura densa e compacta, caracterizada por pouca atividade metabólica e pequena presença de células. O osso medular corresponde aos 15% restantes, tem função de receber cargas e responder a necessidades fisiológicas (MUNDY, 1999).

A microestrutura do osso é composta de osso primário ou entrelaçado, osso secundário ou lamelar e células ósseas. Do ponto de vista histológico, o tecido ósseo pode ser classificado em primário ou imaturo, secundário ou lamelar. Ambos possuem as mesmas células e os mesmos constituintes da matriz extracelular. No tecido ósseo primário, as fibras colágenas se dispõem irregularmente, sem orientação definida, em menor conteúdo mineral e maior quantidade de osteócitos incluídos. No tecido ósseo secundário, as fibras colágenas organizam-se em lamelas que adquirem uma porção paralela umas às outras ou se dispõem em camadas concêntricas em torno dos canais e vasos, formando os sistemas de Havers (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004, 2005).

Há três tipos de células ósseas distintas das células medulares que pertencem ao sistema hematopoiético. Elas são (HANCOX, 1972; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004; MUNDY, 1999; TEN CATE, 2001).

### **PROCESSO DE REPARO ALVEOLAR**

O processo de reparo alveolar tem sido alvo de muitos estudos (AMLER, 1969; CARVALHO,

OKAMOTO, 1987; EVIAN, 1982; HUEBSCH, 1969; JOHANSEN, 1970; MARZOLA, 1994; OKAMOTO, RUSSO, 1973; PIETROKOVSKI, 1971;).

Segundo Carvalho e Okamoto (1987) e Marzola (1994), o processo de reparo em feridas de extração dental é o conjunto de reações teciduais que se desencadeiam no interior do alvéolo após a exodontia.

Okamoto e Russo (1973) avaliaram o processo de cicatrização alveolar após extração dental em ratos e observaram que 24 horas após a exodontia, o alvéolo apresentava-se preenchido por coágulo sanguíneo. Próximo às paredes do fundo do alvéolo existia proliferação de fibroblastos com núcleos grandes, pouca cromatina condensada e citoplasma visível. Também eram observadas algumas fibras de colágeno irregularmente dispostas. No 4º dia pós-operatório, um tecido de granulação caracterizado por numerosos fibroblastos, proliferação de capilares e linfócitos foram visualizados. Próximo à borda do alvéolo, ocorre a presença de alguns neutrófilos. No fundo do alvéolo, numerosas fibras estavam presentes e, também, a formação de trabeculado ósseo no terço apical do alvéolo. No 7º dia pós-operatório foram observados numerosos osteoblastos e poucos neutrófilos, além de colágenos densos e numerosos. Já no 10º dia, o tecido ósseo neoformado chegava a aproximadamente metade do alvéolo e o trabeculado não estava bem organizado. O aspecto morfológico do alvéolo após o 13º e o 16º dias após a extração dental é semelhante ao encontrado no 10º dia. Entretanto, o trabeculado estava bem organizado e em alguns espécimes, o osso neoformado chegava a 2/3 do alvéolo. No 21º dia pós-operatório, os alvéolos estavam completamente preenchidos por tecido ósseo. Com esses resultados, os autores concluíram que o processo de cicatrização alveolar após a extração dental compreende algumas fases distintas: primeiramente ocorre a formação do coágulo e proliferação das células do tecido conjuntivo. Em seguida, ocorre a formação de tecido conjuntivo de reparação e, por último, o período de ossificação, onde ocorre a neoformação e a maturação óssea.

Marzola (1994) baseado em estudo de Amler (1969), descreveu a sequência dos fenômenos reparacionais do processo, ou seja, a cronologia do reparo alveolar em humanos. No dia da exodontia ocorre a formação do coágulo sanguíneo. Aos 4 dias observa-se evidência de proliferação tecidual ao nível gengival. No 7º dia ocorre a substituição do coágulo por tecido de granulação, o qual será substituído também por tecido conjuntivo aos 20 dias. Entre o 24º e 35º dias encontramos a fusão epitelial até o espessamento da fibromucosa. O preenchimento de 2/3 do alvéolo por trabeculado ósseo (osso imaturo) é observado no 40º dia, enquanto que o preenchimento total do alvéolo por trabeculado ósseo ocorre com 64 dias.

Todo esse processo pode ser explicado da seguinte maneira: logo após a exodontia, o fluxo sanguíneo proveniente do feixe vascular do ápice dental e de vasos do ligamento periodontal formarão o coágulo sanguíneo que será invadido por fibroblastos, formando assim um tecido conjuntivo rico em vasos e células. Em seguida, o tecido conjuntivo apresenta evidências de maturação com a diminuição do número de células e dos vasos sanguíneos, mas com aumento da quantidade de fibras colágenas (AMLER, 1969; CARVALHO, OKAMOTO, 1978, 1987; JOHANSEN, 1970). A neoformação óssea se dá a partir do fundus alveolar e das paredes alveolares com formação da matriz orgânica pelos osteoblastos e pela calcificação dessa matriz, constituindo assim as trabéculas ósseas. A crista óssea sofrerá um processo de reabsorção e remodelação. Por volta do 40º dia, cerca de 2/3 do alvéolo já estão preenchidos por trabeculado ósseo, porém, o processo de reparo completa-se aos 64 dias pós extração dental. Nesse estágio o alvéolo está completamente preenchido por tecido ósseo neoformado e a crista alveolar está remodelada (AMLER, 1969; CARVALHO, OKAMOTO, 1987; MARZOLA, 1994).

Marzola (1994), relata que a permanência do coágulo sanguíneo no interior do alvéolo após a extração é de fundamental importância para a evolução normal do processo de reparo alveolar. Cita ainda que o tecido conjuntivo intra-trabecular das paredes alveolares, assim como remanescentes da membrana periodontal, desempenham papel importantíssimo na formação do tecido de granulação, durante o processo de reparo alveolar pós-extração. E, por fim, que a neoformação óssea intra-alveolar depende da produção de substância fundamental amorfa, fibras colágenas e matriz orgânica osteóide mineralizada.

A cronologia do processo de reparo em feridas de extração dental também foi estudada utilizando-se de dois tipos de obtenção de cortes histológicos (FIALHO, 1986). Para tanto foram empregados 84 ratos divididos em dois grupos de 42. No primeiro, os cortes dos alvéolos foram realizados no sentido transversal, e no segundo, no sentido longitudinal. Os animais foram sacrificados após 3, 6, 9, 15, 21, 24 e 28 dias do ato operatório. As peças obtidas foram submetidas ao processamento laboratorial de rotina e os cortes corados pela hematoxilina e eosina para estudo histológico. Os resultados obtidos mostraram que através dos cortes transversais pode ser detectada intensa reabsorção da parede óssea lateral junto ao terço cervical. Além disso, nos cortes transversais com 21 dias após a exodontia, observam-se inúmeras áreas sem ossificação. Concluíram ainda que o processo de reparo alveolar em ratos se faz no 28º dia pós-operatório.

Acreditamos que, os trabalhos acima citados relatam com muita propriedade os eventos biológicos relativos ao processo de reparo alveolar no rato e no homem.

## **HIDROXIAPATITA**

A reparação óssea tem sido alvo de muitos estudos, uma vez que pode determinar sucesso ou fracasso em situações como traumas, patologias e anomalias. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, há mais de 150 doenças e síndromes associadas a problemas articulares e esqueléticos (BIOMET, 2004). Um material ideal para enxertia óssea do ponto de vista biológico e biomecânico é aquele que consegue ser completamente repostado por novo osso formado pelo hospedeiro.

A hidroxiapatita  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$  é uma das biocerâmicas mais frequentemente utilizadas para reconstrução óssea e dentária (RODRIGUES et al., 2003). Tem excelente compatibilidade com tecido ósseo e alta osteocondutividade (SUCHANEK et al., 1998). É considerada um material bioativo que permite a osseointegração, pois forma um elo químico direto com o osso subjacente sem a formação de tecido fibroso (TEIXEIRA et al., 2000).

Chama-se hidroxiapatita carbonatada do tipo A (CHA-tipo A) a apatita cujo íon carbonato substitui o íon hidroxila ( $OH^-$ , sítio monovalente) e hidroxiapatita carbonatada do tipo B (CHA-tipo B) a apatita cujo íon carbonato substitui o íon fosfato ( $PO_4^{3-}$ , sítio trivalente). As CHA-tipo B são semelhantes às apatitas encontradas no esmalte dentário e no osso cortical. A incorporação de íons carbonato na apatita provoca mudanças na morfologia, parâmetros de rede, tamanho do cristal, deformação e maior solubilidade (ELLIOT, 1994; FERNANDES, 2011; LEGEROS, 1994;).

A presença de íons carbonatos na estrutura da hidroxiapatita provoca um aumento da solubilidade e da taxa de dissolução dos cristais da apatita. Além disso, a presença de íons carbonato tem grande efeito na cristalinidade da estrutura e tamanho de cristal. A formação de cristais menores contribui para um aumento da área superficial e da taxa de dissolução, como também provoca um alargamento dos picos de difração. Estudos mostram que a substituição pelo íon carbonato gera uma grande desordem estrutural criando vacâncias de  $Ca^{2+}$  e  $OH^-$ . Esta desordem também reflete na periodicidade dos planos cristalográficos observada pelos raios X (HENCH, WILSON, 1993; LEGEROS, 1994).

Os cristais do osso mineral são de tamanho nanométrico e com grande área de superfície. Estes cristais crescem em uma matriz orgânica e têm ligações frouxas de cristal para cristal. Ao contrário, a hidroxiapatita de tamanho micrométrico apresenta área de superfície baixa e tem ligações fortes de cristal para cristal (SANOSH et al., 2008). Segundo Ferraz et al. (2004), a presença do fosfato de cálcio no osso é sob a forma de cristais de tamanho nanométrico de aproximadamente 5 a 20 nanômetros de largura por 60 nanômetros de comprimento com uma fase não-estequiométrica pouco cristalizada contendo  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{F}^-$  e outros íons. Adicionalmente, os materiais de HA nanoestruturada podem melhorar a sinterabilidade e a densificação devido a melhor área de superfície, o que poderia aperfeiçoar a resistência à fratura e outras propriedades mecânicas críticas (BANERJEE et al., 2007; KALITA et al., 2007; MURUGAN, RAMAKRISHNA, 2005).

O pré-requisito para aplicação clínica da hidroxiapatita na substituição óssea é preparar pós de HA que apresentem características desejáveis como área de superfície alta, pequenos tamanhos de grãos e baixo grau de aglomeração de 7 partículas, sendo todas estas propriedades dependentes do processo utilizado (KONG et al., 2002).

A preparação de HA carbonatada nanoestruturada exige modificações nas técnicas de síntese a fim de mimetizar estruturalmente as bioapatitas, tais como utilização de baixa temperatura, alto valor de pH, adição lenta dos reagentes e tempo de digestão pequeno, que contribuem para a produção de nano cristais de apatita (RODRÍGUES-LORENZO, 2000). Estes parâmetros de síntese afetam a morfologia, o tamanho de partícula e a cristalinidade do material e, essas propriedades influenciam diretamente no tipo de aplicação da apatita (ÂNGELO, 2008).

Em função da alta complexidade e diversificação na química dos fosfatos de cálcio, pode-se facilmente modificar as características do material variando-se o método utilizado na sua preparação. Por isso, a escolha e o controle da metodologia adotada no preparo do material são fundamentais para cada aplicação do produto final (SENA, 2004).

Dalapicula e Conz (2008), caracterizaram seis biomateriais de enxerto ósseo, sendo cinco de origem xenógena e um de origem alógena. A análise da distribuição granulométrica das amostras foi realizada pelo peneiramento em peneiras com passagem de 125  $\mu\text{m}$  até 1.000  $\mu\text{m}$ . Após a passagem nas peneiras, foi realizada a pesagem dos biomateriais dentro da faixa granulométrica, possibilitando a verificação da distribuição granulométrica das amostras. O resultado demonstrou que todas as amostras, exceto uma, eram constituídas de HA com diferentes intensidades de incorporação de carbonatos, com diferentes faixas granulométricas, área de superfície variando de 0,18  $\text{m}^2/\text{g}$  a 81,4  $\text{m}^2/\text{g}$  e cristalinidade variando de baixa a alta, demonstrando que apesar da semelhança de suas composições, os biomateriais analisados apresentaram grande diferença de parâmetros físico-químicos. De acordo com os autores, as propriedades físico-químicas são responsáveis pela integração dos biomateriais ao tecido vivo e devem ser sempre avaliadas antes de serem utilizados em pacientes, após a realização de testes em laboratórios e, preferencialmente, em animais.

## RESULTADOS

Os materiais de enxerto têm uma ampla aplicabilidade na medicina e na odontologia. Eles surgiram devido à necessidade de se restabelecer a função e a estética de áreas comprometidas, tais como aquelas resultantes da perda do elemento dentário. Esses materiais devem possuir capacidade de induzir a regeneração óssea através dos mecanismos de osteogênese, osteoindução e osteocondução (CAFFESSE et al., 1999; ALMEIDA; ALVES, 2007; SU-GWAN; HAK-KYUN; SUNG-CHUL, 2001).

Apesar de apresentarem características vantajosas, nem sempre os biomateriais conseguem

atender a todos os requisitos de osteocondução, osteoindução e ainda promover uma osteogênese em tempo satisfatório.

Os trabalhos até então realizados mostram que o melhor material a preencher o alvéolo dental pós exodontia e que permite as melhores respostas durante o processo de reparo alveolar consiste no coágulo sanguíneo (CARVALHO; OKAMOTO, 1987; CLÁUDIO-COUTINHO, 2009; OKAMOTO et al., 1994). Nestes estudos, os autores relatam, ainda, que qualquer material introduzido num alvéolo em condições normais provoca um atraso na cronologia do processo de reparo alveolar.

Num estudo com vidro bioativo, por exemplo, Cláudio-Coutinho (2009), obteve pouca neoformação óssea ao redor de seu bioenxerto, o que fez o autor concluir que, apesar de biocompatível, o biomaterial utilizado induz a uma menor taxa de formação óssea e uma menor maturação do tecido ósseo formado.

Em contrapartida, esse trabalho mostra resultados aparentemente positivos com o uso da hidroxiapatita nanométrica, pois nos aspectos macroscópicos e radiográficos os resultados foram semelhantes para ambos os grupos, sugerindo que não houve atraso; enquanto o microscópico revelou características de aceleração do reparo alveolar, como seguem as características mais detalhadamente.

### **ASPECTOS CLÍNICOS**

Em ambos os grupos, a mucosa gengival apresenta-se espessa, inclusive ao redor dos dentes adjacentes, exibindo uma coloração e textura normais e, a depressão central da ferida indica discreta marca linear, sugerindo uma cicatrização normal.

### **IMAGEM RADIOGRÁFICA**

Do mesmo modo, os dois grupos apresentaram resultados semelhantes: O septo interdental já está quase totalmente reabsorvido, assim como grande parte da lâmina dura. Observa-se, igualmente, certo grau de radiopacidade intra-alveolar, principalmente ao nível do fundo alveolar, sugerindo início de maturação óssea (Figura 3).

Figura 3: Imagem radiográfica de hemi-maxila direita com 40 dias após a exodontia de primeiro molar



Fonte: (PASSOS, 2015).

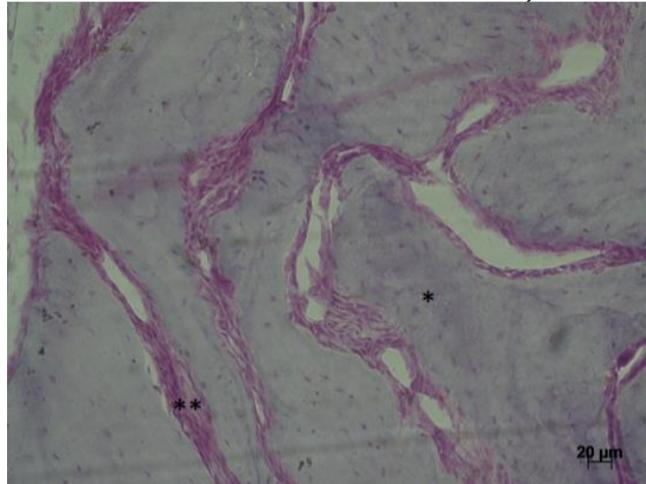
### **ASPECTOS MICROSCÓPICOS**

Em torno de 40 dias no indivíduo jovem, ocorre o preenchimento de 2/3 alveolares por trabéculas ósseas e osso imaturo, em cuja malha encontra-se esparsamente tecido conjuntivo fibroblástico, identificando a fase de diferenciação óssea ou mineralização. O epitélio apresenta-se com papilas normais (ABREU, 1970, 1974; MARZOLA, 2000, 2005, 2008 apud MARZOLA et al., 2010).

Neste trabalho, quando comparamos o grupo controle (Figura 4) ao grupo tratado com HNC

(Figura 5), nota-se osteoblastos, originados de células osteogênitoras que depositam matriz orgânica, formando tecido osteóide. O tecido ósseo, contudo, não estava completamente maduro e os espaços medulares ainda estavam bem vascularizados, o que, de acordo com Bang (1972), Gould et al. (1982) e Schmid et al. (1997), demonstraram uma correlação íntima entre a angiogênese e a formação óssea, indicando que a formação de brotos capilares precede a formação do tecido ósseo (ALMEIDA; ALVES, 2007).

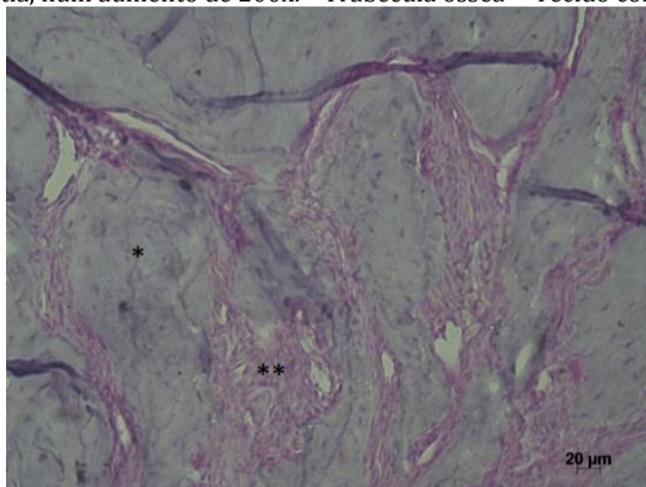
Figura 4: Corte histológico de hemi- maxila direita do grupo controle com 40 dias após a exodontia, num aumento de 200x. \* Trabécula óssea\*\* Tecido conjuntivo fibroso



Fonte: (PASSOS, 2015).

Também pode-se notar em ambos, a presença de osteoblastos e osteoclastos o que é um indicativo de remodelação, muito característico em reparo alveolar.

Figura 5: Corte histológico de hemi- maxila direita de um dos animais do grupo tratado com HNC, com 40 dias após a exodontia, num aumento de 200x. \* Trabécula óssea\*\* Tecido conjuntivo fibroso



Fonte: (PASSOS, 2015).

O diferencial do resultado, quando comparadas as figuras 2 e 3, é que não há nenhum indicativo de fragmento ou partículas de enxerto, nem resposta do organismo ao mesmo. Adicionalmente, o tecido conjuntivo apresenta-se com um maior nível de organização, quando comparado ao grupo controle. A imagem mostra que, pela análise histológica, neste período, é possível verificar diferença na disposição das trabéculas ósseas sendo o grupo tratado mais desenvolvido que o controle.

É preciso lembrar que esta é uma dentre as fases de reparo, sendo que o processo de reparo alveolar se inicia imediatamente após a extração dental. Morfologicamente, podem ser consideradas quatro fases fundamentais na sequência da evolução do processo de reparo alveolar: proliferação celular, desenvolvimento do tecido conjuntivo, maturação do tecido conjuntivo e diferenciação óssea ou de mineralização (CARVALHO; OKAMOTO, 1978a; CARVALHO; OKAMOTO, 1978b apud

CARVALHO; OKAMOTO, 1985).

Diante ao exposto, é necessário um comparativo e análise desses vários estágios sendo isto possível através de eutanásias em espaços de tempo mais alternados, como por exemplo, 7, 14 e 21 dias.

Deste modo é válido que consideremos este efeito positivo numa etapa, individualmente, até que novos estudos sejam feitos.

## CONCLUSÃO

De acordo com esse estudo, a inserção da hidroxiapatita nanométrica carbonatada em processo de reparação do alvéolo dental, da maneira que foi feita e com o tempo pós-operatório analisado, apresentou um resultado positivo, promovendo a regeneração óssea de forma mais acelerada, uma vez que, pelo tamanho das partículas, houve um aproveitamento e incorporação pelas células de tecido e utilização destas como substrato para secreção de matriz óssea. Sugere-se que novos estudos sejam realizados para um comparativo da evolução do reparo com datas alternadas de eutanásia.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J. M.; ALVES, J. B. Efeito da matriz dentinária humana no reparo alveolar de ratos: avaliação histológica e imunohistoquímica, **RGO**, v. 55, n. 2, p. 133-8, abr./jun. 2007.
- ÂNGELO, L. C. **Síntese e caracterização de nanocompósitos hidroxiapatita** - gelatina obtidos pelo método de precipitação utilizando o método de Rietveld e IVTF. 2008. Dissertação (Química) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2008.
- BANERJEE, A.; BANDYOPADHYAY, A.; BOSE, S. Hydroxyapatite nanopowder synthesis, densification and cell-materials interaction. **Mater Sci Eng C**, v. 27, p. 729-35, 2007.
- BANG, G.; NORDENRAM, A.; ANNEROTH, G. Allogenic demineralized dentin implants in jaw defects of Java monkeys. **In J Oral Surg**, v. 1, n. 3, p. 126-36, 1972.
- BIOMET. **Biomet Annual Report**. Warsaw, Indiana, USA: Biomet Inc., 2004.
- CAFFESSE, R. G.; KRAUSER, J.T.; SAADOUN, A. P. Commentary and analysis. **Implant Dent**, v. 8, n. 4, p. 347-53, 1999.
- CARVALHO, A. C. P.; OKAMOTO, T. **Cirurgia bucal: fundamentos experimentais aplicados à clínica**. São Paulo: Panamericana, 1987. 139p.
- CARVALHO, A. C. P.; OKAMOTO, T. Cuidados pós-exodônticos. Considerações clínicas e experimentais. **Ars Cvrandi Odont**, v. 5, p.9-27,1978.
- CARVALHO, A. C. P.; OKAMOTO, T. Implantes intra-alveolares. Considerações sobre estudos experimentais. **Rev Ass Paul Cirurg Dent**, n. 32, p. 273-79, 1978.
- CARVALHO, A. C. P.; OKAMOTO, T. Interferências sistêmicas sobre o processo de reparo em feridas de extração dental. **Rev Odontol UNESP**, v. 14, n. 1/2, p.27-33, 1987.
- CARVALHO, T. L. L. et al. Histologic and histometric evaluation of rat alveolar wound healing around polyurethane resin implants. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 26, n. 2, p. 149-52, Apr. 1997.
- CLÁUDIO-COUTINHO, C. C. **Análise da dinâmica do processo de reparo de alvéolos preenchidos com coágulo sanguíneo e vidro bioativo (Perioglass®) em ratos não diabéticos, diabéticos controlados e não controlados**: estudo histológico, histométrico e imunistoquímico. 2009. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, UNESP, Araçatuba, 2009.
- DALAPICULA, S. S.; CONZ, M. B. Caracterização físico-química de biomateriais para enxerto ósseo de origem alógena e xenógena. **Implant News**, v. 5, n. 2, p.2 05-13, 2008.
- DALEN, N.; OLSSON, K. E. Bone mineral content and physical activity. **Acta Orthop Scand**, v. 45, p. 170-6, 1974.
- ELLIOT, J. C. **Structure and chemistry of the apatite and other calcium orthophosphates**. Amsterdam: Elsevier, 1994.
- FERNANDES, T. J. **Síntese de Hidroxiapatita Nanométrica com PVP: Sinterização e Adsorção de Albumina Bovina**. 2011. Dissertação (Engenharia dos Materiais) - Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2011.
- FERRAZ, M. P.; MONTEIRO, F. J.; MANUEL, C. M. Hydroxyapatite nanoparticles: A review of preparation methodologies. **J Applied Biomaterials & Biomechanics**, v. 2, p. 74-80, 2004.

- GARG, A. K. Bone Physiology for dental implantology. In: GARG, A. K. **Bone Biology, harvesting, grafting for dental implants: rationale and clinical applications**. Nova Deli China: Quintessence Publishing, 2004. cap. 1, p.3-19.
- GOULD, T. R. L.; WESTBURG, L.; TILLMAN, J. Dentin matrix gelatin (DMG) as a possible “universal” grafting material in periodontics. **J Periodontol**, v. 53, n. 1, p. 22- 5, 1982.
- HAMERSCHMIDT, R. **Utilização de Hidroxiapatita de Cálcio no Preenchimento de Defeitos Ósseos Criados em Mastóides de Ratos**. 2010. Dissertação (Clínica Cirúrgica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- HANCOX, N. M. **Biology of Bone**. Cambridge University Press, 1972.
- HENCH, L. L.; WILSON, J. An Introduction to Bioceramics. **World Scientific**, v. 1, p. 139-80, 1993.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In: \_\_\_\_\_. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.; KELLEY, R. O. **Basic Histology**. 8. ed. U.S.A.: Appleton & Lange, 2005.
- KALITA, S. J.; BHARDWAJ, A.; BHATT, H. A. Nanocrystalline calcium phosphate ceramics in biomedical engineering. **Mater Sci Eng C**, v. 27, p. 441-9, 2007.
- KONG, L. B.; M. A, J.; BOEY, F. Nanosized hydroxyapatite powders derived from coprecipitation process. **J Materials Science**, v. 37, p. 1131-34, 2002.
- LEGEROS, R. Z. Biological and Synthetic Apatites. In: BROWN, P. W.; CONSTANTZ, B. **Hydroxyapatite and related materials**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 3-28.
- LEGEROS, R. Z. Calcium Phosphates in oral biology and medicine. **Monogr Oral Sci**, v. 15, p. 1-201, 1991
- LEGEROS, R. Z. et al. Calcium phosphate biomaterials: preparation, properties and biodegradation. In: WISE, D. L. (Ed). **Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering**. Part A: materials, v. II. New York, USA: Marcel Dekker, 1995. p.1429-63.
- LEVENSON, M. J.; MICHAELS, L.; PARISIER, S. C. Congenital cholesteatomas in children and embryologic correlations. **Laryngoscope**, v. 98, p. 949-55, 1988.
- MARZOLA, C. et al. Alveolar healing - Microscopically and clinical aspects. **Revista de odontologia**, v. 10, p. 116-39, 2010.
- MUNDY, G. R. Bone remodeling. In: MUNDY, G. R. **Bone Remodeling and its disorders**. 2. ed. London: Martin Dunitz, 1999. p.1-11.
- MURUGAN, R.; RAMAKRISHNA, S. Development of nanocomposites for bone grafting. **Compos Sci Technol**, v. 65, p. 2385-406, 2005.
- OKAMOTO, T. et al. Interference of the blood clot on granulation tissue formation after tooth extraction. Histomorphological study in rats. **Braz Dent J**, v. 5, n. 2, p. 85-92, 1994.
- OSÓRIO, L. B. **Avaliação do reparo de alvéolo, após exodontia, com perda de parede óssea vestibular e o uso de enxerto aloplástico**. 2013. 44 f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.
- PILLIAR, R. M. et al. Porous calcium polyphosphate scaffolds for bone substitute application – in vitro characterization. **Biomaterials**, v. 22, p. 963-72, 2001.
- QUEIROZ, S. B. F. de. **Influência da proteína morfogenética óssea (BMP) na reparação alveolar: estudo morfológico em ratos**. 2002. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2002.
- RODRIGUES, C. V. M. et al. Characterization of a bovine collagen-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 24, p. 4987-97, 2003.
- RODRÍGUES-LORENZO, L. M.; VALLET-REGI, M. Controlled Crystallization of Calcium Phosphate Apatites. **Chemistry of Materials**, v. 12, p. 2460-5, 2000.
- SANOSH, K. P. et al. Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite powder using sol-gel technique. **Bull Mater Sci**, v. 32, n. 5, p. 465-70, 2008.
- SCHMID, J. et al. The significance of angiogenesis in guided bone regeneration. **Clin Oral Implants Res**, v. 8, n. 3, p. 244-8, 1997.
- SCHUKNECHT, H. F. **The pathology of ear**. Cambridge: Harvard University, 1974.
- SENA, L. A. **Produção e caracterização de compósitos hidroxiapatita: colágeno para aplicações biomédicas**. 2004. Tese (Ciências em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.
- SILVA, I. I. C. **Avaliação do potencial osteogênico de células progenitoras de sangue de cordão umbilical humano e perióstio de ratos e do potencial osteocondutor de xenoenxerto bovino na terapia de perdas ósseas**. 2008. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Universidade Federal Fluminense, 2008.
- SILVA, I. I. C. et al. Osteogenic potential of rat periosteal mesenchymal progenitor cells and biological compatibility of hydroxyapatite/collagen carrier: in vitro study. *Anals... World Biomaterial Congress*, 8. May 2008, Amsterdam.

SUCHANEK, W.; YOSHIMURA, M. Processing and properties of hydroxyapatitebased biomaterials for use as hard tissue replacement implants. **J Mater Res**, v. 13, n. 1, p. 94-117, 1998.

SU-GWAN, K.; HAK-KYUN, K.; SUNG-CHUL, L. Combined implantation of particulate dentine, plaster of Paris, and a bone xenograft (Bio-Oss) for bone regeneration in rats. **J Craniomaxillofac Surg.**, v. 29, n. 5, p. 282-8, 2001.

TEIXEIRA, R. G.; VIDAL, B. C.; SANTOS, E. P. Reposicionamento cirúrgico de um segundo molar inferior direito impactado com cárie: relato de caso. **Jornal Brasileiro de Ortodontia Facial**, v. 5, n. 30, p. 76-81, 2000.

TEN CATE, R. **Histologia bucal**: desenvolvimento, estrutura e função. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.