

AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA REPARAÇÃO ÓSSEA INDUZIDA POR MATRIZ DENTINÁRIA HETERÓGENA E TRATADA POR REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA.

Karinne Sousa de Araújo¹, Roberta da Silveira Amorim², Francymara Barbosa de Oliveira³, Antonio Luiz Martins Maia Filho⁴, Ísida Manoela Sousa Portela Santos⁵.

¹Universidade do Vale do Paraíba - UNIVAP/IP&D, Av. Shishima Hifumi, 2911 Urbanova/São José dos Campos – SP / knnaraujo@yahoo.com.br

²Faculdade Integral Diferencial – FACID, Rua Rio Poty, 2381 Horto Florestal / Teresina-PI

³Faculdade Integral Diferencial – FACID, Rua Rio Poty, 2381 Horto Florestal / Teresina-PI

⁴Universidade do Vale do Paraíba - UNIVAP/IP&D, Av. Shishima Hifumi, 2911 Urbanova/São José dos Campos – SP

⁵Faculdade Integral Diferencial – FACID, Rua Rio Poty, 2381 Horto Florestal / Teresina-PI

Resumo- O objetivo desse trabalho foi avaliar através da análise histomofológica a regeneração óssea induzida pela matriz dentinária heterógena desmineralizada em defeitos ósseos experimentais na tíbia de ratos, ocluídos com membrana de polímero de poliuretano. Foram utilizados 24 ratos (*Rattus norvegicus*) divididos em dois grupos, sendo que no grupo controle (C1) os animais tiveram o defeito preenchido apenas com coágulo sanguíneo e no grupo tratado (E1) foram implantados partículas de matriz dentinária desmineralizada heterógena ocluídos com membrana de poliuretano. A dentina foi obtida após exodontia de incisivos centrais de coelhos raça Nova Zelândia (*Oryctologos cunicular L.*). De acordo com o período de cicatrização óssea, determinado de 7, 15 e 30 dias, os animais foram sacrificados, em grupos de quatro a cada período, e as peças contendo os defeitos ósseos foram removidas em blocos e encaminhadas ao exame histopatológico. Os resultados mostraram que a matriz dentinária desmineralizada heterógena não induziu a neoformação óssea causando uma intensa reação inflamatória, sendo reabsorvida durante o processo de reparo ósseo, e que a membrana de poliuretano exibiu propriedades de osteopromoção.

Palavras-chave: Reparação óssea, Proteínas morfogenéticas ósseas, matriz dentinária heterógena desmineralizada.

Área do Conhecimento: Engenharia Biomédica.

Introdução

Nas cirurgias reparadoras, freqüentemente, ocorrem situações em que existem alterações de continuidade óssea, especialmente devido aos traumatismos, tumores, infecções e defeitos congênitos. Muitos pesquisadores têm despertado interesse em desenvolver materiais com características biológicas e que possam ser usados como materiais substitutos de tecido ósseo.

O tecido ósseo possui em sua composição células em uma matriz extracelular mineralizada, reforçadas por fibras colágenas, estas responsáveis pelo grau de elasticidade. A matriz óssea é intensamente calcificada, devido à presença do fosfato de cálcio na forma de cristal de hidroxiapatita, responsável pelo alto grau de dureza deste tecido. As células encontradas no tecido ósseo são as células osteoprogenitoras, localizadas na camada celular interna de periósteo, revestindo canais de Havers, canais de Volkmann e canal medular, com a capacidade de

se diferenciarem em osteoblastos; os osteócitos que são as células maduras do osso, derivadas dos osteoblastos e encontrados em pequenos espaços da matriz chamados de lacunas; e os osteoclastos que são células que se originam de precursores da medula óssea, sendo responsáveis pela reabsorção e remodelação da matriz óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O osso é considerado uma das etapas finais no processo de evolução dos tecidos de suporte. Ele tem uma vantajosa habilidade de remodelação e de regeneração ao longo da vida, isso graças à proliferação das células osteoprogenitoras e diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas (FRIEDENSTEIN, 1976). Durante o processo de regeneração óssea o tecido conjuntivo invade rapidamente a ferida cirúrgica e esse obstáculo pode prejudicar e até mesmo impedir a osteogênese. Para evitar tal problema, mecanismos de selamento físico podem ser utilizados isolando o local, promovendo uma osteopromoção através da técnica da Regeneração Óssea Guiada (DAHLIN et al., 1996).

Fatores de crescimento específicos, denominados de proteínas morfogenéticas óssea (BMP's), pertencentes à subfamília dos fatores de crescimento transformadores beta têm propriedades para estimular a proliferação das células osteoprogenitoras em condroblastos e/ou osteoblastos, com subsequente deposição de matriz óssea. Para acelerar o processo de regeneração óssea tem sido relatada na literatura a utilização da matriz dentinária desmineralizada como material osteoindutor porque apresenta proteínas morfogenéticas na sua composição, (GONÇALVES, 1997; GOMES, 1998, SANTOS, 2006). O objetivo desse trabalho foi avaliar através da análise histológica a regeneração óssea induzida pela matriz dentinária heterógena descalcificada em defeitos ósseos cirúrgicos experimentais na tíbia de ratos, ocluídos com membrana de polímero de poliuretana.

Materiais e Métodos

Foram utilizados 24 ratos da espécie *Rattus norvegicus* com peso médio de 280 kg fornecido pelo biotério da Faculdade Integral Diferencial - FACID. Esses animais foram divididos em dois grupos, sendo que no grupo controle (C1) e grupo tratado (E1).

Para a preparação da matriz dentinária heterógena, foi realizada exodontia dos dentes incisivos centrais de coelhos da raça Nova Zelândia Branca (*Oryctologos cunicular L.*) e imediatamente esses dentes foram despoldados por via retrógrada e o ligamento periodontal removido por raspagem vigorosa da raiz. Após lavagem com soro fisiológico estéril a 2°C, esses dentes foram imersos em uma solução 0,6N de ácido clorídrico até sua completa desmineralização. Em seguida, os dentes foram lavados com água destilada, sob constante agitação. Dando continuidade ao processo, os dentes foram cortados para a obtenção de pequenas partículas. As partículas de matriz dentinária desmineralizadas heterógena foram ainda acondicionadas em recipientes esterilizados e armazenadas a uma temperatura de 2°C até sua utilização como material de implante.

A preparação cirúrgica do defeito foi realizada na tíbia dos ratos, e teve início com a tricotomia da região a ser incisada e assepsia com polvidine tópico. A área a ser operada foi isolada com campos cirúrgicos estéreis e uma incisão linear de 20 mm de extensão, no sentido crânio-caudal, foi feita com um bisturi nº 15, seguida de divulsão da pele, músculo e periósteo para a exposição da superfície óssea. Com uma broca esférica de aço nº 8 montada em um micromotor cirúrgico com abundante irrigação com soro fisiológico, foi realizado um defeito ósseo com dimensão de 6

mm e profundidade até atingir o canal medular. Os animais pertencentes ao grupo controle (C1) tiveram os defeitos preenchidos apenas com coágulos sanguíneos e no grupo tratado (E1) foi implantado matriz dentinária desmineralizada heterógena nas bordas e no centro do defeito e imediatamente após, o defeito foi ocluído por membrana de poliuretana na superfície da loja cirúrgica. Em seguida, foi realizada a sutura do periósteo, músculos e da pele. De acordo com o período de cicatrização óssea, determinado de 7, 15 e 30 dias, os animais foram sacrificados, em grupos de quatro a cada período, e as peças contendo os defeitos ósseos foram removidas em blocos e encaminhadas ao exame histopatológico.

A descrição dos achados microscópicos do processo de regeneração óssea na tíbia dos ratos foi elaborada buscando-se ressaltar as diferenças entre o grupo controle e o grupo tratado (E1) em relação as seguintes características histológicas: presença de tecido mesenquimal osteogênico, regeneração óssea periférica, incorporação da dentina por neoformação óssea, reabsorção da matriz dentinária, presença de cartilagem e de células inflamatórias, sendo utilizados escores nos valores de 0 a 4. Os valores usados nos gráficos são das médias aritméticas dos escores dados por dois examinadores, sendo estes professores de histologia, para as características histológicas de cada grupo (4 ratos) para cada período (7, 15 e 30 dias).

Resultados

No período de sete dias, o defeito ósseo no grupo controle foi preenchido por tecido mesenquimal osteogênico com discretas áreas de proliferação óssea próximo ao canal medular, onde se observou trabéculas ósseas imaturas bastante entrelaçadas circundadas por células com perfil osteoblástico. No grupo tratado (E1) foi observado no interior do defeito ósseo que a matriz dentinária foi circundada por intenso infiltrado inflamatório agudizado (Gráfico 1), com discreta neoformação óssea, sendo observado ainda pequena áreas de reabsorção na matriz dentinária desmineralizada heterógena.

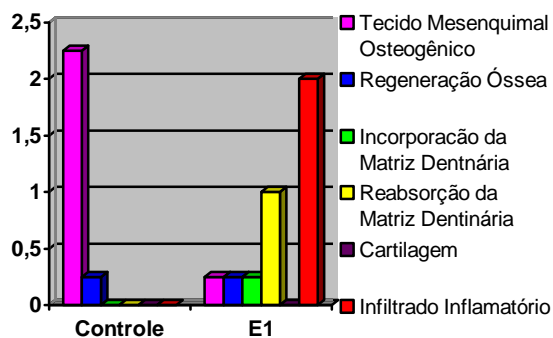


Gráfico 1- Escores proporcionais às características histológicas durante a regeneração óssea do grupo controle e dos grupo tratado (E1) no período de 7 dias.

Com 15 dias, no grupo controle foi observado que o defeito ósseo cirúrgico foi preenchido parcialmente por tecido mesenquimal osteogênico principalmente na região central do defeito. As trabéculas ósseas de tecido ósseo primário apresentavam-se finas e entrelaçadas, com espaços medulares amplos e celularizados sendo revestido por osteoblastos. No grupo tratado (E1) a matriz dentinária ficou circundada por infiltrado linfo-histiocítico com focos de agudização e com moderadas áreas de reabsorção (Gráfico 2). Pode-se perceber a presença de trabéculas ósseas imaturas e entrelaçadas nas margens do defeito ósseo.

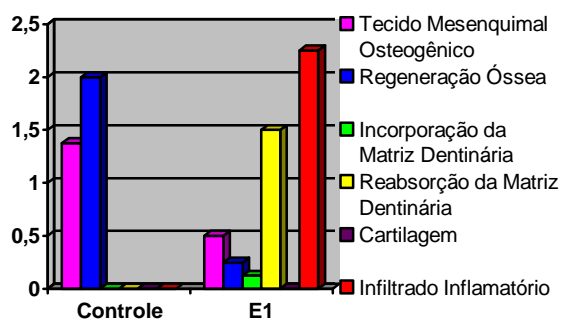


Gráfico 2- Escores proporcionais às características histológicas durante a regeneração óssea do grupo controle e do grupo tratado (E1) no período de 15 dias.

No grupo controle, o tecido mesenquimal osteogênico é muito evidente em toda a loja cirúrgica no período de 30 dias. O tecido ósseo apresenta as fibras colágenas desorganizadas com trabéculas ósseas imaturas e trançadas principalmente próximas ao canal medular. Dentro do canal foram observadas trabéculas ósseas

menos numerosas quando comparadas com as da região periférica do defeito. No mesmo período, o grupo tratado (E1) apresentou neoformação óssea na base do defeito abaixo da matriz dentinária heterógena desmineralizada com trabéculas óssea imaturas com pequenos espaços medulares, já demonstrando uma certa organização das fibras colágenas. Parte da matriz dentinária heterógena foi reabsorvida (Gráfico 3) e os fragmentos restantes mostram-se circundados por fibras colágenas com discreto infiltrado mononuclear.

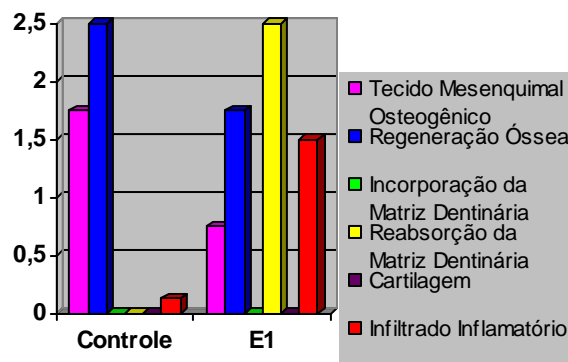


Gráfico 3- Escores proporcionais às características histológicas durante a regeneração óssea do grupo controle e dos grupo tratado (E1) no período de 30 dias.

Discussão

Vários estudos utilizando enxerto de dentina desmineralizada autógena (URIST, 1965; GONÇALVES, 1997; GOMES, 1998; ABREU *et al.* em 2004) e homogêna (SANTOS, 2006) tem sido relatado na literatura, porém pouco se encontram trabalhos envolvendo a associação da técnica da regeneração óssea guiada induzida por dentina heterógena em roedores.

Têm-se estudado diferentes tipos de materiais osteoindutores e/ou osteocondutores com o intuito de auxiliar de maneira positiva o processo de regeneração óssea. Dentre as inúmeras opções, a matriz dentinária desmineralizada tem mostrado excelentes resultados na liberação de proteínas morfogenéticas ósseas com conseqüente indução de células osteoprogenitoras em se diferenciar em osteoblasto, acelerando assim o processo de neoformação óssea (CATANZARO-GUIMARÃES *et al.* 1986; GOMES 1998). Neste trabalho, não foi observada em nenhum período estudado atividade quimiotática das partículas de matriz dentinária desmineralizada heterógena.

Foi observado que nos primeiros sete dias a matriz dentinária provocou intensa resposta inflamatória agudizada, evoluindo para infiltrado crônico com discreta agudização após 15 dias e que se mostrou diminuído ao final dos 30 dias.

Contrariando os achados de Gonçalves em 1997, as partículas de matriz dentinária heterógena em contato com as células do tecido de granulação, como células fonte-mesenquimais, fibroblastos jovens, macrófagos, linfócitos, e outras células do infiltrado inflamatório perderam suas propriedades de osteoindução através da liberação de proteínas morfogenéticas ósseas. Como o processo inflamatório foi intenso, pode ter havido uma inibição da osteogênese no grupo tratado quando comparado com o grupo controle especialmente com 15 dias.

A superfície da matriz dentinária apresentou-se irregular com células do tipo clastos com intensa atividade de reabsorção, que se tornou avançada principalmente no período de 30 dias. Esses dados coincidem com os resultados obtidos por Gomes (1998) e Gonçalves et al. (2002), pois nesses trabalhos também ocorreu reabsorção completa da dentina durante o processo de remodelação óssea.

Os resultados da análise microscópica do grupo tratado ainda demonstraram que a cicatrização óssea fez-se de forma centrípeta, ou seja, da periferia para o centro do defeito. Após a formação do tecido de granulação observou-se a proliferação de células osteogênicas da medula óssea e do endóstio próxima às bordas ósseas do defeito, principalmente no período de 15 dias, com formação de trabéculas ósseas imaturas e entrelaçadas. Com 30 dias a regeneração óssea do grupo tratado apresentou trabéculas ósseas imaturas com pequenos espaços medulares, já demonstrando uma certa organização das fibras colágenas na base da loja cirúrgica, sendo provavelmente resultado da proliferação normal das células osteoprogenitoras.

A utilização da membrana oclusiva de polímero de poliuretano evitou a invasão altamente proliferante dos fibroblastos permitindo assim um intervalo de tempo maior para que as células osteoprogenitoras repovoassem com eficiência a área do defeito e promovessem a neoformação óssea, concordando com os resultados de Dahlin (1996), Belmonte et al. (2005) e Santos (2006).

Conclusão

1) A matriz dentinária desmineralizada heterógena não induziu a neoformação óssea, causando uma intensa reação inflamatória, sendo reabsorvida durante o processo inflamatório.

2) A membrana de poliuretano exibiu propriedades de osteopromoção dificultando a invasão de tecido mole no defeito ósseo cirúrgico.

Referências

ABREU, P. P.; MOROSOLLI, A.; ARAÚJO, M. M.; CARVALHO, V. A. P.; GOMES, M. F. Efeitos da

matriz dentinária autógena na reparação alveolar em humanos. **Braz Oral Res**, v. 18, 2004.

CATANZARO-GUIMARÃES, S. A.; CATANZARO-GUIMARÃES, B. P. N.; GARCIAR, B.; ALLE, N. Osteogenic potencial of autogenic demineralized dentin implanted in bony defects in dogs. **Int J Oral Maxillofac Surg.**, n. 15, v. 2, 1986.

BELMONTE, G.C. et al. Regeneração Óssea Guiada em Modelo de Craniotomia utilizando Membrana de Resina de Poliuretano como Barreira. **Braz Oral Res**, v. 19, 2005.

DAHLIN, C.; BUSER, D.; SCHENK, R. K. **Regeneração Óssea Guiada na Implantodontia**. São Paulo: Quintessence, 1996.

FRIEDENSTEIN, A. J. Precursor cells of mechanocytes. **Int. Rev. Cytol.** v. 47, 1976.

GOMES, M. F. **Avaliação da atividade osteoindutora da matriz dentinária autógena descalcificada em defeitos ósseos cirúrgicos obtidos por craniotomia e tratados pela técnica de regeneração óssea guiada**. Tese (Doutorado em Odontologia, área de Patologia Bucal) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 1998.

GONÇALVES, E. A. L. **Estudo do processo de reparo ósseo em defeitos cirúrgicos implantados com matriz dentinária desmineralizada autógena no osso rádio de cães**. Dissertação (Mestrado em Odontologia, área de Patologia Bucal) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 1997.

GONÇALVES, E. A. L.; PAVAN, A. J.; TAVANO, O.; CATANZARO-GUIMARÃES, S. A. Atividade morfogenética da matriz dentinária desmineralizada: estudo em cães. **Rev Fac Odontol Bauru**. v. 10, n° 1, p. 51-56, 2002.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

URIST, M. R. Bone: formation by autoinduction. **Science**, v. 150, n. 3698, p. 893-899, 1965.

SANTOS, I. M. S. P. **Regeneração óssea estimulada pela matriz dentinária alogênica em defeitos ósseos na tíbia de ratos (*rattus norvegicus*), tratados pela técnica da regeneração óssea guiada**. Dissertação (Mestrado em Biologia Oral) – Universidade do Sagrado Coração. Bauru, 2006.