

AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA DO REPARO DE CAVIDADES ÓSSEAS EM TÍBIAS DE RATOS PREENCHIDAS POR OSSO DESMINERALIZADO OU POR OSSO COMPOSTO COM E SEM PROTEÍNA MORFOGENÉTICA DO OSSO (BMP)

HISTOLOGIC AND HISTOMORPHOMETRIC EVALUATION OF HETEROGENOUS DEMINERALIZED BONE OR COMPOUND BONE WITH AND WITHOUT BONE MORPHOGENETIC PROTEIN (BMP) IN RAT TIBIA

Sérgio Manoel MENDES¹
 Carlos Eduardo da FONSECA¹
 Ana Paula Farnezi BASSI²
 Daniela PONZONI²
 Paulo Sérgio Perri de CARVALHO³

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi analisar microscópica e histometricamente a ação do osso desmineralizado bovino e do osso composto associado ou não a proteína óssea morfogenética utilizados em cavidades ósseas provocadas experimentalmente em ratos. Para a realização deste estudo, foram utilizados 30 (trinta) ratos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar) divididos em 5 grupos experimentais: Grupo 1: controle; Grupo 2: Osso desmineralizado; Grupo 3: Osso desmineralizado associado à BMP (proteína morfogenética do osso); Grupo 4: Osso composto; Grupo 5: Osso composto associado à BMP. Após anestesia geral foram realizadas: incisão sobre a porção anterior da tibia dos animais, descolamento do tecido e duas áreas de osteotomia de 3mm de diâmetro cada uma. As cavidades foram preenchidas com o biomaterial conforme a divisão dos grupos e recobertas por membrana. Os tempos pós-operatórios foram 10, 20 e 30 dias. Foram realizadas análises histológica e histomorfométrica. Aos 20 e 30 dias, o osso composto promoveu melhor evolução da neoformação óssea do que o osso desmineralizado. Melhores resultados aos 10 e 20 dias foram observados com os materiais associados à BMP. A associação de BMP ao osso desmineralizado e ao osso composto melhorou a porcentagem de neoformação óssea nos períodos de 10 e 20 dias pós-operatórios. O osso desmineralizado e o osso composto são materiais biocompatíveis e com potencial osteocondutor.

UNITERMOS: Cirurgia bucal; Biomateriais; Substitutos ósseos; Implante dentário.

INTRODUÇÃO

Os materiais chamados substitutos ósseos constituem biomateriais que tem o objetivo de, ao serem utilizados, diminuir a morbidade que a obtenção do osso autógeno proporciona ao paciente^{3,7}. No entanto, as propriedades biológicas dos materiais homogêneos, heterogêneos e aloplásticos diferem dos autógenos por serem predominantemente osteocondutivos e não osteoindutivos ou osteogênicos como o osso autógeno².

Desta forma, os substitutos ósseos devem ser indicados em situações onde a neoformação óssea não deva ocorrer às suas expensas, como nos casos de preenchimento de cavidades onde há paredes ósseas remanescentes, para melhorar o contorno de rebordo ou ainda para proteger implantes parcialmente expostos e que apresentam a tábua óssea vestibular fenestrada². Nestas condições, os substitutos ósseos teriam sua expectativa de função plenamente coerente com o que apresentam de propriedade biológica.

1 - Cirurgião Dentista, Especialista em Implantodontia pela UNESP, Campus de Araçatuba

2 - Professora da UNIP de Araçatuba e da Faculdade de Odontologia de Santa Fé, Doutora pela UNESP, Campus de Araçatuba

3 - Professor Titular do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da UNESP de Araçatuba e Professor Titular do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia e Bauru, USP

Entre os substitutos ósseos heterógenos existentes no mercado nacional, encontra-se o osso desmineralizado, o osso mineralizado, o osso composto e a proteína óssea morfogenética, todos de origem bovina.

Os materiais de origem bovina constituem materiais teoricamente biocompatíveis^{4,5,8,10} e que devem ser estudados objetivando conhecer melhor suas propriedades biológicas já que são largamente utilizados na clínica.

O material é considerado desmineralizado quando a parte inorgânica do osso é removida e, conforme Urist¹¹ e Taga et al.¹⁰ são materiais que podem apresentar, dependendo do doador, potencial osteoindutivo devido a presença de fatores de crescimento solúveis no seu interior. Já o osso composto, apresenta partículas de osso desmineralizado, mineralizado e aglutinante natural de colágeno. Sua matriz inorgânica tem propriedade osteocondutora e física semelhantes à humana⁶.

Com relação às proteínas ósseas morfogenéticas, Urist¹² afirmou que o "pool" de BMP apresenta propriedade osteoindutiva já que sua presença estimula células mesenquimais indiferenciadas a se transformarem em osteoblastos.

Assim, este trabalho estudou microscopicamente a ação do osso desmineralizado bovino e do osso composto associados ou não à proteína óssea morfogenética utilizados em cavidades ósseas provocadas experimentalmente em ratos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização deste estudo, foram utilizados 30 (trinta) ratos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, *Wistar*), adultos, com peso médio de 250 gramas e provenientes do biotério da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, UNESP. Os animais foram alojados, em número de 5 (cinco) por gaiola, mantidos em temperatura ambiente com luz natural e alimentados com ração sólida a água *ad libitum* durante todo o período experimental.

Todos os animais receberam o mesmo tratamento cirúrgico e foram divididos em 5 (cinco) grupos experimentais: Grupo 1: controle; Grupo 2: Osso desmineralizado (Gen-ox[®] Baumer S.A.); Grupo 3: Osso desmineralizado associado à BMP; Grupo 4: Osso composto (Gen-tech[®] Baumer S.A.); Grupo 5: Osso composto associado à BMP.

Procedimentos Cirúrgicos

Os animais foram anestesiados por meio de injeção intraperitoneal de Pentobarbital Sódico a 3% (Hipnol, Fontoveter) com dose de 50 mg/kg de peso corporal do animal.

Na seqüência, realizou-se tricotomia dos membros posteriores dos animais e, após antisepsia da pele com polivinilpirrolidona iodada,

foram colocados sobre a mesa cirúrgica e cobertos com campos cirúrgicos estéreis.

Com o auxílio de bisturi montado com lâmina nº. 15, foram realizadas incisões longitudinais sobre as porções anteriores das tíbias envolvendo a pele, fascia muscular e periósteo. Após o descolamento do periósteo realizado com um descolador Molt, os tecidos foram afastados lateralmente, expondo a tibia. Utilizando uma ponta reta (Dabi Atlante) montada em micro-motor (Vector) e uma broca esférica carbide nº. 6, foram realizadas as cavidades ósseas, sempre sob irrigação externa abundante com soro fisiológico (Drogasil). Foram realizadas duas cavidades na parede ântero-medial de cada tibia para que o traumatismo cirúrgico fosse igual em todos os animais. As cavidades ósseas tinham, aproximadamente, 3mm de diâmetro e a cortical inferior da tibia não foi rompida em nenhum dos espécimes.

Na seqüência, as cavidades foram preenchidas com os biomateriais: matriz orgânica (Gen-ox[®] da Baumer S.A.), osso composto (Gen-tech[®] da Baumer S.A.) associados ou não à BMP (Gen-pro[®] da Baumer S.A.), conforme divisão citada anteriormente, e recoberta com membrana (Gen-derm[®] da Baumer S.A.). As suturas foram realizadas com fio mononylon 5-0 (Brasuture) .

Sacrifício dos animais

Os animais foram sacrificados aos 10, 20 e 30 dias após o procedimento cirúrgico por meio de inalação excessiva de éter sulfúrico.

Processamento laboratorial

Após obtenção das tíbias dos animais, as mesmas foram fixadas em formol neutro a 10% durante 24 horas e, na seqüência, lavadas em água corrente por mais 24 horas anteriormente a descalcificação em EDTA a 18%.

Após a descalcificação, as peças foram desidratadas, clarificadas e incluídas em parafina para serem realizados cortes semi-seriados com espessura de 6 micrometros no sentido longitudinal da peça. Os cortes obtidos foram colocados em lâminas de vidro e corados pela técnica da Hematoxilina e Eosina.

Análise microscópica e histomorfométrica

A avaliação microscópica foi realizada por meio de microscópio de luz binocular (Zeiss) procurando-se avaliar aspectos morfológicos do reparo ósseo da cavidade, a evolução do fechamento e a presença ou não do biomaterial, procurando-se comparar estes eventos entre os 5 (cinco) grupos experimentais.

A avaliação histomorfométrica foi realizada utilizando a grade de Merz, que foi superposta aos cortes histológicos, sempre com aumento original de 25x, sendo computada a quantidade de espículas ou trabéculas ósseas que coincidiam com os pontos

definidos pela grade utilizada. Como a grade define 100 pontos de análise, foi possível obter a porcentagem de neoformação óssea em cada período dos grupos experimentais examinados, por meio da média aritmética dos resultados obtidos.

RESULTADOS

Análise microscópica

Grupo Controle

Aos 10 dias, foi observada solução de continuidade da cortical externa e neoformação óssea intensa a partir das paredes da cavidade (Figura 1).

Após 20 dias, a cortical externa encontrava-se invariavelmente reparada com a cavidade preenchida por trabéculas ósseas mais organizadas e espessas (Figura 2).

Aos 30 dias, as cavidades ósseas estavam totalmente reparadas com trabéculas ósseas definidas (Figura 3).

Grupo Osso desmineralizado

Aos 10 dias, foi possível observar o material circundado por infiltrado inflamatório agudo com predominância de neutrófilos polimorfonucleares e neoformação óssea incipiente à partir das paredes ósseas da cavidade, inclusive da cortical externa da tibia (Figura 4).

Aos 20 dias, foi evidenciada a presença de grande quantidade do material no espaço medular e neoformação óssea, ainda incipiente (Figura 5).

Aos 30 dias, não se observou partículas do material e a cortical externa encontrava-se totalmente reparada (Figura 6).

Grupo osso desmineralizado associado à BMP

Aos 10 dias, observou-se neoformação óssea mais organizada, sendo que, em alguns espécimes, a cortical externa encontrava-se com neoformação mais definida. Partículas do material reparador espalhado

por toda a cavidade, neutrófilos polimorfonucleares próximos ao material e espículas ósseas neoformadas puderam ser observados (Figura 7).

Entre 20 e 30 dias, os aspectos morfológicos eram semelhantes, sendo observado fechamento de toda a cortical externa do defeito ósseo e pouca presença de material aos 20 dias e ausência de material aos 30 dias (Figura 8).

Grupo Osso composto

Aos 10 dias, observou-se a cortical externa com solução de continuidade e presença de grande quantidade de material junto a superfície da cavidade ou no espaço medular. A neoformação óssea da cavidade era evidenciada das paredes ósseas para o centro e as partículas do material estavam envolvidas por células inflamatórias com predominância de neutrófilos polimorfonucleares (Figura 9).

Aos 20 dias, observou-se evolução do fechamento da cortical externa da cavidade óssea e o material ainda envolvido por células inflamatórias. Não havia neoformação óssea em contato com o material (Figura 10).

Após 30 dias, as cavidades encontravam-se reparadas e era possível observar algumas partículas do material na cavidade, em contato com o tecido ósseo neoformado (Figura 11).

Grupo osso composto associado à BMP

Aos 10 dias, observou-se na maioria dos espécimes melhor organização da neoformação óssea da cortical externa e trabéculas ósseas bem desenvolvidas no interior da cavidade (Figura 12).

Aos 20 dias, foram observadas aspectos morfológicos semelhantes aos encontrados aos 10 dias, com melhor desenvolvimento das trabéculas da cavidade (Figura 13).

Observou-se algumas partículas de material junto a medula óssea com tecido ósseo neoformado em contato direto. E após 30 dias, notou-se a cortical externa completamente fechada e o material com contato direto com tecido ósseo neoformado e sem presença de células inflamatórias (Figura 14).

Resultado Histomorfométrico

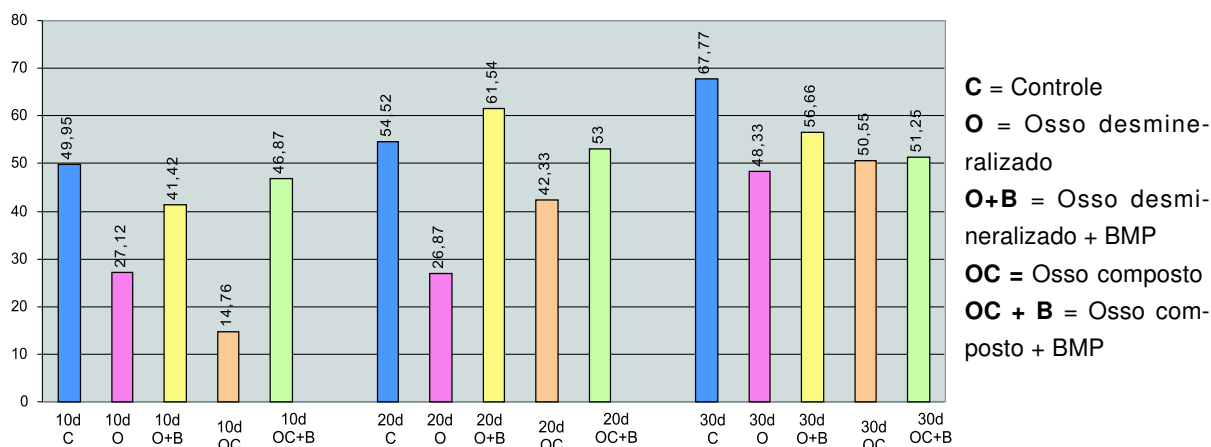


FIGURA 15 – Porcentagem da neoformação óssea em cada um dos grupos

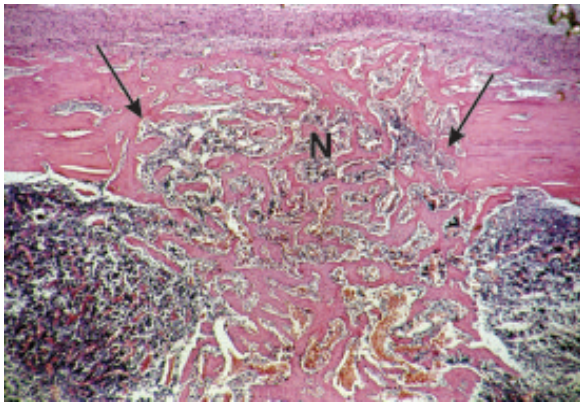


FIGURA 1 - Grupo controle - Cortical externa em reparo. Áreas de osteotomia (setas). Neoformação óssea (N)

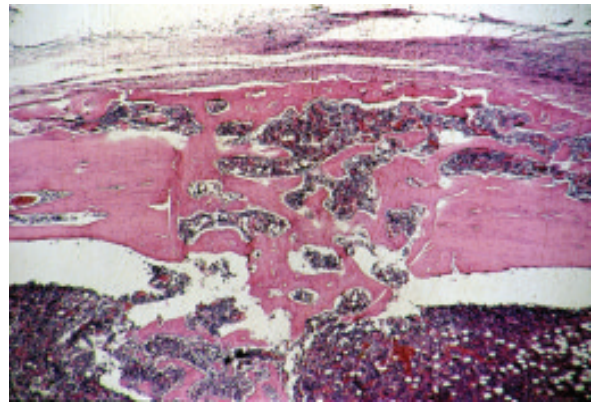


FIGURA 2 - Grupo controle - Trabeculado ósseo mais organizado e espesso na área de reparo.

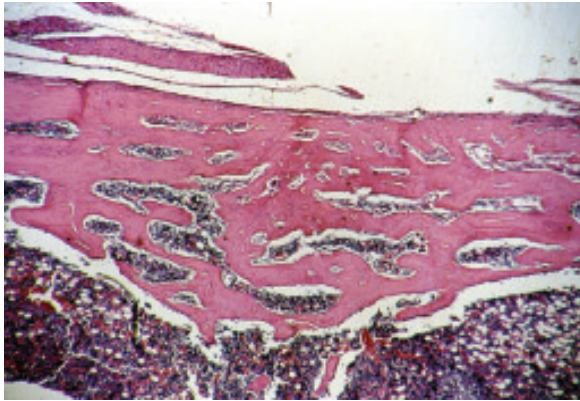


FIGURA 3 - Grupo controle - Cortical óssea reparada.

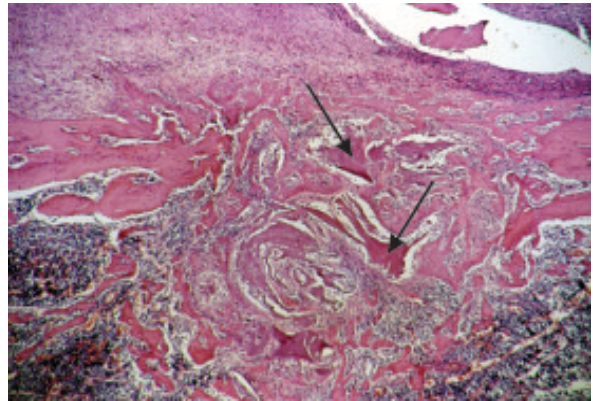


FIGURA 4 - Grupo osso desmineralizado - Partículas de osso desmineralizado circundado por infiltrado inflamatório (setas).

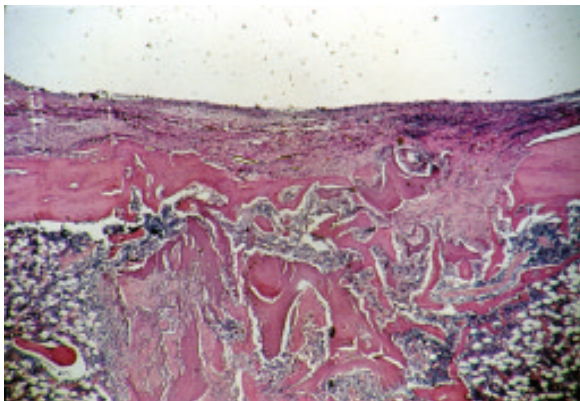


FIGURA 5 - Grupo osso desmineralizado - Material ainda presente no espaço medular.

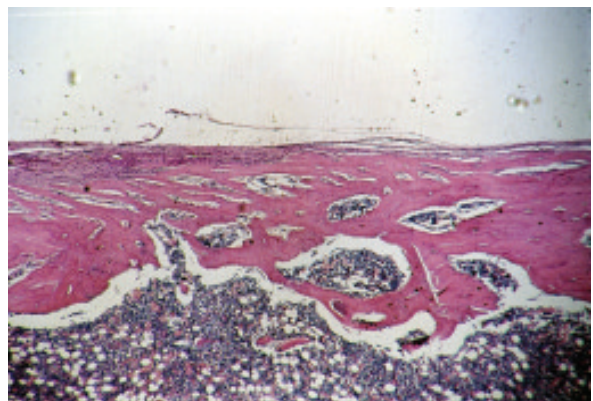


FIGURA 6 - Grupo osso desmineralizado - Cortical reparada e ausência de partículas do biomaterial.

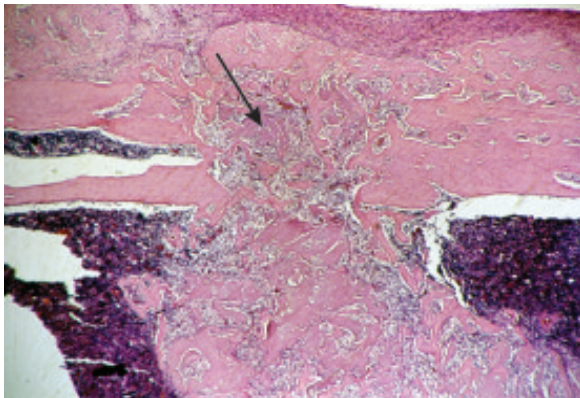


FIGURA 7 - Grupo osso desmineralizado + BMP - Partículas do material imerso em áreas de neoformação óssea organizada (seta).

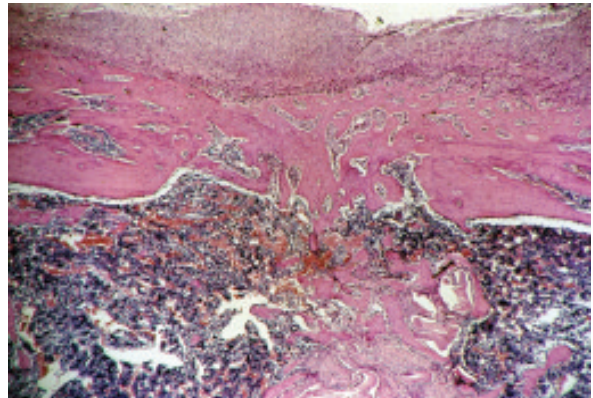


FIGURA 8 - Grupo osso desmineralizado + BMP - Cortical reparada e ausência de partículas do biomaterial.

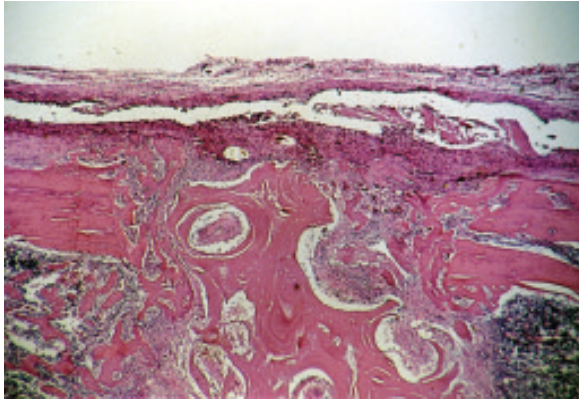


FIGURA 9 - Grupo osso composto - Formação óssea concêntrica na área de osteotomia.

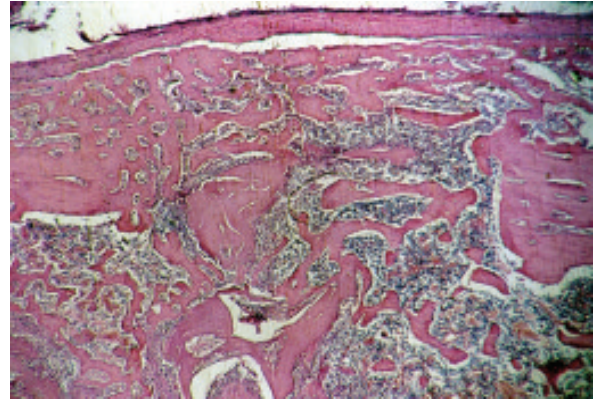


FIGURA 10 - Grupo osso composto -Infiltrado inflamatório ao redor das partículas do biomaterial.

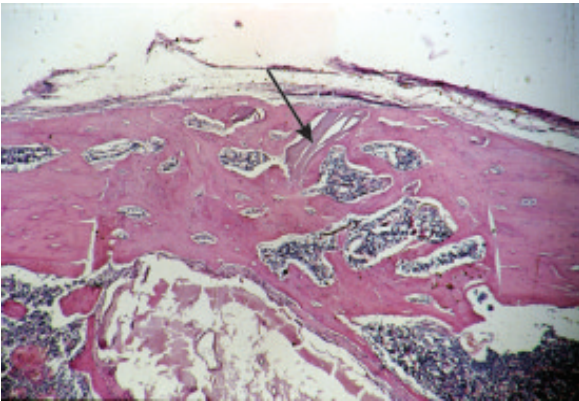


FIGURA 11 – Grupo osso composto -Partículas de material incluído na cortical reparada (seta).

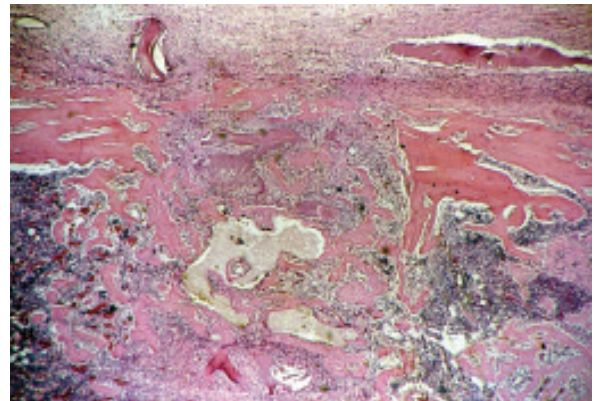


FIGURA 12 – Grupo osso composto + BMP - Trabeculado ósseo organizado na área de reparo.

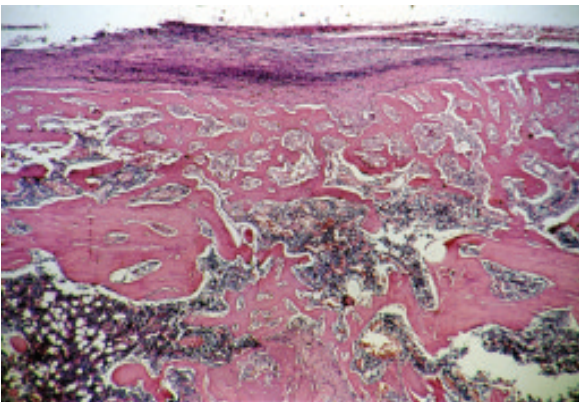


FIGURA 13 – Grupo osso composto + BMP -Trabéculas ósseas mais desenvolvidas.

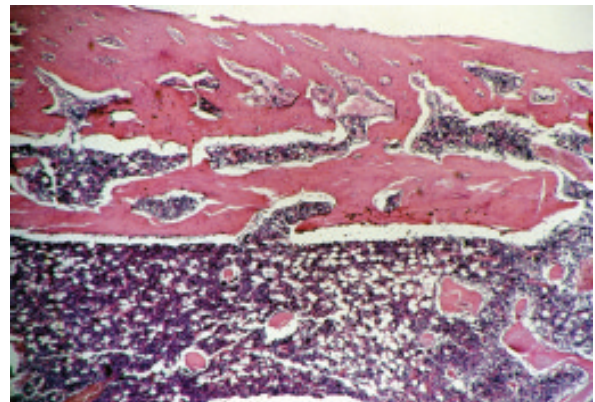


FIGURA 14 - Grupo osso composto + BMP - Cortical reparada. Partículas do material imersas na medula óssea.

DISCUSSÃO

A aplicação dos biomateriais classificados como substitutos ósseos em situações clínicas tem de obedecer a um planejamento com relação aos resultados que se pretende obter. Não se deve exigir respostas biológicas que os biomateriais não proporcionam. E este é o ponto fundamental das pesquisas experimentais, ou seja, proporcionar o conhecimento das respostas biológicas dos diversos materiais que estão à disposição no mercado e aplicá-los de forma consciente em situações clínicas.

Muito embora o osso desmineralizado tenha sido utilizado em diversas pesquisas experimentais

e aplicado clinicamente, é importante a comprovação científica de sua ação. Urist¹¹ e Taga et al.¹⁰ afirmaram que este material pode apresentar potencial osteoindutivo devido a presença de fatores de crescimento solúveis no seu interior. Com a metodologia empregada neste trabalho, não foi possível confirmar esta afirmação porque o estudo da osteoindução, para ser comprovado, necessitaria de um sítio diferente de uma cavidade óssea onde, salvo em defeitos críticos, haverá o reparo ósseo promovido pelas células osteoprogenitoras locais.

No entanto, é possível afirmar que trata-se de material biocompatível e que permite que o tecido ósseo neoformado tenha contato com suas

partículas, o que caracteriza atividade osteocondutora. Este quadro é possível de ser observado nos cortes histológicos onde há partículas de osso desmineralizado junto a medula óssea e aos 20 dias na porção mais superficial da cavidade.

Quanto a ausência do material no tempo de 30 dias, não é possível afirmar que as partículas foram reabsorvidas porque nos tempos anteriores (10 e 20 dias) não haviam osteoclastos presentes. Muito provavelmente elas tenham sido expulsas da cavidade à medida que ocorria a neoformação óssea.

Entre os grupos estudados, a avaliação histomorfométrica mostrou que foi o grupo que apresentou os piores resultados de neoformação óssea: 27,12% aos 10 dias, 26,87% aos 20 dias e 48,33% aos 30 dias.

O osso composto apresentou partículas de osso desmineralizado e mineralizado sendo que estas últimas proporcionam uma ação osteocondutora segundo Peetz⁶. De acordo com Sicca⁹ este biomaterial associa a capacidade osteocondutora da matriz inorgânica com a capacidade osteoindutora da matriz orgânica visando otimizar o reparo ósseo, e está potencialmente indicado na qualidade de substituto ósseo em cirurgias de levantamento de seio maxilar porque promove neoformação óssea similar ao autógeno.

Os resultados da microscopia de luz obtidos neste trabalho, permitem afirmar que o osso composto tem uma ação mais positiva com relação ao material desmineralizado, pois aos 20 dias, a cortical externa da tíbia dos espécimes apresentava melhor evolução e havia neoformação óssea mais ativa, notadamente nos períodos de 20 e 30 dias. A afirmação de melhor resultado no item neoformação óssea fica evidente quando comparados os resultados histomorfométricos dos grupos do osso desmineralizado com o grupo do osso composto.

Quando os materiais foram associados com a BMP, a neoformação óssea foi acentuadamente melhorada principalmente nos períodos de 10 e 20 dias. Esta acentuada melhora deveu-se, provavelmente, ao potencial osteoindutor do "pool" de BMP. Nossos resultados, demonstraram que nos grupos em que houve associação com a BMP, estão de acordo com os valores obtidos por Allegrini Junior et al.¹ que conseguiram um aumento de 30% de neoformação óssea quando a um biomaterial composto era adicionado o "pool" de BMP.

Outro dado importante, referente a associação da BMP aos biomateriais em-pregados neste trabalho foi o período em que ocorreu acentuada melhora da neoformação óssea, que foi observada nos períodos 10 e 20 dias pós-

operatórios, que coincidiam com a atividade de diferenciação tecidual e neoformação óssea.

Quando o Grupo controle (sem biomaterial) foi comparado com os grupos experimentais, observou-se que os resultados de neoformação óssea eram sempre melhor neste grupo. Este achado deve-se ao fato de que o reparo de uma cavidade ou defeito ósseo ser sempre retardado em sua cronologia quando são utilizados materiais no interior da cavidade ou defeito ósseo. Este fato se deve a presença, ao redor dos materiais, de infiltrado inflamatório agudo com predominância de neutrófilos polimorfonucleares.

No entanto, é importante que se entenda que em algumas situações clínicas onde se deseja a manutenção da espessura e volume alveolar ou mesmo em levantamentos de assoalho de seio maxilar, o uso de biomateriais classificados como substitutos ósseos podem ser uma opção, respeitando-se os limites biológicos que o material apresenta, e obedecendo rigidamente suas indicações

CONCLUSÃO

- O osso desmineralizado e o osso composto são materiais biocompatíveis e com potencial osteocondutor;

- A associação da BMP ao osso desmineralizado ou ao osso composto melhorou a porcentagem de neoformação óssea nos períodos de 10 e 20 dias pós-operatórios.

ABSTRACT

The aim of this study was to histological and histometric assess the osseous repairing potential and the properties of heterogenous demineralized bone and compound bone with and without BMP implanted in cavities prepared in rat tibias after 10, 20 and 30 days. To accomplish this objective, 30 rats were used. After general anesthesia, incision and tissue division, 2 cavities of approximately 3mm diameter were made in each tibia. The cavities closer to the joint were filled in by clot (control) and the faraway ones received the materials. After 20 and 30 days, the group of compound bone was better results like heterogenous demineralized bone. However, at 10 days the results were better when was used BMP in association with heterogenous demineralized bone and compound bone. Similar results were obtained after 20 and 30 days. Thus, it was possible to conclude that the materials were biocompatible and osteoconductive. Besides that, compound bone favored new bone formation earlier than heterogenous demineralized bone and both had better results when in association with BMP.

UNITERMS: *Oral surgery; Biocompatible materials; Bone substitutes; Dental implantation.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Allegrini Junior S, Yoshimoto M, Salles M.B, Konig Junior B. The effects of bovine BMP associated to HA in maxillary sinus lifting in rabbits. *Ann Anat.* 2003; 185(4): 343-9,
- 2 - Carvalho PSP, Bassi APF, Pereira LAV. Revisão e proposta de nomenclatura para os biomateriais. *Implant News.* 2004; 1(3): 255-60.
- 3 - Joshi A. An investigation of pos-operative morbidity following chin graft surgery. *Br Dent J.* 2004; 196(4): 215-8.
- 4 - Oliveira RC, Sicca CM, Silva TL, Cestari TM, Kina JR, Oliveira DT, Buzalaf MAR, Taga R, Taga EM, Granjeiro JM. Avaliação histológica e bioquímica da resposta celular ao enxerto de osso cortical bovino previamente submetido a altas temperaturas: efeito da temperatura no preparo do osso xenógeno. *Rev Bras Ortop.* 2003; 38(9): 551-60.
- 5 - Oliveira RC, Sicca CM, Silva TL, Cestari TM, Oliveira DT, Buzalaf MAR, Taga R, Taga EM, Granjeiro JM. Efeito da temperatura da desproteinização no preparo de osso cortical bovino microgranular: avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular em subcutâneo de ratos. *Rev Fac Odontol Bauru.* 1999; 7(¾): 85-93.
- 6 - Peetz M. Characterization of xenogenic bone material. In: Boyne PJ. *Osseous reconstruction of the maxilla and the mandible: surgical techniques using titanium mesh and bone mineral.* Chicago: Quintessence; 1997. p.87-100.
- 7 - Raghoebar GM, Louwerse C, Kalk WWI, Vissink A. Morbidity of chin bone harvesting. *Clin Oral Implant Res.* 2001; 12(5): 503-14.
- 8 - Sicca CM, Oliveira RC, Silva TL, Cestari TM, Oliveira DT, Buzalaf MAR, Taga R, Taga EM, Granjeiro JM. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular a enxertos de osso cortical bovino em subcutâneo de ratos: efeito do tamanho da partícula. *Rev Fac Odontol Bauru.* 2000; 8(1/2): 1-10.
- 9 - Sicca CM. Análise tomográfica e histomorfométrica comparativa entre enxerto ósseo autógeno e enxerto ósseo xenogênico em cirurgia de levantamento de seio maxilar em coelhos. 2005. 61f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
- 10 - Taga R, Cestari TM, Silva TL, Stipp ACM. Reparo de defeito ósseo perene em crânio de cobaia pela aplicação de osseobond. *Rev Bras Implant.* 1997; 3(1):13-20.
- 11 - Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science.* 1965;150(698): 893-9.
- 12 - Urist MR, Lietze A, Dawson E. Beta-tricalcium phosphate delivery system for bone morphogenetic protein. *Clin Orthop Relat Res.* 1984;(187), p.277-80.

Endereço para correspondência:

Daniela Ponzoni
 Rua São Marcos, 91 apto.04
 CEP 16015-280 - Araçatuba - SP
 Fone: (18) 3622-5822
 E-mail: dponzoni@ig.com.br

Recebido para publicação em 03/05/2005
 Enviado para análise em 11/05/2005
 Aprovado para publicação em 06/03/2006