

Análise densitométrica do reparo tecidual após enxerto ósseo autógeno particulado em ratas ovariectomizadas.

Rangel, R.N.¹; Pereira, D.F.A.²; Silva, CMOM³; Picosse, L.R.⁴; Arisawa, E.A.L.⁵

Universidade do Vale do Paraíba/Faculdades Ciências da Saúde, Avenida Shishima Hifumi 2911.

1rodolfonrangel@hotmail.com, 2danielfreitas@apcd.org.br, 3pato@univap.br, 4picosse@uol.com.br,
5mirela@univap.br

Resumo- A perda de balanço entre a reparação tecidual e a formação de osso origina a uma patologia denominada osteoporose, resultado da perda óssea. Esta perda por vezes impossibilita a instalação imediata de implantes. Nesta circunstância pode ser necessária a reconstrução prévia realizada por enxertos ósseos autógenos. Este trabalho objetivou avaliar, densitometricamente, o reparo tecidual após a utilização de enxertos ósseos autógenos particulados em defeitos cirúrgicos criados em mandíbulas de ratas ovariectomizadas. A análise dos resultados permitiu observar maior densidade óssea no grupo onde se utilizou o enxerto ósseo particulado em todos os tempos experimentais estudados. Conclui-se que a utilização de enxerto ósseo particulado em ratas ovariectomizadas favoreceu o reparo ósseo em defeitos cirúrgicos, representado pelo aumento na densidade mineral.

Palavras-chave: reparo ósseo, osteoporose, enxerto autógeno, densitometria.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde

Introdução

Na menopausa, como consequência da queda brusca na concentração dos hormônios sexuais circulantes, estrógeno e progesterona, observa-se uma perda expressiva no conteúdo mineral, principalmente no tecido ósseo trabecular (BANDEIRA et al., 2000). Uma das consequências mais comuns desta perda hormonal é justamente a osteoporose, devido à estreita ligação existente entre a insuficiência do estrógeno e esta patologia. Essa deficiência pode ser definida atualmente como uma doença esquelética sistêmica caracterizada por baixa massa óssea, com deterioração da microestrutura do tecido, resultante, pelo menos, parcialmente, desse desequilíbrio (MANOLAGAS & JILKA, 1995).

Quando há necessidade de restabelecer uma estrutura óssea, em altura ou espessura, são recomendados os enxertos de tecido ósseo. Segundo Cypher & Crossman em 1996, o enxerto ósseo é o transplante de osso vivo de um sítio para outro. O termo transplante significa a transferência de células vivas, enquanto implante refere-se à transferência de tecido não vital ou de material aloplástico. Um enxerto pode ser autógeno, quando a transferência ocorre no mesmo indivíduo ou entre gêmeos homocigóticos; alógeno, quando da transferência de tecido entre indivíduos da mesma espécie e xenógeno, quando ocorre entre indivíduos de espécies diferentes.

Pallesen et al., 2002, demonstraram que partículas menores também são rapidamente reabsorvidas, com simultâneo aumento da aposição óssea ao contrário do que ocorre quando são utilizadas partículas de maiores

dimensões. Os autores argumentaram que o tamanho diminuto aumenta a superfície de contato com o tecido que as envolve.

Palleckis, em 2004, observou que a reparação inicial do enxerto particulado compreende rápida reabsorção dessas partículas, que são envolvidas por tecido conjuntivo reparacional, exibindo também áreas de neoformação óssea.

A Densitometria óptica radiográfica permite avaliar, através de imagens radiográficas digitais, a densidade mineral óssea, permitindo quantificar o reparo ósseo tecidual (RIBEIRO, 2004).

Este trabalho objetivou avaliar, densitometricamente, o reparo tecidual após a utilização de enxertos ósseos autógenos particulados em defeitos cirúrgicos criados em mandíbulas de ratas ovariectomizadas, visando sua aplicação na clínica odontológica, em pacientes com relevante perda óssea.

Materiais e Métodos

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa-UNIVAP, sob o protocolo nº A004/2006/CEP. Foram utilizadas 24 ratas fêmeas adultas (*Rattus norvegicus*, var. albinos, *Wistar*) com peso aproximado de 250g e sessenta dias de idade. Os animais foram alojados no Biotério de Passagem do Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento (IP&D) da Universidade do Vale do Paraíba, mantidos em gaiolas com água e ração *ad libitum*.

Estes foram divididos, aleatoriamente, em 2 grupos, assim distribuídos:

a) Grupo Controle (G1): Os animais deste grupo foram submetidos a ovariectomia e, decorridos sessenta dias da cirurgia, foi realizada

uma lesão óssea na região de ramo de mandíbula direita. Após este passo a loja cirúrgica foi recoberta por uma membrana biodegradável com a finalidade de impedir a invasão local de tecido conjuntivo.

b) Grupo Enxerto (G2): Neste grupo os animais foram submetidos a procedimentos cirúrgicos semelhantes aos descritos para o Grupo Controles, acrescido do enxerto de osso autógeno particulado no interior da loja cirúrgica.

Materiais

Neste estudo foi utilizada uma membrana absorvível, confeccionada em colágeno, medindo 40x5mm, com espessura de 0,1mm e configuração apropriada para o enxerto ósseo realizado (PROUSSAEFS et al., 2003). As películas de colágeno recortadas foram previamente colocadas em embalagens adequadas, devidamente seladas e esterilizadas em autoclave por 30 minutos a 121°C.

Para os procedimentos cirúrgicos foram utilizados os seguintes materiais: cabo de bisturi, lâmina nº 15, afastadores cirúrgicos, pano de campo, seringas descartáveis de 10mL, espátula 7, agulha, pinças homeostáticas tipo mosquito curva e reta, gaze estéril, tesoura, trefina de 2.0mm, raspador e coletor para osso.

A síntese dos tecidos foi realizada utilizando-se fios de sutura montados, reabsorvível com agulha (Catgut nº 4) e fio de sutura de seda nº 4.0 com agulha.

Métodos

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no IP&D da UNIVAP, em laboratório cuidadosamente limpo, utilizando-se álcool 70% e preparado para os procedimentos cirúrgicos.

A paramentação do cirurgião e auxiliares, como aventais e luvas, bem como todos os materiais cirúrgicos foram esterilizados em autoclave, pressão a vapor de 15Lb/pol² a 121°C por 30 minutos.

Os animais dos grupos G1 e G2 foram submetidos a duas sessões cirúrgicas. A primeira para excisão dos ovários e a segunda para realização do enxerto ósseo na mandíbula direita, bem como a cirurgia conjunta da calvária, área doadora do enxerto.

As ratas foram pesadas imediatamente antes do procedimento cirúrgico, para a quantificação correta da dosagem de anestésico. Em todos os procedimentos cirúrgicos foram utilizadas medicações pré-anestésicas, através de injeção intramuscular de Acepromazina (Acepram[®] 2,0%) na dose de 0,02ml associada a Butorfanol[®] na dose de 0,01ml. Após 20 minutos aplicou-se o anestésico Zoletil 50[®] na dose de 0,1ml através de injeção intramuscular com seringa de insulina

descartável.

As ratas dos grupos G1 e G2 foram anestesiadas para a realização da ovariectomia e, após a tricotomia da região abdominal lateral, a pele e musculatura foram incisadas longitudinalmente. A pele foi retraída lateralmente permitindo a exposição do ovário. Uma incisão de 1cm permitiu a extrusão do ovário, juntamente com a gordura circundante, o oviduto e uma pequena porção do útero, sendo estes excisados. Realizou-se este procedimento bilateralmente, suturando-se as camadas musculares e a pele com fio de seda nº 4.

Sessenta dias após a ovariectomia, as ratas foram novamente anestesiadas para a realização da cirurgia de enxerto. Foram submetidas à tricotomia das regiões da calvária, submentoniana e submandibular para, em seguida, proceder-se a antissepsia com gaze embebida em álcool iodado. As partículas ósseas foram obtidas da calvária, área doadora, utilizando-se um raspador ósseo descartável (Neodent[®]). Após a coleta do material, este foi mantido úmido em solução fisiológica estéril até o momento de sua utilização.

A incisão a retalho foi realizada sobre ramo da mandíbula direita com abertura aproximada de 1cm de comprimento, afastando-se o perióstio. Durante toda a manipulação óssea e no decorrer do ato cirúrgico, o local foi irrigado constante e abundantemente com cloreto de sódio estéril.

O leito receptor foi preparado no ramo da mandíbula, pouco acima da base. A delimitação das margens do leito e remoção da cortical foram feitas com trefina de 2mm de diâmetro.

Sobre o leito receptor da mandíbula, o enxerto particulado foi colocado com o auxílio de curetas sendo, então, compactado (fig.1)

Com a finalidade de isolar o perióstio do enxerto e eliminar possível interferência no processo de reparo, a loja cirúrgica foi recoberta com membrana de colágeno reabsorvível. Esta barreira medindo 40x5mm, com espessura de 0,1mm tinha configuração apropriada para o enxerto ósseo realizado, recobrando a mandíbula de vestibular para lingual. Após limpeza da área, realizou-se a sutura com fio de seda 4.0.

Todo procedimento cirúrgico foi conduzido dentro de técnica estritamente asséptica. As áreas operadas sofreram nova assepsia com álcool iodado, sendo os animais mantidos em gaiolas, em local apropriado.

Transcorridos os períodos experimentais, três animais dos grupos G1 e cinco do G2 foram sacrificados aos sete, quatorze e vinte oito dias. As mandíbulas foram removidas, sendo imediatamente fixada em formol tamponado a 10%.



Figura 1 - Defeito ósseo na região de mandíbula preenchido com osso particulado autólogo.

Análise Densitométrica

A região mandibular foi submetida à Densitometria Óptica Radiográfica através de tomadas radiográficas digitais da região mandibular.

Para as tomadas radiográficas dos espécimes estudados utilizou-se o aparelho de raios X digital 765 DC®, Gendex com 65 kVp, 7mA, e 0,032s de tempo de exposição. Para captação das imagens, utilizou-se um sistema de radiografia digital direto, que emprega o dispositivo de carga acoplada (CCD): o RVG (Trophy Radiologie, Vincennes, Toulouse, France). Este sistema digital foi acoplado a um computador Pentium III com 1,4 GHz, 128Mb de memória, HD 40Gb, Monitor LG de 17". O sensor CCD foi fixado à uma mesa com o cilindro do aparelho de raios X posicionado a uma distância focal de 40cm, de forma que o feixe central de raios X incida perpendicularmente ao sensor. Cada peça anatômica foi colocada no sensor com o defeito ósseo ocupando a porção central deste.

As imagens obtidas foram armazenadas no formato TIFF, resolução padronizada (Fig. 2).



Figura 2 - Imagem radiográfica enxerto particulado de 28 dias.

Posteriormente, a análise da densidade óptica foi realizada no programa Image Tool 2.03®, utilizando-se a ferramenta histogram (densidade óptica x número de pixels), em que se demarcou a região central do defeito ósseo. Com isso, obteve-se um gráfico bidimensional, fornecendo os valores de cinza da imagem radiográfica. As

leituras das médias das densidades de cada imagem radiográfica foram feitas pelo mesmo examinador. Os valores obtidos foram submetidos à análise estatística, ao teste estatístico de análise de variância (ANOVA), com grau de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

A análise estatística dos valores densitométricos obtidos de todos os grupos em estudo permitiu avaliar a existência ou não de radiolucidez nas imagens radiográficas dos espécimes, nos diferentes tempos experimentais estudados. Os resultados indicaram uma diferença estatisticamente significativa ao compararmos os valores densitométricos dos animais do grupo controle com relação aos do grupo experimental, indicando valores decrescentes de densidade óptica nos animais que receberam o enxerto ósseo autólogo particulado.

A Figura 3 representa graficamente os resultados obtidos em G1 e G2, nos diferentes tempos experimentais.

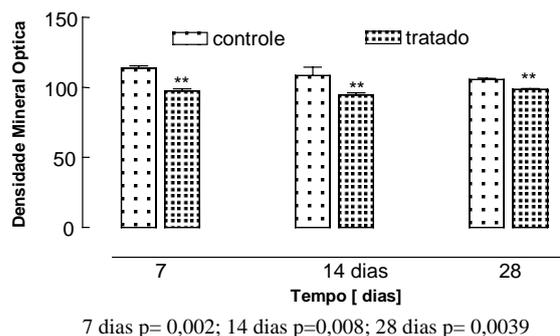


Figura 3 - gráfico demonstrativo das médias dos valores dos grupos: controle e enxerto particulado.

Os valores representam a densidade óptica radiográfica, de tal forma que quanto maior o valor encontrado em um determinado grupo, menor ganho ósseo tecidual. Portanto observa-se que, com relação a G1, no período experimental de 7 dias a densidade óptica apresenta valores superiores aos observados em 14 e 28 dias. Em G2 os valores também demonstram uma tendência decrescente, indicando melhor processo de reparo tecidual nos períodos de 14 e 28 dias. Entretanto a comparação dos grupos estudados apresentou diferenças estatisticamente significantes, representando maior ganho ósseo nos animais do grupo G2, em todos os períodos experimentais.

Discussão

Os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com aqueles obtidos por CHEN et

al., 1997, indicando a validade da utilização de métodos radiográficos para a avaliação de neoformação e regeneração óssea. Resultados estatisticamente significantes foram evidenciados através dos valores obtidos das leituras densitométricas de radiografias das mandíbulas de animais do grupo controle e enxerto particulado, indicando que é possível a comparação do ganho ósseo entre duas condições clínicas, mesmo em se tratando de animais de pequeno porte, como os utilizados nesta pesquisa.

Ratas ovariectomizadas apresentam um processo mais lento de reparo ósseo, após defeito ósseo cirúrgico, quando comparadas a animais normais. Arisawa (2000) observou que animais ovariectomizados apresentam retardo ou, uma regeneração óssea inadequada.

Rabeque et al. (2002) em um estudo experimental na mandíbula de ratos normais, por um período de até três meses, observaram na fase inicial um processo inflamatório agudo e exsudato serofibrinoso no local do defeito ósseo cirúrgico. Após uma semana houve neoformação óssea exuberante, a partir das corticais externas. No período experimental final, o local da fratura estava preenchido por tecido ósseo remodelado, exceto na borda inferior da mandíbula, preenchida por tecidos adiposo e fibroso.

O enxerto ósseo obtido por meio de raspagem de osso cortical oferece partículas de dimensões bastante reduzidas quando comparadas àquelas que resultam de trituração de um bloco. Aos 7 dias observa-se completo envolvimento das partículas por tecido conjuntivo. Estas são rapidamente envolvidas por vasos neoformados e sofrem extensa reabsorção osteoclástica, estimulando a neoformação óssea (PALLECKIS, 2004).

Neste estudo observou-se que a utilização de enxertos ósseos autógenos particulados em ratos ovariectomizadas permitiu uma aceleração no processo de reparo tecidual, bem como ganho na densidade mineral óssea. Estudos histológicos complementares são necessários para análise do tecido ósseo neoformado, visando a aplicação desta técnica na clínica odontológica.

Conclusão

Concluimos que através medidas densitometria radiográfica digital, as utilizações de enxertos particulados autógenos em defeitos ósseos de ratos ovariectomizadas, aumentam, significativamente a reparação do tecido ósseo.

Referências

-ARISAWA, E.A.L. **Influência da calcitonina na regeneração óssea de ratos ovariectomizadas.** 2000. 109p. Tese (Doutorado em odontologia) – Faculdade de Odontologia de São José dos

Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos.

-BANDEIRA, F. **Osteoporose Rio de Janeiro: Médica e Científica** 2000. 390p.

-CHEN, S.K.; HOLLENDER, L.; OMNELL, K.A. Detection small differences in mass using a direct digital dental X-ray system. **Dentomaxillofac Radiol**, v.26, n.1, p.63-66, jan. 1997.

-CYPHER, T.J.; GROSSMAN, J.P. Biological principles of bone graft healing. **J Foot Ankle Surg** v.35, n.5, p.413-417, 1996.

-MANOLAGAS, S.C.; JILKA, R.L. Cytokines, hematopoiesis, osteoclastogenesis, and estrogens. **Calcif Tissue Int** v.50, p.199-202, 1992.

-PALECKIS, L.G.P. **Reparação inicial de enxertos ósseos autógenos em bloco ou em partículas. Estudo microscópico em cães.** Araçatuba, 2004. 121p. Tese (Doutorado em Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.

-PALLESEN, L.; SCHOU, S.; AABOE, M.; HJORTING- HANSEN, E.; NATTESTAD, A.; MELSEN, F. Influence of particle size of autogenous bone grafts on the early stages of bone regeneration: a histologic and stereologic study in rabbit. **Int J Oral Maxillofac Surg** v.17, n.4, p.498-506, 2002.

-PROUSSAEFS, P.; LOZADA, J. The use of resorbable collagen membrane in conjunction with autogenous bone graft and inorganic bovine mineral for buccal/labial alveolar ridge augmentation. **J Prosth Denst.** v.90, n.6, p.530-538, 2003.

-RABEQUE, F.C.; CARVALHO, M.M.; ARAÚJO, V.C.; LUZ, J.G.C. Resposta teciduale frente a defeito cirúrgico no ramo da mandíbula de ratos. **RPG Rev Pós Grad** v.9, n.1, p.57-62, jan./mar. 2002.

-RIBEIRO, C.A.M. **Estudo densitométrico em tíbias de ratas: avaliação da eficácia da atividade física e dieta controlada como forma de prevenção primária no combate à osteoporose.** 2004, 81p. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. São José dos Campos.