

**Rubens Jorge Silveira**

**REPARO ÓSSEO UTILIZANDO  
ENXERTO DE MATRIZ ORGÂNICA  
BOVINA. ANÁLISE HISTOLÓGICA EM  
CALVÁRIA DE COELHOS**

**Uberlândia  
2007**

Rubens Jorge Silveira

**REPARO ÓSSEO UTILIZANDO  
ENXERTO DE MATRIZ ORGÂNICA  
BOVINA. ANÁLISE HISTOLÓGICA EM  
CALVÁRIA DE COELHOS**

**Orientadora: Profa. Dra. Paula Dechichi  
Co-Orientador: Prof. Dr. Darceny Zanetta-Barbosa**

**Banca Examinadora:  
Profa. Dra. Paula Dechichi  
Prof. Dr. Darceny Zanetta-Barbosa  
Prof. Dr. Christiano Marinho Correia  
Prof. Dr. Robson Rodrigues Garcia**

**Uberlândia  
2007**

### **Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

**S587r**

Silveira, Rubens Jorge, 1975-  
Reparo ósseo utilizando enxerto de matriz orgânica bovina: análise histológica em calvária de coelhos / Rubens Jorge Silveira. - 2007. 40 f.: il.

Orientadora: Paula Dechichi.

Co-orientador: Darceny Zanetta-Barbosa.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Inclui bibliografia.

1. Odontologia operatória - Teses. I. Dechichi, Paula. II. Zanetta-Barbosa, Darceny. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

**CDU: 616.314 – 089**

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

**A comissão julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Odontologia, em sessão pública realizada em 23 de abril de 2007, considerou o candidato Rubens Jorge Silveira.**

- 1. Prof<sup>ª</sup>. Dra. Paula Dechichi (orientadora)\_\_\_\_\_**
- 2. Prof. Dr. Darceny Zanetta-Barbosa (co-orientador)\_\_\_\_\_**
- 3. Prof. Dr. Christiano Marinho Correia\_\_\_\_\_**
- 4. Prof. Dr. Robson Rodrigues Garcia\_\_\_\_\_**

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a minha mãe, **Lélia Jorge da Silveira** pela incansável e incontestável luta ao longo dos meus anos de estudo; sempre me dando o apoio de que necessitei; fica aqui todo o meu reconhecimento.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a **DEUS** por estar sempre ao meu lado, me dando forças para lutar e alcançar meus objetivos; sem ele este trabalho não seria possível.

A minha orientadora **Prof<sup>ª</sup> Dra. Paula Dechichi**, o exemplo, hierárquica no ponto certo, reconhecendo as fases difíceis pela qual passei, no entanto, nunca desistiu de incentivar e orientar o meu muito obrigado.

Ao amigo **Prof. Caio Lúcio Marinho Correia** coordenador do Curso de Odontologia da UNITRI pela estada em Uberlândia numa fase muito difícil, o meu eterno agradecimento.

Aos Professores do Mestrado Acadêmico de Odontologia, pelo incentivo ao longo do curso.

Aos **Professores Doutores Marcelo Beletti e Cláudia Jordão** pelas correções e sugestões durante a qualificação.

Aos amigos do Mestrado **Weuler, Tatiane, Júlio e Daniel** pelas inúmeras viagens realizadas ao longo do curso, motivação e descontração sempre.

Ao amigo e Mestre **Jonas** pelo apoio durante a fase experimental do trabalho, o meu reconhecimento total pela sempre contribuição. Um grande abraço.

As alunas da Graduação da Faculdade de Odontologia da UFU, **Flaviana Soares Rocha e Lara Maria Alencar Ramos**, pelo apoio incondicional na fase experimental do trabalho.

À secretária da pós-graduação **Abigail Maria da Silva Alves** pela simpatia e educação no trato dos alunos.

Aos técnicos e funcionários do Hospital Veterinário da UFU, em nome do **Sr. João** pela ajuda no trato dos animais.

A todos os quais não mencionei, mas que sabem o quanto contribuíram para realização deste trabalho.

Aos mentores **Christiano Marinho Correia, Eurípedes de Oliveira Marinho e Marco Aurélio de Oliveira Marinho**, exemplos como profissionais, pessoa e incentivadores desde a graduação. O meu reconhecimento sempre.

Ao amigo e colega de profissão **Prof. Dr. José Luiz Rodrigues Leles**, simplesmente você é uma personalidade ímpar.

Ao amigo e também colega de profissão **Prof. Dr. Robson Rodrigues Garcia**, pela oportunidade e por acreditar na minha carreira de docente. O meu reconhecimento sempre.

Ao amigo **Prof. Dr. Elio Hitosh Shinohara** pelo apoio incondicional durante o levantamento bibliográfico.

Mais uma vez aos amigos José Luiz Rodrigues Leles, Robson Rodrigues Garcia e João Milanez, pela confiança e pela oportunidade de trabalhar em equipe, um grande abraço.

Aos meus alunos de Graduação em Odontologia da Universidade Paulista (UNIP/Campus Flamboyant Goiânia-Goiás) o motivo pelo qual buscamos o conhecimento a todo o momento.

Ao Hospital Central da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo-SP pela formação com Cirurgião Bucomaxilofacial. Agradeço em nome do Dr. Ronaldo de Freitas Professor Instrutor e Chefe do Setor de Cirurgia Bucomaxilofacial da Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo.

## SUMÁRIO

LISTAS DE ABREVIATURAS (SIGLAS) E SÍMBOLOS	01
RESUMO	02
ABSTRACT	03
1. INTRODUÇÃO	04
2. REVISÃO DE LITERATURA	06
2.1 TECIDO ÓSSEO	06
2.2 REPARO E ENXERTOS ÓSSEOS	08
2.3 MATRIZ ÓSSEA BOVINA	11
3. PROPOSIÇÃO	15
4. MATERIAL E MÉTODO	16
4.1 ANIMAIS	16
4.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	16
4.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA	19
5. RESULTADOS	20
5.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA	20
6. DISCUSSÃO	27
7. CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
ANEXO	39



## LISTA DE ABREVIATURAS (SIGLAS) E SÍMBOLOS

BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i> (proteína morfogenética óssea). Observação: a letra em minúsculo que muitas vezes aparece antes, refere-se à origem da BMP, assim bBMP é de origem bovina, hBMP, de origem humana e rhBMP é recombinante humana, ou seja, obtida por engenharia genética.
BMU	<i>Bone Multicelular Unit</i> (unidade óssea multicelular)
DBM	<i>Demineralized Bone Matrix</i> (matriz óssea desmineralizada)
DFDBA	<i>Desmineralized Freezed Dried bone allografts</i> (osso alógeno desmineralizado seco e congelado)
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetracético
FDBA	<i>Freezed Dried Bone Allografts</i> (osso alógeno seco e congelado)
HA	Hidroxiapatita
HE	Hematoxilina e Eosina
Kg	Kilograma
M	Molar
mm	Milímetros
mg	Miligrama
OP	<i>Osteogenic Protein</i> (proteína osteogênica)
%	Porcentagem
µm	Micrômetro
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (solução salina tamponada com fosfato)
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
®	Marca Registrada

## RESUMO

A matriz óssea bovina tem sido utilizada como enxerto para favorecer a regeneração óssea e reduzir a necessidade de osso autógeno. O presente estudo teve como objetivo analisar o processo de reparo ósseo em calvária de coelho, utilizando enxerto de matriz óssea orgânica bovina cortical e medular. Foram utilizados 20 coelhos sendo em cada animal produzidas duas cavidades ósseas uma no osso parietal direito e outra no esquerdo. As 40 cavidades foram separadas aleatoriamente em 4 grupos e preenchidas com coágulo, enxerto ósseo autógeno, enxerto de osso bovino orgânico medular e cortical. Trinta dias após a cirurgia os animais foram sacrificados, as calvárias removidas, fixadas em formol, desmineralizadas em EDTA e processadas para inclusão em parafina. Os cortes histológicos foram corados em Hematoxilina e Eosina ou Tricrômico de Mallory e analisadas ao microscópio de luz. No grupo coágulo cerca de metade da cavidade foi preenchido por tecido ósseo formado a partir das bordas e a área central apresentou tecido conjuntivo fibroso celularizado. No grupo autógeno a cavidade foi totalmente preenchida por tecido ósseo. Nos grupos que receberam enxerto bovino medular ou cortical, cerca de  $\frac{1}{4}$  das cavidades estavam preenchidas por tecido ósseo, formado a partir das bordas da cavidade e a região central estava ocupada por tecido conjuntivo fibroso. Quase todo enxerto bovino foi reabsorvido e alguns fragmentos remanescentes estavam associados às células gigantes e poucos apresentaram neoformação óssea associada. Portanto, o enxerto de osso bovino orgânico medular ou cortical, utilizado de forma isolada, não favoreceu o processo de reparo ósseo.

## **ABSTRACT**

Xenogenic graft of bone origin has been used to favor bone regeneration and to reduce autogenous bone needs. The purpose of this study was to evaluate the bone repair induced by particulate bovine organic bone grafted in rabbit calvaria. Two standardized bone defects were prepared in both parietal of 20 adult rabbits. The defects were filled by clot, autograft, medular organic bovine bone or cortical organic bovine bone. Thirty days following surgery animals were killed; the calvaria were removed, fixed in formol, demineralized in EDTA and embedded in paraffin. Histological sections were stained in HE or Mallory Trichrome and analyzed by light microscope. On group filled with clot only the half of the defect was repaired by new bone tissue, which was formed from lesion border, central area presented cellular connective tissue. In defects filled with autograft almost all defect was repaired by bone tissue. Defects grafted with medular or cortical bovine bone exhibited near  $\frac{1}{4}$  of defect filled by bone tissue, formed from border, with central area occupied by fibrous connective tissue. Almost all xenogenic grafts were reabsorbed, remaining few fragments that were associated to foreign body giant cell reaction and few showing bone neof ormation around. Therefore, the graft of organic bovine bone, medular or cortical, used in an isolated way, didn't favor the process of bone repair.

## 1. INTRODUÇÃO

O enxerto ósseo favorece o processo de reparo funcionando como arcabouço que permite a neoformação óssea através da osteocondução. Atualmente, existe grande variedade de opções para enxertos, como osso autógeno, enxertos xenógenos, alógenos, cerâmicas biocompatíveis, hidroxiapatita sintética, vidros bioativos e polímeros (Okamoto *et al.*, 1994; Fonseca, 1997; Sicca *et al.*, 2000; Figueiredo *et al.*, 2004; Le Guéhenec *et al.*, 2004).

As propriedades osteogênica, osteoindução e osteocondução, bem como a ausência de antigenicidade fazem do enxerto autógeno a primeira opção nas reconstruções de deformidades congênitas, adquiridas ou nas correções esqueléticas com finalidade estética incluindo a implantodontia (Becker *et al.*, 1996; Fonseca, 1997; Nary & Ilg, 2001; Cury *et al.*, 2002; Eppley *et al.*, 2005).

A limitada disponibilidade óssea de áreas doadoras intra-bucais, bem como as desvantagens de áreas doadoras extra-bucais, tem estimulado o uso alternativo dos aloenxertos ou alógenos originados de bancos de tecidos de indivíduos da mesma espécie ou os xenógenos ou heterógenos, provenientes de espécies diferentes (Nary & Ilg, 2001; Eppley *et al.*, 2005; Jensen *et al.*, 2006), sendo o osso bovino o mais utilizado e difundido.

A matriz óssea bovina destaca-se entre os materiais heterógenos disponíveis para a realização de procedimentos de reconstrução óssea, a qual é amplamente comercializada a custo acessível e em quantidades ilimitadas. Este biomaterial vem sendo estudado há cerca de duas décadas, sendo biocompatível e eficaz como osteocondutor (Glowacki *et al.*, 1981; Pinholt *et al.*, 1992; Becker *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 2003; Betti, 2004; Silva *et al.*, 2006).

Embora a regeneração óssea utilizando matriz bovina seja bastante pesquisada, a efetividade da matriz desmineralizada de osso bovino é questionável no que se refere à osteocondução, osteoindução, e a taxa de reabsorção (Pinholt *et al.*, 1992; Rabie & Lie Ken Jie, 1996; Schwartz *et al.*, 1996; Piattelli *et al.*, 1996; Becker *et al.*, 1998; Garcia, 1999; Rabie *et al.*, 1999;

Takikawa *et al.*, 2003; Braz *et al.*, 2003; Betti, 2004; Marins *et al.*, 2004; Cammack *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2006).

Alguns estudos sugerem que a matriz orgânica bovina tem potencial osteocondutor (Becker *et al.*, 1996; Becker *et al.*, 1998; Betti, 2004; Marins *et al.*, 2004; Cammack *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2006) e/ou osteoindutor (Glowacki *et al.*, 1981; Isaksson & Alberius, 1992; Mellonig *et al.*, 1981; Rabie & Lie Ken Jie, 1996; Torricelli *et al.*, 2002), mas os resultados ainda são controversos. Também não está esclarecida a diferença de comportamento biológico entre enxerto bovino orgânico cortical e medular (Betti, 2004).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Matrizes ósseas desmineralizadas extraídas do osso bovino cortical e medular tem sido utilizada com freqüência em procedimentos cirúrgicos que necessitam do preenchimento de pequenas cavidades ósseas (Becker *et al.*, 1996; Cammack *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2006). Esses biomateriais substituem o enxerto de osso autógeno o que diminui a morbidade do procedimento cirúrgico, bem como o tempo operatório.

O desenvolvimento de materiais xenógenos com o objetivo de recompor defeitos ósseos tem aumentado, apesar da função desses materiais na formação óssea não estar totalmente esclarecida (Sicca *et al.*, 2000; Figueiredo *et al.*, 2004). A revisão a seguir irá abordar aspectos relacionados ao tecido ósseo, processo de reparo ósseo, e à utilização da matriz desmineralizada extraída do osso bovino no processo de reparo ósseo.

### 2.1 Tecido ósseo

O tecido ósseo é uma forma especializada de tecido conjuntivo, cuja matriz óssea é constituída de componentes orgânicos e inorgânicos. O primeiro representa aproximadamente 35% do peso seco do osso e é constituído principalmente por fibrilas de colágeno tipo I. A porção inorgânica representa cerca de 65% do peso seco sendo composta por sais de cálcio e fosfato na forma de cristais de hidroxiapatita (Gartner & Hiatt, 1999).

Macroscopicamente o tecido ósseo pode apresentar um arranjo sem cavidades caracterizando o osso compacto ou apresentar um arranjo trabecular delimitando pequenas cavidades caracterizando o osso esponjoso (Gartner & Hiatt, 1999).

O osso compacto é formado por um sistema de lamelas ósseas paralelas ou concêntricas, geralmente ao redor de um canal vascular central constituindo o sistema de Havers. Os canais centrais contêm nervos e vasos sanguíneos comunicam-se com a cavidade medular óssea através de canais de Volkmann. O osso esponjoso apresenta uma matriz organizada em

trabéculas ou espículas de tecido mineralizado que delimitam pequenas cavidades preenchidas com tecido medular (Ross *et al.*, 1993; Gartner & Hiatt, 1999; Junqueira & Carneiro, 2004).

Histologicamente o tecido ósseo pode ser classificado como osso primário (imaturo) e osso secundário (maduro ou lamelar) (Gartner & Hiatt, 1999).

O tecido ósseo primário apresenta fibrilas colágenas dispostas aleatoriamente, grande quantidade de osteócitos incluído na matriz e menor conteúdo mineral. Este tecido é substituído pelo secundário, exceto em algumas áreas como locais de inserção de tendões e alvéolos dos dentes. O tecido ósseo secundário apresenta fibrilas colágenas dispostas em camadas (lamelas) concêntricas ou paralelas com menor número de osteócitos incluídos na matriz e maior conteúdo mineral (Gartner & Hiatt, 1999).

A superfície interna e externa dos ossos são recobertas por células osteogênicas e tecido conjuntivo, que constituem o endóstio e o perióstio, respectivamente. Estes tecidos têm a função de nutrir o tecido ósseo e fornecer osteoblastos para o crescimento e a reparação do osso (Junqueira & Carneiro, 2004).

O endóstio possui células de formação e reabsorção óssea ou formas em repouso dessas células, capazes de serem ativadas em resposta a estímulos apropriados. O perióstio é uma membrana de tecido conjuntivo denso com menor número de células, algumas com capacidade de diferenciarem-se em osteoblastos sob estímulos apropriados (Ross *et al.*, 1993).

Há quatro tipos de células que compõem o tecido ósseo: a célula osteoprogenitora, osteoblastos, osteócitos, e osteoclastos. A célula osteoprogenitora é uma reserva que pode ser estimulada a se diferenciar em osteoblasto, estão presentes na camada mais interna do perióstio, cavidades medulares, canais de Havers e de Volkmann (Ross *et al.*, 1993).

Os osteoblastos são células cubóides organizadas em camada contínua sobre o osteóide, são responsáveis pela osteogênese, ou seja, pela síntese e secreção da matriz orgânica, maturação e mineralização. São células produtoras de proteínas, que além de sintetizar e secretar colágeno tipo I, também produz outras proteínas não colágenas encontradas na matriz óssea

como: sialoproteína óssea, osteopontina, osteonectina, osteocalcina, BMPs e proteoglicanas. Os osteoblastos são ricos em fosfatase alcalina enzima essencial para o processo de mineralização da matriz (Ross *et al.*, 1993; Gartner & Hiatt, 1999; Junqueira & Carneiro, 2004).

Os osteócitos são osteoblastos incorporados na matriz óssea mineralizada durante a osteogênese. Estas células possuem longas projeções citoplasmáticas no interior de canálculos intercomunicantes, que constituem uma rede de comunicação entre as células e a superfície óssea, sendo responsáveis pela manutenção da matriz (Ross *et al.*, 1993; Gartner & Hiatt, 1999; Junqueira & Carneiro, 2004).

Os osteoclastos são células grandes, multinucleadas, formadas pela fusão de células mononucleares e cuja função é reabsorver o osso. Quando ativo, o osteoclasto repousa diretamente sobre a superfície do osso, no local que deve ocorrer reabsorção, formando um recesso pouco profundo chamado lacuna de Howship ou lacuna de reabsorção (Ross *et al.*, 1993; Gartner & Hiatt, 1999; Junqueira & Carneiro, 2004).

A interação da atividade do osteoblasto-osteoclasto conhecido como BMU, do inglês *Bone Multicelular Unit* (unidade óssea multicelular) é responsável pela remodelação óssea, ou seja, a reabsorção e a neoformação óssea contínua que ocorre em todos os ossos (Rodan & Martin, 1981). O dinamismo apresentado pelo tecido ósseo é contínuo e fisiológico permitindo assim que o tecido ósseo se renove constantemente tendo uma grande capacidade de reparação.

## **2.2 Reparo e Enxertos Ósseos**

O tecido ósseo quando sofre lesão normalmente é reparado por regeneração, que caracteriza o processo de reparo que resulta no estabelecimento integral de forma e função originais (Junqueira & Carneiro, 2004).

Após uma lesão óssea há extravasamento de sangue que forma um coágulo que durante o reparo é reabsorvido, juntamente com restos celulares e de matriz extracelular; em seguida, células do perióstio proliferam iniciando a



reparação óssea. Assim, o tecido ósseo lesado passa por uma fase inflamatória, seguida de reparo e remodelação (Ten Cate, 2001).

A duração de cada fase depende do tipo de osso envolvido, da idade do indivíduo, do estado de saúde geral e nutricional, da intensidade do trauma, irrigação local, presença ou não de forças mecânicas, imobilização e ausência de infecção (Ten Cate, 2001).

Apesar do alto potencial de regeneração do tecido ósseo, este aspecto pode não se apresentar em defeitos de grandes dimensões. Nestes casos, a lesão é rapidamente preenchida por tecido conjuntivo circunjacente, que apresenta velocidade de proliferação e migração celular maior do que o tecido ósseo (Ten Cate, 2001).

Assim, para o reparo de grandes defeitos ósseos têm sido propostos tratamentos utilizando enxertos, baseados em diferentes princípios biológicos: a osteogênese, a osteoindução e a osteocondução.

A osteogênese é o processo de produção de novo osso a partir de células vivas do enxerto transplantadas ao leito receptor (Marx & Stevens, 1997).

A osteoindução é o processo por meio dos quais substâncias do enxerto induzem a diferenciação de células osteoprogenitoras, do leito receptor, em osteoblastos, com posterior formação de tecido ósseo (Marx & Stevens, 1997). Esse princípio foi descrito por Urist em 1965, o qual induziu formação de novo osso no interior de músculos de coelhos pela implantação de matriz óssea alogênica desmineralizada. Posteriormente, foi verificado que a matriz óssea possui fatores protéicos indutores de diferenciação de novas células ósseas, que foram designadas de BMP (*Bone Morphogenetic Protein* – proteína morfogenética óssea) (Urist & Strates, 1971).

A osteocondução é a propriedade do enxerto servir como arcabouço para a proliferação e migração de células osteoprogenitoras do leito receptor, que se diferenciam em osteoblastos. Entretanto, este tipo de material não promove formação óssea quando implantado em ambiente ectópico (Marx & Stevens, 1997; Gross, 1997).

Os enxertos quanto à sua origem podem ser autógenos, homogêneos ou xenógenos. Existem os materiais implantes aloplásticos. O enxerto autógeno é aquele retirado do próprio indivíduo e apresenta propriedades de osteogênese,

osteoidução e osteocondução (Ellis III, 1996). Apesar de ser considerado o melhor material para enxertia, apresenta desvantagens como: a segunda intervenção cirúrgica na área doadora e a quantidade limitada de osso, que muitas vezes é insuficiente (Becker *et al.*, 1996; Fonseca, 1997; Nary & Ilg, 2001).

As vantagens oriundas do enxerto autógeno diferem em relação ao tipo de estrutura se cortical ou medular. O osso autógeno medular apresenta melhores resultados quando comparado ao cortical, pois possui menor densidade óssea o que favorece a revascularização, maior área de superfície e maior número de células osteogênicas, o que aumenta o potencial de osteoidução e osteocondução (Goldberg & Stevenson, 1987). Estes fatores associado à ausência de antigenicidade do enxerto autógeno, permite uma remodelação em tempo menor e torna o enxerto medular a estrutura mais eficiente na reconstrução de defeitos ósseos (Goldberg & Stevenson, 1987).

Os enxertos alogênicos ou homogênicos são aqueles obtidos de indivíduo da mesma espécie, sendo os mais usados o osso alógeno desmineralizado seco e congelado (DFDBA) e o osso alógeno seco e congelado (FDBA). Estes são osteocondutores, mas há controvérsias quanto ao seu potencial osteoindutivo, (Pinholt *et al.*, 1992; Piattelli *et al.*, 1996; Becker *et al.*, 1998; Cammack *et al.*, 2005), bem como sobre a possibilidade de transmissão de doenças infecto-contagiosas (Sogal & Tofe, 1999).

Os enxertos heterógenos ou xenógenos são aqueles obtidos e transplantados entre espécies (Fonseca, 1997). Esses enxertos são osteocondutores e as diferenças antigênicas são mais pronunciadas do que no enxerto homogêneo, assim implica num preparo mais rigoroso (Ellis III, 1996).

A utilização de enxertos heterógenos proporciona ao paciente e ao cirurgião certa comodidade, pois, facilita o ato operatório uma vez que restringe o procedimento apenas ao leito receptor, sem lesão tecidual em áreas doadoras e não limita a quantidade de tecido para implantação (Okamoto *et al.*, 1994; Fonseca, 1997; Figueiredo *et al.*, 2004; Eppley *et al.*, 2005).

A matriz óssea bovina tem sido muito utilizada, como enxerto heterógeno, em vários procedimentos clínicos apresentando principalmente propriedades osteocondutoras (Becker *et al.*, 1996; Garcia, 1999; Braz *et al.*, 2003; Betti, 2004; Marins *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2006).

Nos últimos anos a Encefalopatia Espongiforme Bovina, popularmente conhecida como “Mal da Vaca-Louca”, tornou-se preocupação de saúde mundial. Especialmente na Europa e América do Norte, cogitou-se a possibilidade de transmissão desta doença aos seres humanos quando da utilização da matriz óssea bovina em procedimentos de enxertia (Sogal & Tofe, 1999). Esta hipótese foi contestada por (Wenz *et al.*, 2001), que realizaram extensa revisão da literatura e concluíram que o processamento do tecido ósseo para obtenção do biomaterial é suficiente para a inativação do *Príon* (*Proteinaceous Infectious Only Particle* - Partícula Infeciosa Puramente Protéica).

Os enxertos aloplásticos são materiais sintéticos que podem ser de natureza metálica, cerâmica ou plástica. Esses materiais sintéticos geralmente são denominados como implantes. O seu papel fundamental se dá pelo preenchimento de espaços apresentados em defeitos ósseos, sem haver uma incorporação fisiológica. A composição destes materiais varia entre hidroxiapatitas sintéticas, vidros bioativos e polímeros (Schepers & Ducheyne, 1997; Lé Guéhennec *et al.*, 2004).

Os materiais de enxertia óssea podem ser associados a fatores de crescimento como o plasma rico em plaquetas (PRP) e as proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) favorecendo assim o processo de reparo através das propriedades osteoindutoras desses materiais (Kim *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2006).

### **2.3 Matriz Óssea Bovina**

A matriz óssea bovina é um enxerto heterógeno muito utilizado como substituto ósseo, apresentando grande aplicabilidade na prática clínica. O seu uso tem sido indicado na regeneração de defeitos periodontais, recobrimento de fenestrações em implantodontia (Hall *et al.*, 1999), elevação do seio maxilar (Cammack *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2006), bem como no preenchimento de pequenos defeitos ósseos decorrentes de procedimentos cirúrgicos, traumas, infecções ou reabsorções, que causam problemas estéticos e funcionais (Okamoto *et al.*, 1994; Fonseca, 1997; Sicca *et al.*, 2000; Figueiredo *et al.*, 2004; Eppley *et al.*, 2005). Este biomaterial tem propriedades osteocondutoras

e a formação de matriz óssea é observada em sua superfície, quando enxertado em defeitos ósseos (Becker *et al.*, 1996; Piattelli *et al.*, 1996; Garcia, 1999; Braz *et al.*, 2003; Betti, 2004; Marins *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2006).

A matriz bovina, utilizada como enxerto, está disponível em diferentes formulações como: matriz inorgânica, matriz orgânica, sendo estas em bloco ou particuladas e associadas ou não a promotores da osteogênese (Fonseca, 1997; Le Guéhennec *et al.*, 2004).

A matriz bovina inorgânica é a mais utilizada sendo um material biocompatível, osteocondutor e biodegradável, auxiliando a reparação de defeitos ósseos (Okamoto *et al.*, 1994; Skoglund *et al.*, 1997; Norton *et al.*, 2003; Artzi *et al.*, 2000; Carmagnola *et al.*, 2003; Jesen *et al.*, 2006).

A utilização de matriz óssea bovina inorgânica em reparo de alvéolos (Artzi *et al.*, 2000; Carmagnola *et al.*, 2003; Norton *et al.*, 2003) e reconstruções de rebordos alveolares (Callan & Rohren, 1993; Zitzmann, 2001) mostra íntimo contato do tecido ósseo neoformado com os grânulos do biomaterial. Estudos experimentais em tibia (Okamoto *et al.*, 1994; Coradazzi, 2003), calvária (Kim *et al.*, 2001; Pallesen *et al.*, 2002; Aghaloo *et al.*, 2005) e mandíbula (Skoglund *et al.*, 1997; Jensen *et al.*, 2006) também indicam que a matriz bovina inorgânica é osteocondutora. Este biomaterial apresenta taxa de reabsorção lenta, sendo possível encontrar partículas do biomaterial incorporadas ao tecido ósseo após longos períodos (Skoglund *et al.*, 1997; Norton *et al.*, 2003).

Proteínas da matriz óssea bovina, como a BMP, podem induzir a diferenciação de células mesenquimais em células osteoprogenitoras ou condroprogenitoras (Reddi & Huggins 1972; Taga, 1996). Nos anos 80, diferentes frações de proteínas foram separadas, selecionando as que apresentavam potencial osteogênico. Sampath & Reddi, (1981) isolaram da matriz óssea desmineralizada uma glicoproteína com as mesmas funções da BMP e que denominaram de *osteogenic protein* (OP) – proteína osteogênica. Estas pesquisas estimularam o desenvolvimento do enxerto de matriz orgânica.

A avaliação do potencial de osteoindução dos enxertos ósseos desmineralizados na região crânio facial, foi demonstrado em diversos estudos (Glowacki *et al.*, 1981; Mellonig *et al.*, 1981; Isaksson & Alberius, 1992; Rabie & Lie Ken Jie, 1996; Rabie *et al.*, 1999; Braz *et al.*, 2003; Marins *et al.*, 2004).

Mulliken & Glowacki (1980) concluíram que o fenômeno de osteogênese induzida não é espécie específica, e que o osso particulado desmineralizado, mesmo quando se origina de espécie diferente pode ser utilizado para indução de reparo ósseo. Entretanto, Sampath & Reddi (1981) consideram que somente a reconstituição espécie específica, induz a formação de osso.

Estudos em reparo de alvéolos humanos têm mostrado que a matriz orgânica alógena (Becker *et al.*, 1996; Becker *et al.*, 1998) e xenógena (Gulaldi *et al.*, 1998) são osteocondutoras e aceleram o processo de reparo ósseo, apesar dos autores não observarem osteoindução.

A matriz de osso bovino desmineralizada é de fácil manuseio, reabsorvível, biocompatível e favorece a regeneração de lesões ósseas (Restrepo *et al.*, 1998). Este biomaterial é um tipo de enxerto xenógeno, obtido do osso desmineralizado de animais de 12 a 15 meses de idade. Após rigorosa lavagem, eliminação de sangue, gorduras e todas as impurezas, o osso é cortado até atingir a forma desejada (Taga, 1996). A matriz resultante do processo é desidratada através da liofilização, que impede a desnaturação das proteínas preservando o princípio ativo (Taga, 1996).

Segundo informações do fabricante expressa na bula do material (Gen-Ox® Baumer-SA Brasil) testes histopatológicos realizados em tecido ósseo após a aplicação de matriz orgânica bovina, mostraram que o biomaterial induz a formação de tecido ósseo humano normal, altamente celularizado e vascularizado. Do ponto de vista imunológico a matriz orgânica de osso bovino não induz o aparecimento de células linfocitárias no teste de biocompatibilidade. Este biomaterial é totalmente reabsorvido após 90 dias, no tecido subcutâneo de ratos, o que fundamenta sua utilização em humanos.

Taga *et al.*, (1997) e Garcia (1999); analisando o reparo de defeitos ósseos em crânios de cobaias com aplicação de Osseobond®, encontraram intenso processo de reparação óssea, estando a maioria dos defeitos preenchido quase que completamente por tecido ósseo organizado o que reforça o uso da matriz óssea bovina desmineralizada na clínica odontológica.

Estudos experimentais utilizando enxerto de matriz orgânica em fêmur (Betti, 2004), calvária (Garcia, 1999; Braz *et al.*, 2003; Marins *et al.*, 2004) e seio maxilar (Xu *et al.*, 2003) de coelhos confirmam o potencial osteocondutor do biomaterial e outros observaram potencial osteoindutor (Isaksson &

Alberius, 1992; Rabie & Lie Ken Jie, 1996; Rabie *et al.*, 1999; Schwartz *et al.*, 1996; Torricelli *et al.*, 2002).

Alguns estudos relataram reação granulomatosa do tipo corpo estranho com presença de inúmeras células gigantes, o que inibiu a neoformação óssea local. Este fato foi interpretado pelos autores como falha na desmineralização e na retirada de potenciais fatores antigênicos durante a produção do biomaterial (Pinholt *et al.*, 1992; Marins *et al.*, 2004).

O processo de reparo tecidual através da matriz óssea orgânica de origem bovina mostra reabsorção lenta do material (Marins *et al.*, 2004); entretanto, é efetivo como espaçador biológico favorecendo a angiogênese, migração e adesão celular e a neoformação óssea a partir das bordas da lesão, tendo capacidade osteocondutora (Braz *et al.*, 2003; Betti, 2004).

Embora a regeneração óssea seja um assunto bem pesquisado na área de saúde, a efetividade de alguns biomateriais como a matriz desmineralizada de osso bovino ainda não está estabelecida quanto à osteocondução, osteoindução, bem como a taxa de reabsorção deste material.

### **3. PROPOSIÇÃO**

O propósito do presente estudo foi realizar análise histológica do processo de reparo ósseo em calvária de coelhos, utilizando matriz óssea orgânica de origem bovina do tipo cortical e medular.

## **4. MATERIAL E MÉTODO**

### **4.1 Animais**

Neste estudo foram utilizados vinte coelhos albinos da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*), fêmeas, com peso entre 2,5 a 4,0 kg, mantidos durante o período experimental com alimentação sólida e água à vontade em gaiolas de aço no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia.

Durante todo o desenvolvimento experimental, os animais foram tratados de acordo com as normas técnicas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### **4.2 Procedimento Cirúrgico**

A intervenção cirúrgica nos animais foi realizada através de anestesia geral. Foram aplicadas injeções por via intramuscular com Ketamina na dose de (25mg/kg); Xylazina a 2% (10mg/kg); Acepromazina (0,2mg/kg) e Midazolam (0,2mg/kg). Previamente à anestesia foi realizada a tricotomia da região de calvária e uma dose profilática de antibiótico subcutânea em região dorsal de Enrofloxacina (0,1mg/kg).

Potencializado o efeito da solução anestésica, os animais foram colocados em decúbito ventral e submetidos à anti-sepsia com Povidine® tópico (solução aquosa de polivinilpirrolidona a 1%) e isolamento da área a ser operada com campos estéreis. A seguir, a área a ser incisada foi infiltrada com xilocaína a 2% com adrenalina para obtenção de melhor hemostasia.

O procedimento cirúrgico foi dirigido através do protocolo descrito por (Alberius *et al.*, 1990) para craniotomia em coelhos. A pele e o tecido subcutâneo foram incisados através de uma incisão mediana na calvária do coelho, estendendo-se do osso frontal ao occipital, realizada com lâmina intercambiável número 15 montada em cabo de bisturi número 3. O perióstio que recobre a região frontal e a sutura coronal foi cuidadosamente incisado,



elevado e rebatido lateralmente. Os defeitos ósseos, em número de 2, foram produzidos na região parietal bilateralmente, usando broca trefina de 8 mm de diâmetro, montada em contra-ângulo sob alta rotação (Figura 1A e 1B). As osteotomias foram realizadas sob irrigação constante com solução salina 0,9%, evitando o superaquecimento ósseo.

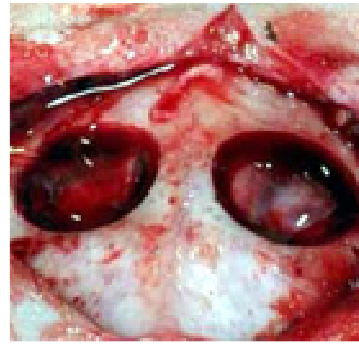
As 40 cavidades cirúrgicas foram aleatoriamente separadas em 4 grupos iguais e preenchidas com coágulo (grupo I), enxerto ósseo autógeno particulado (grupo II), osso bovino orgânico medular (grupo III) e osso bovino orgânico cortical (grupo IV) (Figuras 2, 3, 4 e 5).

Posteriormente, o periósteo foi reposicionado e suturado com fio de nylon 4-0 sutura simples e a pele através de sutura contínua festonada utilizando o mesmo fio.

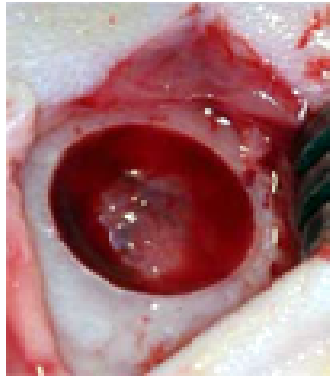
Os animais foram sacrificados 30 dias após a cirurgia com Tiopental Sódico a 2,5% (50mg/kg) e cloreto de potássio a 19,1% via endovenosa. As calvárias foram removidas com brocas cirúrgicas 702 montadas em alta rotação sob irrigação abundante com solução salina 0,9%.



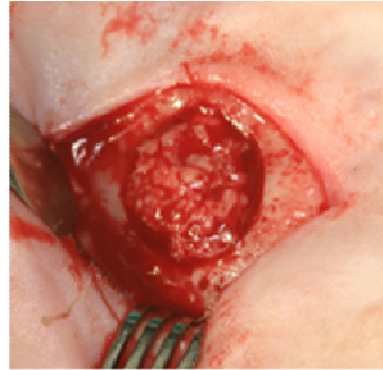
**Figura 1A.** Osteotomia com broca trefina de 8mm.



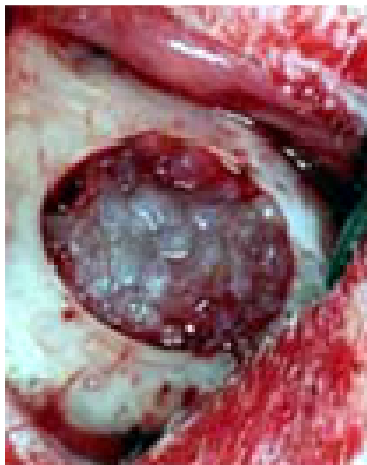
**Figura 1B.** Osteotomias nos parietais.



**Figura 2.** Defeito ósseo preenchido por coágulo.



**Figura 3.** Defeito ósseo preenchido com enxerto de osso autógeno.



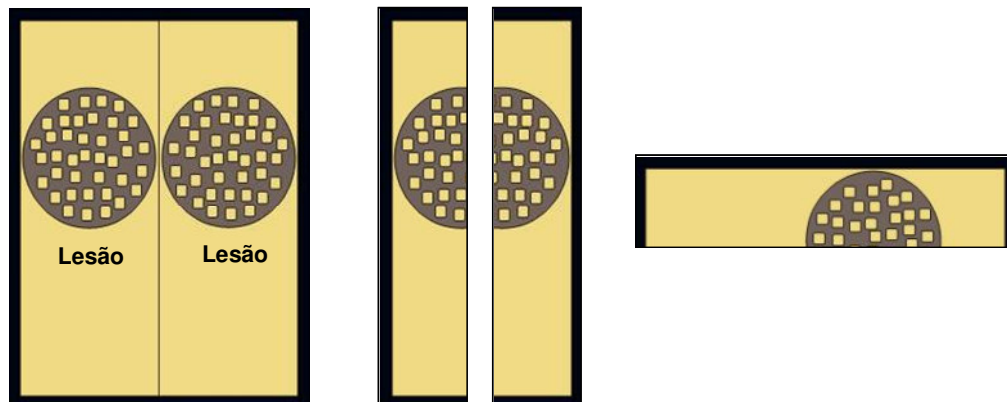
**Figura 4.** Defeito ósseo preenchido por enxerto de osso orgânico medular.



**Figura 5.** Defeito ósseo preenchido por enxerto de osso orgânico cortical.

### 4.3 Análise Histológica

As peças foram fixadas em solução de formol 10% em PBS (0,1M) por 48 horas e desmineralizadas em EDTA a 4,13% por 30 dias. Os defeitos ósseos direito e esquerdo foram separados, divididos ao meio e processados pela técnica de rotina para inclusão em parafina. As peças foram orientadas durante a inclusão de forma que o centro do defeito ósseo ficasse voltado para a face de corte do bloco (Figura 6). Os cortes semi-seriados, na espessura de 5  $\mu\text{m}$  foram corados em Hematoxilina e Eosina (HE) e Tricrômico de Mallory para análise morfológica ao microscópio de luz. De cada bloco, foram obtidas 12 lâminas histológicas, sendo 120 lâminas por grupo totalizando 480 lâminas.



**Figura 6.** Desenho ilustrando a divisão das peças para inclusão em parafina.

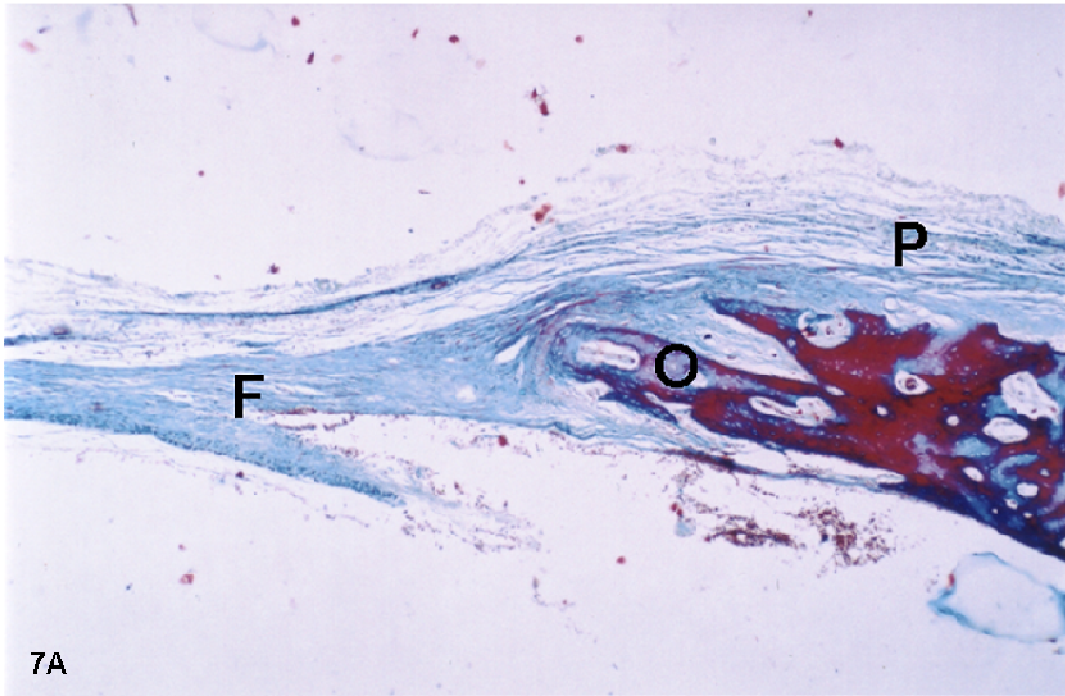
## 5. RESULTADOS

### 5.1 Análise Histológica

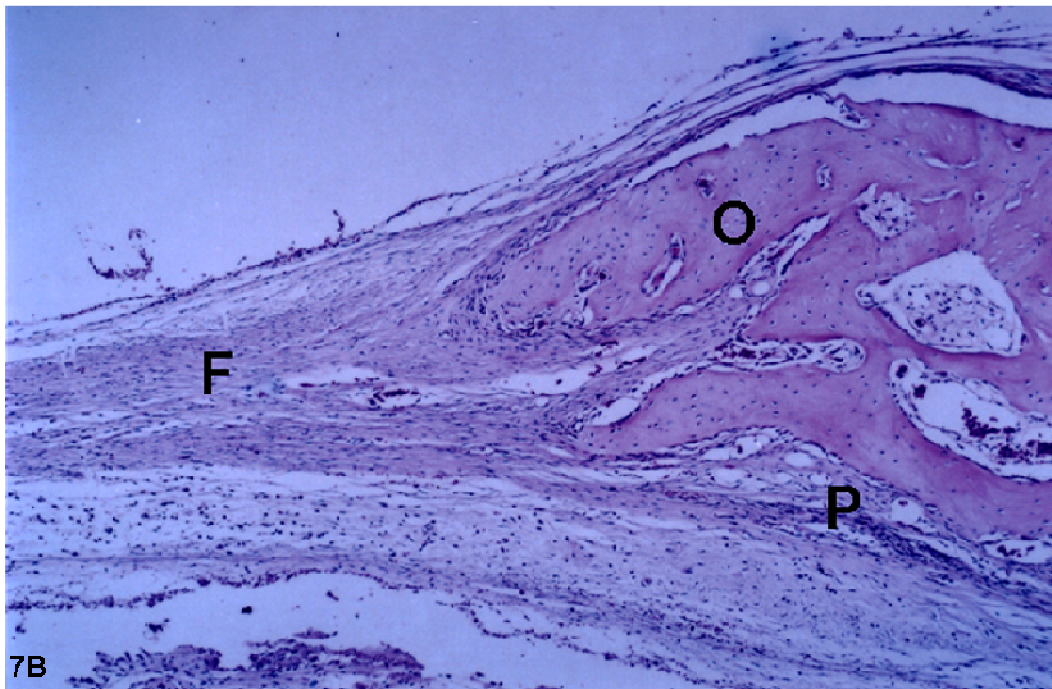
No grupo I (coágulo), quase metade do defeito estava preenchido por tecido ósseo formado a partir das bordas do defeito. A lâmina óssea neoformada na região do reparo apresentou-se mais delgada quando comparada à espessura da calvária. A região central apresentou tecido conjuntivo fibroso e celularizado (Figuras 7A, 7B e 7C).

No grupo II (enxerto autógeno) praticamente todo o defeito mostrou-se preenchido por tecido ósseo neoformado a partir das bordas do defeito e dos fragmentos ósseos do enxerto, que foram integrados ao reparo (Figuras 8A, 8B e 8C).

Nos grupos III e IV de enxerto bovino cortical e medular respectivamente cerca de  $\frac{1}{4}$  do defeito estava preenchido por tecido ósseo, formado a partir das bordas, e a região central estava ocupada por tecido conjuntivo fibroso. Poucos fragmentos do biomaterial foram observados, os quais estavam associados a infiltrado inflamatório linfoplasmocitário e células gigantes de corpo estranho (Figuras 9A, 9B e 9C; 10A, 10B e 10C). Raros fragmentos apresentaram neoformação óssea associada. Semelhante ao grupo coágulo, a espessura óssea na região do defeito decresceu a partir das bordas.



**Figura 7A (coágulo):** Área do defeito ósseo grupo coágulo parcialmente preenchido por tecido ósseo (O) e tecido conjuntivo fibroso (F), contínuo com o periósteo (P), Tricrômio de Mallory 48X.



**Figura 7B (coágulo):** Área do defeito ósseo grupo coágulo observada em HE 77X.