

PAPEL DO NÁCAR COMO AGENTE OSTEOGÊNICO NA RECUPERAÇÃO DE LESÕES PERIODONTAIS EM CÃES

Role of nacre as osteogenic agent in the recuperation of dog periodontal lesions

Altino Teixeira Neto ¹, Cláudia Valle Cabral dos Santos ², Isabel Garcia ³, Edmália C. Barreto ⁴, Aristides Cheto de Queiroz ⁵, Luiz Erlon A. Rodrigues ⁶

RESUMO

A última década caracterizou-se pela busca de novos biomateriais usados como indutores osteogênicos. O nácar (madrepérola) foi descrito como um biomaterial que pode iniciar a formação óssea por osteoblastos humanos, *in vivo* e *in vitro*. Neste trabalho testou-se o efeito do pó de nácar (tamanho das partículas entre 50 a 150 µm) extraídas da bivalve *Mytella falcata*, na reconstrução do osso alveolar de maxilares de cães. Depois de anestesiados, dois cães sadios foram submetidos à extração dos terceiros premolares esquerdos e direitos e também dos quartos premolares superiores de ambos os lados. As lesões foram tratadas separadamente por sangue autógeno, gelatina, pó de nácar e nácar misturado à gelatina. Após seis meses os mesmos cães foram uma vez mais anestesiados e então sacrificados. Amostras do osso alveolar lesado foram estudadas histologicamente. Os resultados mostraram que o pó de nácar *in natura* é um biomaterial com fracas propriedades osteogênicas e pouco atua na recomposição do ambiente que caracteriza o desenvolvimento ósseo. Este estudo não confirma observações anteriores que consideraram o nácar como um bom indutor da osteogênese.

UNITERMOS: nácar, osteogênese, biomaterial. R Periodontia 2006; 17:00-00.

INTRODUÇÃO

De acordo com SCHENK (1996), na última década, foram desenvolvidos os princípios da regeneração tecidual guiada (GTR), para a reorganização dos tecidos periodontais perdidos, decorrentes da doença periodontal inflamatória. Os estudos daquele autor basearam-se na utilização de colágenos associados à proteína-2 morfogenética do osso humano (rhBMP-2). KING *et al.*, (1998), concluíram que essa associação aumentou, significativamente, a neoformação óssea, e que, quanto mais lenta fosse a dissolução do colágeno e mais prolongada fosse a exposição à rhBMP-2, maior seria a cementogênese. WEINFELD *et al.*, (1999), justificaram a indicação do enxerto alógeno Biobone[®], constituído de colágeno desnaturado e osso bovino inorgânico, na reparação óssea. Segundo esses autores o enxerto funcionava como uma matriz óssea, absorvido na mesma proporção em que o novo osso era formado.

YAMADA *et al.*, (2002), compararam o uso de colágeno, associado ou não ao enxerto de osso mineral poroso, na regeneração tecidual guiada aplicada na correção de defeitos ósseos em cães. Esses autores observaram o aparecimento de um novo cemento com inserção de fibras colágenas, sendo que a quantidade do osso neoformado era significativamente maior quando o colágeno foi associado ao enxerto ósseo.

¹ Professor adjunto da Faculdade de Odontologia da UFBA (FOUFBA)

² Professora assistente da EBMS, FBDC, Salvador, Bahia

³ Professora assistente da Escola de Odontologia da FBDC

⁴ Mestranda em clínica odontológica, FOUFBA

⁵ Professor adjunto de patologia da FAMED/UFBA

⁶ Professor titular da Faculdade de Medicina da UFBA e da EBMS, FBDC

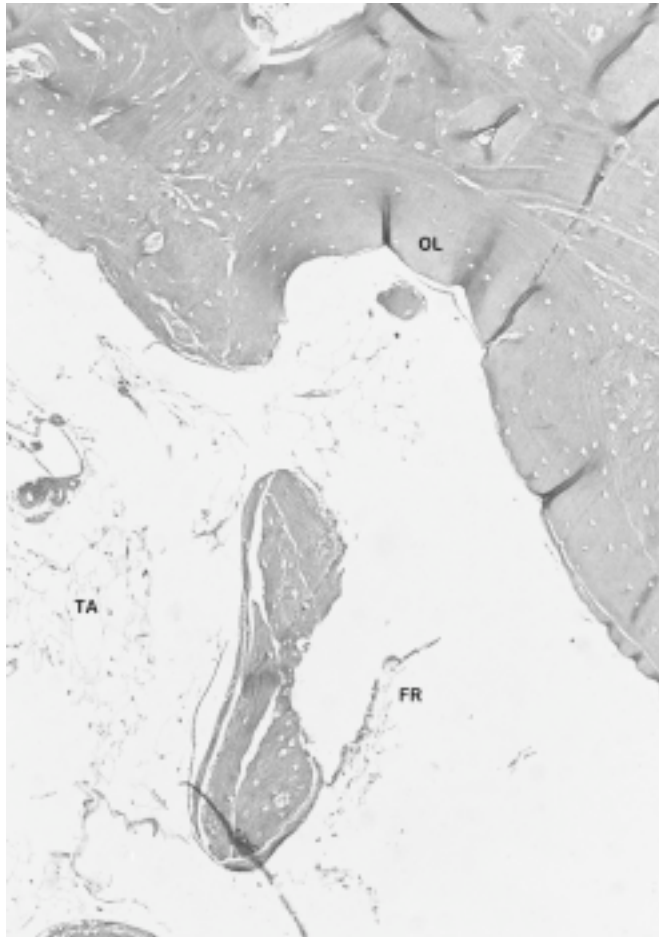


Figura 1. – Parte do alvéolo dentário de cão tratado apenas com sangue do mesmo animal. Destaque para o tecido ósseo maduro lamelar (OL), a presença de tecido adiposo (TA) e de discreta fibrose reacional (FR). x 200 HE.

Por outro lado, LOPEZ *et al.*, (1992, 1997 e 2000) e LAMGHARI *et al.*, (1999 e 2001), salientaram que a madrepérola (nácar) obtida da ostra gigante *Pinctada máxima*, exibiu propriedades osteogênicas, estimulando e regulando a formação óssea.

Diante do exposto, este trabalho tem por objetivo, avaliar os principais aspectos histológicos envolvidos no processo da reparação osteogênica desempenhado pelo pó de nácar, associado ou não à gelatina, na recuperação de lesões provocadas em mandíbulas de cães.

MATERIAL E MÉTODO

Obtenção do pó de madrepérola (nácar)

A camada interna da concha bivalve *Mytella falcata*, foi submetida à moagem em gral e pistilo de porcelana e tamisado, a fim de se obter um pó de madrepérola com partículas entre 50 e 150 μ m. O nácar, substância branca, brilhante com reflexos irisados, segundo LAMGHARI *et al.*, (1999), é uma aragonita com 1,7% de substâncias orgânicas.

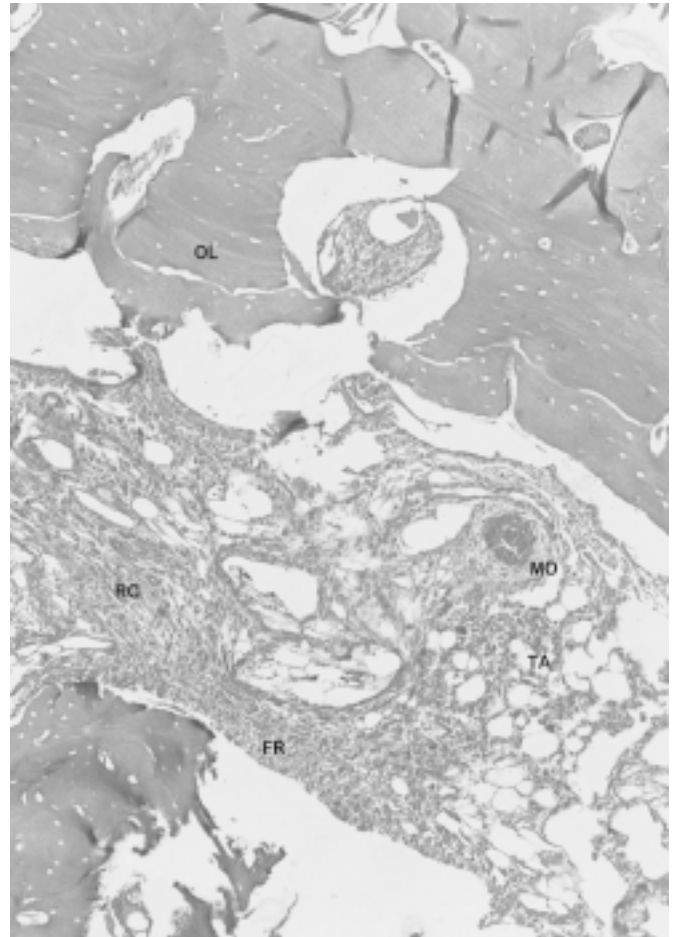


Figura 2. – Detalhes do alvéolo dentário tratado com nácar e gelatina. Intensa reação granulomatosa (RG) do tipo “corpo estranho” em plena atividade inflamatória, com pouca fibrose reacional (FR) periférica. Nota-se ainda, a presença de tecido adiposo e da medula óssea (MO). x 100 HE.

Preparo das amostras

Dois cães normais, sem raça definida e na faixa etária de oito a dez meses, foram anestesiados de acordo com NUNES *et al.*, (1999). Para tal foram utilizados sulfato de atropina (40 mg/kg), cloridrato de xilazina (1 mg/kg), cloridrato de cetamina (5 mg/kg), e diazepam (200 mg/kg). Depois de anestesiados, de cada animal foram extraídos os terceiros pré-molares esquerdos e direitos, além dos quartos pré-molares superiores esquerdos e direitos.

O pós-operatório, para cada animal, consistiu da injeção de antibiótico (enrofloxacina, 5 mg/kg de peso a cada 24 horas, durante oito dias) e de analgésico (cetoprofeno, 2 mg/kg de peso, a cada 24 horas, durante três dias), segundo JOUBERT (2001).

Os alvéolos resultantes das extrações, depois de identificados, foram tratados, respectivamente, com implante de nácar e gelatina (1:1), com nácar misturado ao sangue autógeno, gelatina misturada com sangue e o último, apenas com sangue. Seis meses após os implantes, os animais foram novamente anestesiados e sacrificados utilizando-se da injeção intravenosa de cloreto de potássio (10%). As amostras das regiões implanta-

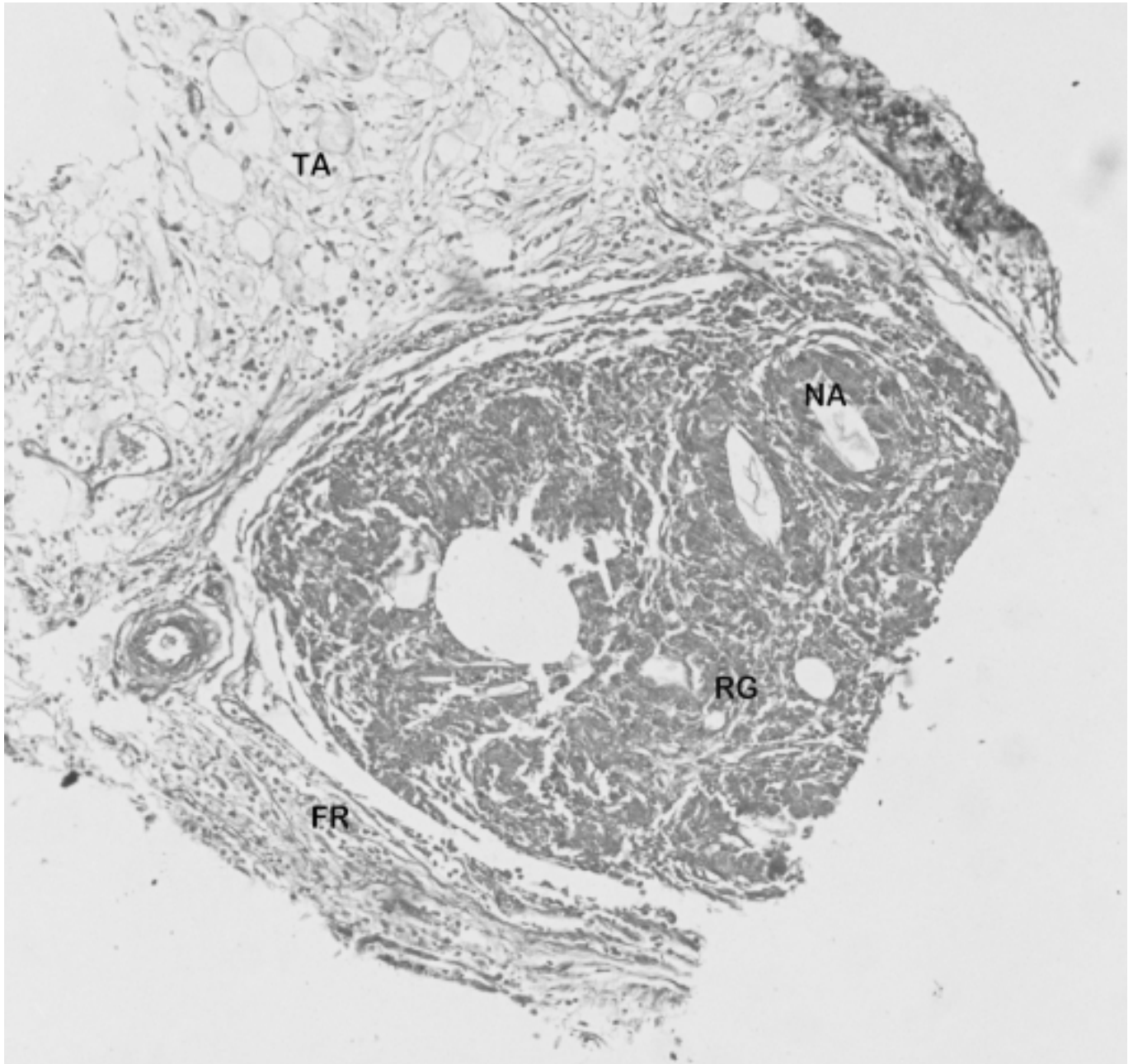


Figura 3. – Parte do alvéolo dentário tratado com o pó de nácar. Destaque para a reação inflamatória granulomatosa (RG), com células epitelióides e células gigantes englobando parte do nácar (NA). Observa-se discreta fibrose reacional periférica (FR). x 100 HE.

das foram convenientemente marcadas e transferidas para frascos pré-marcados, individuais, contendo 5 mL de solução de formol a 10% para serem fixados. Cada amostra, separadamente foi submetida ao processo de descalcificação em solução de ácido nítrico a 7,5 % durante 24 horas. Em seguida elas foram processadas seguindo-se a técnica habitual de inclusão em parafina. Para cada amostra, foram feitos dois cortes histológicos longitudinais, no sentido maior do eixo alveolar, o que permitiu a observação de toda a espessura da parede do alvéolo. Cortes histológicos com 5 mm de espessura, depois de convenientemente marcados, foram corados pelo conjunto hematoxilina –

eosina, segundo JUNQUEIRA *et al.*, (1977).

RESULTADOS

Após o processo de descalcificação das amostras, o nácar (NA) é identificado no tecido como material acelular, dispostos em lâminas paralelas basofílicas de permeio à matriz amorfa, também basofílica (**figura 3**, observada num aumento de 100 vezes).

Naqueles alvéolos onde foi colocado apenas o sangue nos locais das extrações dentárias, (**figura 1**, aumento de 200 ve-

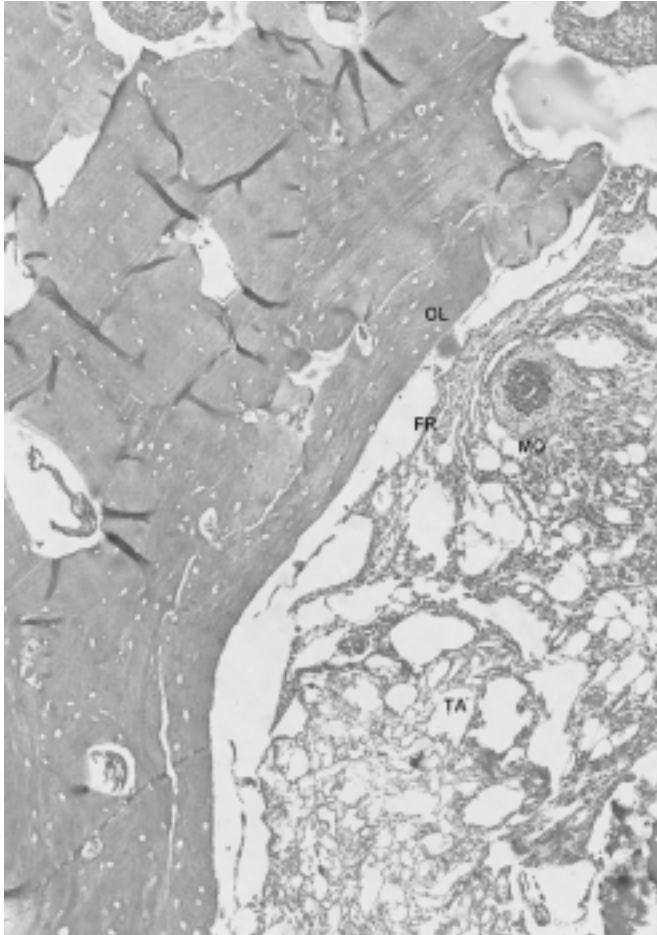


Figura 4. - Parte do alvéolo dentário de cão tratado apenas com gelatina. Observa-se reação inflamatória ativa, com quase nenhuma fibrose reacional (FR) e esboço de reação granulomatosa com formação de osso lamelar (OL) maduro. Destaque para o tecido adiposo (TA) e a medula óssea (MO). x 200 HE.

zes), observou-se à formação de tecido fibroso reacional (FR) cicatricial, com rara inflamação, onde são detectados linfócitos e macrófagos envolvidos com o início do processo cicatricial, além da presença de tecido adiposo (TA) e com formação de tecido ósseo (TO) lamelar na periferia. Nesses casos, os alvéolos dentários cicatrizaram normalmente com tecido resultante de fibrose reacional característico do processo de reparação óssea.

Nos alvéolos onde foram implantados o pó de nácar (**figura 2**, aumento de 100 vezes) ou o nácar misturado com gelatina (**figura 3**, aumento de 100 vezes) os aspectos histológicos foram muito semelhantes. Nesses dois grupos observou-se o processo inflamatório em nítida atividade, com muita celularidade constituída de linfócitos e macrófagos. A reação granulomatosa (RG) é evidente nessas lesões onde foram detectados grupamentos de células epitelióides e células gigantes englobando restos de nácar. Nestes casos o processo de cicatrização não se concluiu, permanecendo a reação granulomatosa do tipo "corpo estranho", como resposta ativa à aplicação do nácar, acompanhada de fibrose reacional periférica.

A **figura 4** (aumento de 200 vezes), representa aqueles alvéolos onde foi implantada apenas a gelatina. Neles observou-se a formação de tecido ósseo (TO) lamelar maduro, espesso e com evidências de remodelação. A presença do tecido adiposo, da medula óssea e da pouca reação de fibrose são indicativos de osteogênese fisiológica.

DISCUSSÃO

Segundo BEDOUET *et al.*, (2001) e MARIN *et al.*, (2001), a biomineralização observada nos moluscos se inicia na formação do cristal de aragonita e sua acumulação, num processo controlado por várias proteínas, as quais são secretadas pelo manto epitelial da concha. Essas proteínas são muito semelhantes àquelas que estão envolvidas na osteogênese de animais vertebrados. Devido a essas semelhanças, vários pesquisadores tentaram demonstrar prováveis propriedades osteogênicas induzidas, principalmente pelo pó do nácar, tanto *in vitro* (LOPEZ *et al.*, 1992 e DELATTRE *et al.*, 1997), quanto *in vivo* (LIAO *et al.*, 2000).

O extrato aquoso, dialisado e liofilizado, obtido a partir do pó de nácar extraído da ostra *Pinctada maxima* demonstrou, segundo estudos de MOUTAHIR-BELOASMI, (2001), possuir propriedades antiapoptóticas, além de influenciar, positivamente, na diferenciação e aumento da sobrevivência de osteoblastos em cultura. LAMGHARI *et al.*, (2001), demonstraram que o pó de nácar composto de partículas com diâmetro entre 50 e 150 μm , quando implantado experimentalmente foi capaz de estimular a osteogênese e a artrodese de vértebras de coelhos entre duas a 11 semanas pós-cirurgia. Quando o pó de nácar foi implantado subcutaneamente em ratos estimulou a diferenciação de fibroblastos, contribuindo para a formação de nova cartilagem. A atividade osteogênica do nácar, segundo ATLAN *et al.*, (1997), parece ser devida aos seus componentes orgânicos os quais seriam responsáveis pela ativação celular e osteoblástica. De acordo com LOPEZ *et al.*, (2000), partículas finas deste biomaterial, (em torno de 50 μm), têm sido utilizadas em preparações farmacológicas como protetoras da pele. Aqueles mesmos autores atribuíram esta propriedade ao estímulo da atividade fibroblástica causada pelos oligoelementos presentes nos cristais da aragonita, assim como às proteínas solúveis que compõem o nácar. Aqueles oligoelementos e estas proteínas são liberados localmente, durante a biodissolução do implante, agindo positivamente na quimiotaxia dos fibroblastos, além do que, estimulam a fabricação da matriz extracelular composta principalmente de colágenos dos tipos I e III. No entanto, BAHAR *et al.*, (2003), após utilizarem o nácar *in natura* ou desmineralizado como agentes de reconstrução de defeitos ósseos no rato, concluíram que ambas as formas deste biomaterial apresentaram propriedades muito fracas com agentes osteogênicos assim como na recom-

posição do ambiente que caracteriza o desenvolvimento ósseo.

Os resultados apresentados por esse trabalho experimental estão de acordo com esses últimos achados. Eles indicam que a presença do nácar mantém em atividade a reação inflamatória granulomatosa, impedindo que se complete o processo de cicatrização dentro dos moldes normais do processo de reparo, embora a formação do osso maduro lamelar se faça na periferia.

CONCLUSÃO

Diante do exposto, conclui-se que a formação do osso alveolar parece ser independente da presença ou não do nácar colocado em lesões de alvéolos, provocadas em cães. Portanto, os resultados obtidos neste trabalho não estimulam a utilização deste biomaterial na correção de defeitos ósseos.

ABSTRACT

The last decade was characterized by the search of new

biomaterials used as osteogenic inductors. The nacre (mother of pearl) was described as a biomaterial that can initiate bone formation by human osteoblasts, *in vivo* and *in vitro*. In this work it was tested the effect of the powdered nacre (size of particles between 50 to 150 μ m), extracted from bivalve *Mytella falcata* in the reconstruction of the maxillary alveolar bone of dogs. After being anesthetized healthy dogs were submitted to the extraction of the third left and right premolar teeth and also of the fourth upper ones from both sides. The alveolar lesions were separately treated by autogenous blood, gelatin, powdered nacre and nacre plus gelatin. After six months the dogs were once more anesthetized and then sacrificed. Samples of damaged alveolar bone were histologically studied. The results showed that natural powder of nacre is a poor conductive biomaterial in a bone developmental environment and this study does not support previous observations that nacre could be considered as a good osteogenic inductor.

UNITERMS: nacre, osteogenesis, biomaterial

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Atlan G, Balmain N, Berland S, Vidal B, Lopez E. Reconstruction of human maxillary defects with nacre powder: histological evidence for bone regeneration. C R Acad Sci Paris 1997; 320: 253-258.
- 2- Bahar H, Yaffe A, Binderman I. The influence of nacre surface and its modification on bone apposition: a bone development model in rats. J Periodontol 2003; 74(3): 366-371.
- 3- Bedouet L, Schuller JM, Marin F, Millet C, Lopez E, Giraud M. Soluble proteins of the nacre of the giant oyster *Pinctada maxima* and of the abalone *Haliotis tuberculata*: extraction and partial analysis of the nacre proteins. Comp Biochem Phys B 2001; 128(3): 389-400.
- 4- Delattre O, Catonne Y, Berland S, Borzeix S, Lopez E. Use of mother of pearl as a bone substitute: Experimental study in sheep. Eur J Orthop Surg Traumatol 1997; 7:1-5.
- 5- Joubert KE. The use of analgesic drugs by South African veterinarians, J S Afr Vet Assoc 2001; 72(1): 57-60.
- 6- Junqueira LC, Carneiro J, Contopoulos AN. Methods of study. In: Basic Histology, 2nd edition, LANGE Medical Publications, Los Altos California, 1977. p.1-16.
- 7- King GN, King N, Hughes FJ. Effect of two delivery systems for

- recombinant human bone morphogenetic protein-2 on periodontal regeneration in vivo. *J Periodontal Res* 1998; 33(4): 226-236.
- 8- Lamghari M, Almeida MJ, Berland S, Laurent A, Huet H, Milet C, Lopez E. Stimulation of bone marrow cells and bone formation by nacre: in vivo and in vitro studies. *Bone* 1999; 25(2): 91S-94S.
- 9- Lamghari M, Berland S, Laurent A, Huet H, Lopez E. Bone reactions to nacre injected percutaneously into the vertebrae of sheep. *Biomaterials* 2001; 22: 555-562.
- 10- Liao H, Mutvei H, Sjoström M, Hammarström L, Li J. Tissue responses to natural aragonite (*Margaritifera* shell) implants in vivo. *Biomaterials* 2000; 21(5): 457-468.
- 11- Lopez E, Faou L, Borzeix S, Berland S. Stimulation of rat cutaneous fibroblasts and their synthetic activity by implants of powdered nacre (mother of pearl). *Tissue Cell* 2000; 32 (1): 95-101.
- 12- Lopez E, Giraud M, Berland S, Milet C, Gutierrez G. Procédé de préparation des substances actives à partir de nacre, produits obtenus, utiles comme médicaments. Brevet CNRS n° FR 9515650, 28/12/1995, WO 97/24133-10/07/97.
- 13- Lopez E, Vidal B, Berland S, Camprasse S, Camprasse G, Silve C. Demonstration of the capacity of nacre to induce bone formation by human osteoblasts maintained in vitro. *Tissue Cell* 1992; 24: 667-679.
- 14- Marin F, Pereira L, Westbroek P. Large-scale fractionation of molluscan shell matrix. *Prot Express Purif* 2001; 23: 175-179.
- 15- Moutahir-Belqasmi F, Balmain N, Liberrher M, Borziex S, Berland S, Barthelemy M, Peduzzi J, Millet C, Lopez E. Effect of water soluble extract of nacre (*Pinctada maxima*) on alkaline phosphatase activity and Bcl-2 expression in primary cultured osteoblasts from neonatal rat calvaria. *J Mat Sci* 2001; 12: 1-6.
- 16- Nunes N, Massone F, Pompermayer LG, Pirolo J. Estudo da atividade antiarritmogênica da levomepromazina em cães submetidos à anestesia pela quetamina. *Ciência Rural, Universidade Federal de Santa Maria* 1999; 29 (2): 291-295.
- 17- Schenk RK. Regeneração Óssea; Bases Biológicas. In: *Regeneração Óssea Guiada em Implantodontia*. Buser et al., ed. São Paulo: Quintessence Publishing Co Inc; 1996. p. 49-100.
- 18- Weinfeld I, Magalhães LY, Magalhães JF, Villa N. Estudo histológico de um novo material (Biobone) indicado para reparação óssea. *Rev. Paul Odontol* 1999; 21 (4): 8-10.
- 19- Yamada S, Shima N, Kitamura H, Sugito H. Effect of porous xenographic bone graft with collagen barrier membrane on periodontal regeneration. *Int J Periodontic Restor Dent* 2002; 22 (4): 389-397.

Endereço para correspondência:

Luiz Erlon A. Rodrigues

Laboratório de Pesquisas Básicas da Faculdade Bahiana de Medicina e Saúde Pública

Rua Frei Henrique, 8

CEP: 40050-420 - Salvador - BA

E-mail: erlon@ufba.br