

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA REPARAÇÃO DE DEFEITOS ÓSSEOS CRÍTICOS TRATADOS COM ENXERTOS XENÓGENOS: ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS

Davi Silva Carvalho Curi¹; Viviane Almeida Sarmiento²; Bruno Botto de Oliveira³; Dario Augusto Oliveira Miranda⁴

1. Bolsista PIBIC, Graduando em Odontologia, Universidade Federal da Bahia, e-mail: davidabahia@msn.com
2. Orientador, Departamento de Propedêutica e Clínica Integrada, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia; Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: viviane.sarmiento@gmail.com
3. Mestre em Odontologia, Universidade Federal da Bahia, e-mail: bbotto81@gmail.com
4. Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: darioperiodonto@hotmail.com

PALAVRAS-CHAVE: Defeito ósseo, biomateriais, engenharia tecidual

INTRODUÇÃO

O tecido ósseo apresenta grande potencial de regeneração, entretanto em casos de perdas extensas, isso pode não acontecer. Dessa forma, materiais que substituam o tecido ósseo perdido ou que estimulam sua neoformação têm sido extensivamente testados, principalmente quanto à sua biocompatibilidade e potencial regenerador. O substituto ósseo ideal deve ser biocompatível e gradualmente substituído por novo tecido ósseo, além de possuir propriedade osteoindutiva ou osteocondutiva (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Os enxertos ósseos podem ser obtidos a partir de diferentes origens: autógenos (do próprio indivíduo), enxertos alogênicos (provenientes de banco de ossos liofilizados de cadáveres humanos), xenógenos (derivados de osso de outros animais) e aloplásticos. Os enxertos autógenos são considerados “padrão ouro”, no entanto, o principal problema relacionado à utilização desse material é a morbidade que acomete o paciente Orr *et al.* (2001), assim como a quantidade limitada de material coletado Schimming & Schmelzeisen, (2004). Tentando superar estes obstáculos, pesquisas foram dirigidas para a obtenção de um substituto adequado para o enxerto ósseo autógeno. Nesta linha, os enxertos xenógenos (colhidos de espécies de animais não humanas) têm sido usados. Tipicamente são usadas espécies bovinas. Tais materiais têm sido utilizados com sucesso para preservar o osso no local pós-extração.

No mercado já encontram-se disponíveis diferentes marcas comerciais de enxertos ósseos xenógenos, embora sejam escassos os trabalhos na literatura que tenham testado o comportamento desses biomateriais, quanto à sua biocompatibilidade e potenciais osteoindutor e osteocondutor. O presente trabalho tem por objetivo avaliar a resposta biológica e o poder indutor de dois diferentes tipos de matriz óssea orgânica bovina em defeitos ósseos produzidos na calvária de ratos, por meio de análise histológica.

MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto desta pesquisa foi aprovado para execução pelo Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Estadual de Feira de Santana (fevereiro/2009). Foram utilizados quarenta e cinco ratos Wistar, machos, com peso inicial médio entre 300 e 350 gramas, divididos equitativamente em três grupos: **Grupo A** – Tratamento do defeito ósseo com Bio-oss® (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland); **Grupo B** – Tratamento do defeito

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

ósseo com Gen-ox Inorg® (Baumer, São Paulo, Brasil); e **Grupo C**- Nenhum tratamento do defeito ósseo (grupo controle).

Inicialmente, os animais foram alojados em gaiolas individuais, onde receberam ração comercial (Purina Labina™) uma vez ao dia e água ad libidum. Antes do confinamento, os animais receberam uma dose única de 0,2 ml de ivermectina. Foram monitorados quanto a sinais de infecção e desconforto pré e pós-cirúrgico até a sua morte. Após jejum de 12 horas, os animais foram medicados com sulfato de atropina, na dose de 0,44 mg/100g por via subcutânea, e anestesiados com hidrato de cloral 10%, por via intra-peritonial. Em seguida, os animais foram posicionados em decúbito ventral e então realizou-se tricotomia na região do crânio, anti-sepsia da área cirúrgica com álcool iodado e anestesia local infiltrativa com xilocaína a 2% com epinefrina 1:50.000 (Merrel Lepetit Farmacêutica e Indústria Ltda). Foi realizada uma incisão cutânea na linha média que se estendeu da protuberância occipital externa até a altura dos olhos. O tecido subcutâneo foi divulsionado e os músculos temporais e interescutulares afastados. O periósteo foi incisado e afastado. O campo operatório foi mantido por meio de dois afastadores Senn-Miller.

Os defeitos foram confeccionados com broca trefina, de forma padronizada, e preenchidos ou não com materiais específicos, a depender do grupo experimental ao qual pertenciam. Os animais foram sacrificados em dois diferentes tempos (30 e 60 dias). As calvárias dos ratos foram fixadas em solução de paraformaldeído tamponado a 4% até a avaliação. Após a fixação, foram descalcificados, com ácido nítrico 5% por duas horas, desidratadas e incluídas em parafina para confecção de cortes histológicos de 5µm de espessura. As lâminas foram coradas pela técnica HE. A análise histológica foi realizada por microscopia de luz (Microscópio Nikon Eclipse E600 acoplado a uma câmera digital Nikon DW100, Nikon, Yohohama, Japan), com ampliações de x4, x10 e x 20. Foi realizada uma avaliação qualitativa e semi-quantitativa da tolerabilidade local e desempenho do biomaterial testado. Na avaliação histológica foi pesquisada a presença de necrose, reação inflamatória, tecido fibroso, neoformação óssea, angiogênese, células gigantes. A avaliação histológica foi registrada com base numa escala de quatro escores: 0= ausente, 1= leve, 2= moderada, 3= severa.

Os dados foram anotados em fichas específicas e submetidos à análise estatística (Empregou-se o teste do Qui-quadrado para avaliar a associação entre as variáveis, para uma probabilidade de erro de 5%).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A formação óssea é um processo coordenado envolvendo vários fatores biológicos (HUANG *et al.*, 2005). Muitos fatores de crescimento/ citocinas expressados durante o desenvolvimento do esqueleto fetal são induzidos em resposta a injúrias e possuem um papel importante no processo de reparo ósseo. Nota-se, portanto, a importância do preenchimento do defeito com coágulo sanguíneo, favorecendo o seu íntimo contato com as paredes do defeito e com células osteoprogenitoras.

A análise dos resultados histológicos obtidos para o grupo controle mostrou que não houve o completo reparo ósseo do defeito ao longo do período analisado. Microscopicamente, observa-se que a neoformação óssea analisada no grupo controle, restringiu-se à borda do defeito para o período de 30 dias (figura 1), mantendo os mesmos padrões para o período de

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

60 dias após o procedimento cirúrgico, associada a uma pequena quantidade de osteoblastos na periferia, corroborando com os achados de Mokbel *et al.* (2008) e Develioglu, Unver Saraydin & Kartal (2009).

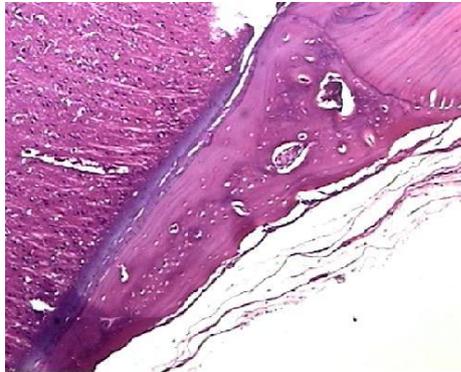


Figura 1: Corte histológico corado por HE (aumento aproximado de 40x). Grupo controle (30 dias). Observa-se neoformação óssea na margem do defeito.

Ao serem avaliados os aspectos que indicam a efetivação do processo de reparo ósseo, pode-se observar padrões bem semelhantes de inflamação, edema e hiperemia entre os grupos Bio-oss e Gen-ox, para os períodos analisados. Para o grupo tratado com Bio-oss, no período de 30 dias após o procedimento cirúrgico um grau severo de hiperemia, inflamação e um grau moderado de edema foi constatado ao longo de todo o defeito ósseo, diferentemente dos resultados apresentados por Schelegel *et al.* (2003), Tapety *et al.* (2004) e Lioubavina-Hack *et al.* (2005). Entretanto após 60 dias, notou-se uma redução destes parâmetros. Para o grupo Gen-ox, os presentes achados são confirmados pelo estudo de Zambuzzi *et al.* (2005), os quais demonstraram a presença de células inflamatórias crônicas nos mesmos períodos aqui empregados (Figura 2).

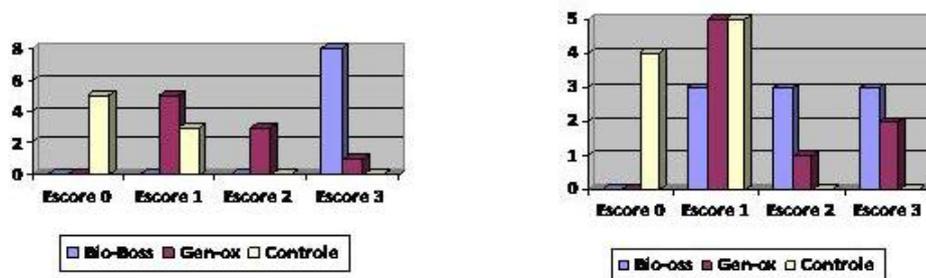


Figura 2: Grau de inflamação no período de 30 dias (a esquerda) e 60 dias (a direita), para os grupos testados.

Aliado a presença de muitas células inflamatórias no local do defeito, verifica-se a presença de muitas células gigantes multinucleadas, sendo esta em maior frequência no grupo Bio-oss, em comparação com os demais. Nota-se, sobretudo sua presença em íntimo contato com as partículas de enxerto, no primeiro período experimental e uma redução deste aspecto durante o segundo tempo estudado. Embora, a maioria dos estudos da literatura não demonstre a presença de células multinucleadas associadas à implantação de enxertos do grupo Bio-oss, alguns estudos demonstram a presença de tais componentes, mesmo que de forma branda durante o processo de reparo ósseo, quando utilizado o material do grupo Gen-ox (ZAMBUZZI *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

A neoformação óssea foi observada ao longo de todo o defeito, sobretudo na periferia do defeito, aos 30 dias, em todos os grupos experimentais Bio-oss e Gen-ox. Entretanto, constatou-se que aos 60 dias após o procedimento cirúrgico o processo de reparação óssea apresentava-se pouco diferente do quadro inicial, não demonstrando grande evolução entre os períodos. Nos grupos Bio-oss e Gen-ox, observam-se ilhas de osso neoformado no centro do defeito e associado às margens do mesmo (figura 3).

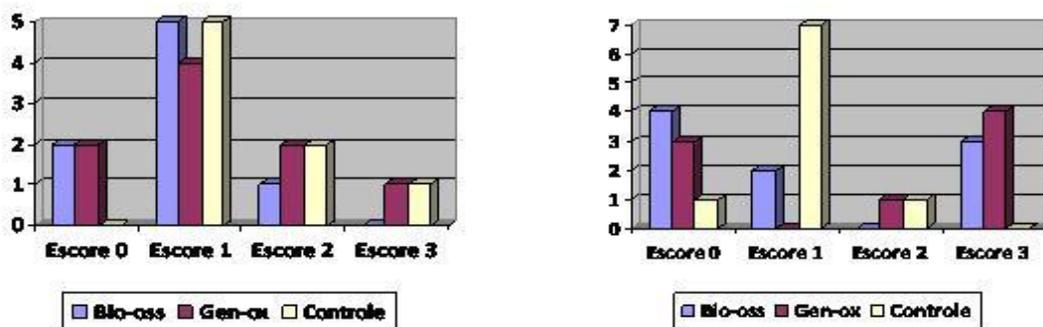


Figura 3: Grau de neoformação nos período de 30 dias (a esquerda) e 60 dias (a direita), para os grupos testados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os materiais em estudo determinaram importantes alterações inflamatórias, que tenderam a diminuir com o tempo, sendo o enxerto Bio-oss o que determinou alterações mais intensas. Esse estudo impõe a necessidade de novas investigações com maiores tempos de sacrifício, a fim de se determinar o comportamento tecidual em longo prazo, frente aos materiais testados, assim como para avaliar o desempenho de outros materiais comercializados.

REFERÊNCIAS

- DEVELIOGLU, UNVER SARAYDIN e KARTAL. The bone-healing effect of a xenograft in a rat calvarial defect model. *Dental Materials Journal.*, v.28, n.4, p.396-400, 2009.
- HUANG, Y. et al. In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials.*, v.26, n.36, p.7616-7627, 2005.
- LIUBAVINA-HACK, N. et al. Effect of Bio-oss with or without platelet-derived growth factor on bone formation by “guided tissue regeneration”: a pilot study in rats. *J Clin Periodontol*, v.32, n.12, p.1254-1260, 2005.
- MOKBEL, N et al. Healing patterns of critical size bony defects in rat following bone graft. *Oral Maxillofac Surg*, v. 12, n.2, p.73-78, 2008.
- OLIVEIRA, R.C. et al. Avaliação histológica e bioquímica da resposta celular ao enxerto de osso cortical bovino previamente submetido a altas temperaturas. Efeito da temperatura no preparo de enxerto xenógeno. *Rev. Bras. Ortoped*, v. 38, n. 9, p. 551-560, Set, 2003.
- ORR, T.E. et al. Compressive properties of cancellous bone defects in rabbit model treated with particles of natural bone mineral and synthetic hydroxyapatite. *Biomaterials*, v.22, n.14, p.1953-1959, 2001.
- SCHIMMING, R.; SCHELZEISEN, R. Tissue engineered bone for maxillary sinus augmentation. *J Oral Maxillofac Surg.*, v.62, n.6, p.724-729, June, 2004.
- SCHLEGEL, K. A. et al., Histologic findings in sinus augmentation with autogenous bone chips versus a bovine bone substitute. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, v. 18, n. 1, p. 53-8, jan./feb., 2003.

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

TAPETY, F.I. et al. A histological evaluation of the involvement of Bio-Oss in osteoblastic differentiation and matrix synthesis. *Clin Oral Implants Res.* v.15, n.3, p.315-24, 2004.

ZAMBUZZI, W.F.; OLIVEIRA, R.C.; GRANJEIRO, J.M. Avaliação bioquímica de xenoimplantes em subcutâneo de rato. *Cienc Odontol Bras*, v.9, n.4, p.44-51, out/dez 2006.