

***EFEITO DA TEMPERATURA DE
DESPROTEINIZAÇÃO NO PREPARO DE OSSO
CORTICAL BOVINO MICROGRANULAR.
AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA E BIOQUÍMICA
DA RESPOSTA CELULAR EM SUBCUTÂNEO
DE RATOS***

**EFFECT OF DEPROTEINIZATION TEMPERATURE ON THE PREPARATION OF
MICROGRANULAR BOVINE CORTICAL BONE. MICROSCOPIC AND
BIOCHEMICAL ANALYSIS IN RAT SUBCUTANEOUS TISSUE**

Rodrigo Cardoso de OLIVEIRA
Cristina Miguel SICCA
Alunos do Curso de Odontologia, FOB - USP.

Thelma Lopes da SILVA
Farmacêutica/Bióloga – Técnica da Disciplina de Bioquímica, FOB - USP.

Tânia Mary CESTARI
Bióloga – Técnica da Disciplina de Histologia, FOB - USP.

Denise Tostes OLIVEIRA
Professora Dr. do Departamento de Estomatologia, FOB - USP.

Marília Afonso Rabelo BUZALAF
Rumio TAGA
Eulázio Mikio TAGA
José Mauro GRANJEIRO
Professores Doutores do Departamento de Ciências Biológicas, FOB - USP.

Nosso propósito foi avaliar a biocompatibilidade de dois materiais preparados com osso cortical bovino, um desproteínizado a 100°C (Gen-Ox®, Baumer S.A.) e outro a 1000°C (preparado no laboratório de Bioquímica, FOB-USP). Esses materiais foram implantados em subcutâneo de ratos e, após 10, 20, 30 e 60 dias, os animais foram sacrificados e as peças histológicas removidas. As análises microscópicas mostraram uma reação granulomatosa tipo corpo estranho de baixa renovação contendo macrófagos e células gigantes multinucleadas em contato com o material, semelhante à implantação subcutânea de osso autógeno ou alógeno mineralizado. Ao final do período experimental não houve diferença significativa nos níveis das fosfatases ácidas nos grupos que receberam o osso cortical desproteínizado a 100 ou 1000°C, mostrando que não há diferença significativa entre os materiais testados. Podemos concluir que osso cortical bovino, quer desproteínizado a 100°C (Gen-Ox®, Baumer S.A.) ou a 1000°C (preparado em nosso laboratório) podem ser usados como material de preenchimento osteo-substituto e como potenciais carreadores das proteínas morfogenéticas do osso.

UNITERMOS: Biomateriais; Enxerto ósseo; Fosfotirosina proteína fosfatase; Fosfatase ácida.

INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é constituído, basicamente, por uma matriz orgânica colagênica (colágeno tipo I), contendo proteoglicanas de baixo peso molecular e proteínas não colágenas, que corresponde basicamente a 25% de seu peso; uma parte mineral (principalmente hidroxiapatita) correspondente a 65% e os outros 10% constituídos de água. Sua função está relacionada, em geral, com a constituição do esqueleto, sustentação e fixação dos músculos, servindo ainda como depósito para íons cálcio (MARKS; HERMEY²⁴ 1996)

Apesar de seu grande poder de reparo espontâneo quando lesionado, o tecido ósseo não responde convenientemente quando acometido de extensa perda devido a traumas ou processos patológicos. Um das alternativas mais viáveis nesses casos é o do enxerto de osso autógeno em razão de suas propriedades de osteocondução e osteoindução. No entanto, importantes inconvenientes como a necessidade de internação, maior período de convalescença, susceptibilidade a infecções no sítio doador e ainda reabsorção progressiva e constante (GOSAIN¹² 1997) estimularam a busca do substituto ideal para esse tipo de enxerto.

As características desejadas de um biomaterial são: biocompatibilidade, previsibilidade, aplicação clínica, sem riscos transoperatórios e seqüelas pós-operatórias mínimas, além de aceitação por parte do paciente. Apesar de não se ter encontrado o material que preencha todos esses requisitos, atualmente há uma grande variedade de opções para enxertos ósseos, associada a um avanço crescente no desenvolvimento e aperfeiçoamento de materiais para esse fim.

De acordo com o Instituto Nacional de Saúde americano (The National Institute of Health Consensus Development Conference on Dental Implants) em 1989, as grandes variabilidades de materiais para enxerto ósseo podem ser classificadas em 3 grandes famílias: o osso autógeno, o enxerto alógeno e o aloplástico. É imperativo ressaltar que neste período uma nova família de materiais deve ser acrescentada ao grupo, os enxertos xenogênicos. O mecanismo de ação destes materiais dependerá de sua origem e constituição (MISCH; DIETSH²⁸ 1993).

Os materiais para enxerto ósseo podem atuar através de 3 mecanismos: osteogênese, osteoindução e osteocondução. A osteogênese refere-se a materiais orgânicos capazes de formar osso diretamente a partir de osteoblastos (MARX; SAUNDERS²⁴ 1986). O material osteoindutor é capaz de induzir a transformação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos ou condroblastos, aumentando o crescimento ósseo ou mesmo formar osso onde não era esperado (URIST³⁴ 1965 e 1980). A osteocondução caracteriza um material (geralmente inorgânico) que permite a aposição de novo tecido ósseo a partir de osso pré-existente, requerendo a presença de tecido ósseo ou células osteoprogenitoras (MASTERS²⁷ 1988).

Diversos materiais têm sido empregados na clínica odontológica em defeitos intra-ósseos além do enxerto autógeno, alógeno mineralizado (FDBA) ou desmineralizado (DFDBA) liofilizados, cerâmicas biocompatíveis como o fosfatos de cálcio e hidroxiapatita sintética, vidros bioativos, polímeros e coral natural (MARZOLA et al.²⁶, 1996; CIRELLI et al.⁵, 1997; ZITZMANN et al.⁴⁴, 1997; YUKNA et al.⁴³, 1998; TAGA et al.³⁸, 2000; HERCULIANI et al.¹⁸, 2000). Os derivados inorgânicos como a hidroxiapatita (HA) e fosfato tricálcico (FTC), os quais receberam grande atenção como materiais de preenchimento, espaçadores e substitutos para os enxertos ósseos, principalmente devido à sua biocompatibilidade, bioatividade e características de osteocondução em relação ao tecido hospedeiro (DE GROOT¹⁰, 1980; JARCHO¹⁹, 1981; DAMIEN et al.⁹, 1991; GRANJEIRO et al.¹³, 1992; BONACHELLA et al.², 1992; ARAGONÊS et al.¹, 1992; OLIVEIRA et al.³¹, 1993; GREGHI; CAMPOS JUNIOR¹⁶, 1994; TAGA³⁷, 1996; BURSTEIN et al.³, 1997). Contudo, STEPHAN³⁶ (1999) relata que a hidroxiapatita sintética possui microestrutura, tamanho do cristal e tipo de ossificação muito diferente do osso natural, o que pode produzir resposta biológica indesejada. O osso cortical bovino é uma HA natural com composição química, porosidade, tamanho e forma semelhantes à humana, que parece ter um comportamento mais fisiológico durante a regeneração óssea.

Certamente, a reconstrução esquelética sofrerá um salto tecnológico significativo com o crescente estudo e desenvolvimento dos fatores de indução da formação óssea associados a diversos sistemas de carregamento (LINDHOLM²³, 1997; LEVINE et al.²², 1997; CONCANNON et al.⁶, 1997; MORONE; BODEN²⁹, 1998; RODRIGUEZ SANCHEZ et al.³⁴, 2000). O papel de carreador dos fatores de indução óssea potencialmente pode ser desempenhado pelo osso bovino cortical ou medular, macro ou microgranular, desproteínizado, como já foi demonstrado em estudos clínicos (YUKNA et al.⁴³, 1998). Além de fornecer uma estrutura de suporte e osteocondução, podem prover também um alto conteúdo de cálcio e fósforo, essenciais para a neoformação do tecido ósseo (DAMIEN et al.⁴, 1995; SCIADINI et al.³⁵, 1997).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta tecidual frente a dois tipos de osso inorgânico cortical bovino microgranular, um desproteínizado à 100°C (Gen-Ox[®], Baumer S.A.) e outro a 1000°C (preparado no laboratório de Bioquímica da FOB-USP), implantados em tecido subcutâneo de ratos. Pretende-se ainda avaliar a correlação entre as características microscópicas do tecido reacional com a atividade específica da fosfatase ácida de alta massa molecular relativa (um marcador lisossomal) e da fosfotirosina proteína fosfatase, uma das enzimas responsáveis pelo controle do processo de proliferação e diferenciação celular (GRANJEIRO et al.¹⁴, 1997a).

MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 60 ratos albinos da linhagem wistar (*Rattus Novergicus*), machos adultos (160g), foram divididos aleatoriamente em grupos de 5 animais cada, os quais foram sacrificados 10, 20, 30 e 60 dias após a implantação do material.

Grupos Experimentais

Grupo I: Controle, cápsulas de colágeno vazias;

Grupo II-100: Partículas de osso cortical microgranular (250-1000 μm), desproteinizadas a 100°C (Gen-Ox®, Baumer S.A., Registro MS nº 103.455.00001) e armazenadas em cápsulas de colágeno;

Grupo III-1000: Partículas de osso cortical microgranular (250-1000 μm), desproteinizadas a 1000°C (preparados no laboratório de Bioquímica da FOB-USP) e armazenadas em cápsulas de colágeno.

Todos os materiais implantados utilizados para o enxerto, foram esterilizados previamente por radiação gama.

Preparo dos animais e procedimentos de implantação

Cada animal foi anestesiado dentro de uma campânula por inalação de éter etílico, sendo mantidos neste estado por todo o período operatório com o auxílio de um pequeno recipiente contendo algodão embebido em éter. Quando imóveis, foram colocados sobre um campo esterilizado e imobilizados para o ato operatório. A tricotomia e a assepsia com gaze embebida em álcool iodado foram realizadas na região dorsal dos animais, na qual uma incisão reta (3cm, lâmina 10), no sentido crânio-caudal, expôs o tecido conjuntivo subcutâneo. A divulsão do tecido conjuntivo, foi realizada à direita e à esquerda da linha crânio-caudal, suficientemente distantes para a acomodação de duas cápsulas de colágeno que continham os implantes. Suturas descontínuas (fio de seda 4.0) foram realizadas para uma perfeita coaptação das bordas, seguida de anti-sepsia com álcool iodado e removida após uma semana. Por todo o período experimental os animais receberam dieta normal "ad libitum" composta de ração e água.

Obtenção das biópsias e preparo histotécnico

Decorridos os períodos experimentais, particulares a cada grupo de animal, estes foram novamente anestesiados e submetidos a cirurgia, sendo os procedimentos realizados de forma idêntica à fase cirúrgica inicial para a implantação dos materiais. As peças histológicas foram removidas e os animais sacrificados pela inalação constante de éter etílico até a parada respiratória. Imediatamente após a remoção das peças, estas foram imersas em formalina tamponada a 10% por um período de 24 horas para a fixação dos tecidos e, em seguida, lavadas em água corrente por 5

horas. Cada peça cirúrgica foi cortada no sentido do longo eixo antes da inclusão em parafina realizada de acordo com a técnica de rotina da Disciplina de Histologia da FOB-USP. Cortes de 6 μm de espessura obtidos com navalhas descartáveis (Jung-Reichardt, Alemanha), foram corados com hematoxilina-eosina segundo a técnica convencional.

Microscopia (análise qualitativa):

A morfologia e a regularidade superficial das partículas dos vários materiais empregados no estudo, assim como a resposta biológica dos tecidos subcutâneos a esses materiais foram analisados ao microscópio óptico (Zeiss).

Determinação da atividade enzimática.

A outra peça cirúrgica removida foi homogeneizada em tampão acetato 100 mM, pH 5, contendo EDTA e b-mercaptoetanol 1 mM e centrifugada a 20.000 rpm durante 30 minutos. O sobrenadante constituiu o extrato utilizado para a quantificação de proteína, da fosfatase ácida total e da atividade fosfotirosina proteína fosfatase, através da inibição diferencial por tartarato, fluoreto, e p-hidróxidomercuribenzoato (pHMB), como descrito anteriormente (Granjeiro et al., 1997a; Granjeiro et al., 1997b; Buzalaf et al., 1998).

Uma unidade de atividade enzimática (UE) é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de p-Nitrofenol por minuto.

A atividade enzimática específica (AE) é expressa como unidade de atividade enzimática por miligrama de proteína (AE=UE/mg).

Determinação do p-nitrofenol (Fosfatase Ácida Total, FAT)

Para um volume final de 1,0 ml, a reação foi iniciada pela adição de 0,05 ml do extrato a um meio contendo 100 mM de tampão acetato de sódio, pH 5,0 e 5 mM do substrato pNPP (p-nitrofenil fosfato). A paralisação ocorreu pela adição de 1,0 ml de NaOH 1,0 M, após incubação por 10 minutos a 37°C. Nos controles, a enzima foi adicionada após a colocação do NaOH. A medida da absorção foi feita a 405nm, $\epsilon=18000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, (espectrofotômetro Ultrospec II, Pharmacia).

Determinação da Fosfatase Ácida Lisossomal (FAL)

A atividade da Fosfatase Ácida Lisossomal (FAL) foi determinada como descrito acima, exceto pela adição de p-hidroximercuribenzoato (pHMB) 1 mM, um potente inibidor da fosfatase ácida de baixa massa molecular relativa (FABMr). A diferença entre a atividade específica da FAT e a FAL resulta na atividade da FABMr.



Determinação da tirosina

A atividade sobre a tirosina fosfato (Tyr-P) foi realizada nas mesmas condições descritas acima, pelo método direto, exceto pela utilização da tirosina fosfato (5 mM) como substrato e pela presença de 10 mM de NaF e Tartarato (inibidores da fosfatase ácida lisossomal). A quantificação do produto formado (tirosina) foi dada pela leitura da absorbância em 293nm, $\epsilon=2411\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, (Granjeiro et al., 1997b).

Determinação de proteína

A proteína foi quantificada pelo método de Lowry como descrito anteriormente (Hartree, 1972), utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. A leitura da Absorbância foi realizada a 660 nm após 30 minutos de espera a temperatura ambiente. A albumina de soro bovino foi utilizada como padrão.

RESULTADOS

Em mamíferos, a fosfatase ácida pode ser dividida em 3 grandes classes: fosfatase ácida de alta massa molecular relativa (Mr), de Mr intermediária e de baixa Mr. A fosfatase de alta Mr é também conhecida como um clássico marcador lisossomal e encontra-se sempre elevada nos quadros inflamatórios ou infecciosos, durante o remodelamento celular ou tecidual e em algumas patologias. A de baixa Mr é reconhecida hoje como uma proteína tirosina fosfatase relacionada com o controle do processo de proliferação, diferenciação e transformação celular (Granjeiro et al., 1997a; Ramponi

e Stefani, 1997). A isoforma de Mr intermediária, nos ossos, é responsável pela reabsorção óssea. Em outros tecidos sua função ainda é obscura, embora tenha seus níveis aumentados em algumas patologias como a leucemia retículo endotelial (Ketchan et al., 1985).

Neste estudo, os níveis da FABMr e Tyr-P foram medidos. A FAT é a atividade obtida em pH 5,0 utilizando o pNPP como substrato. Quando esta reação é realizada na presença de pHMB, toda a atividade fosfotirosina fosfatase (igual a FABMr) é inibida, restando apenas a atividade da FAL (Fosfatase ácida lisossomal). A isoforma de Mr intermediária tem baixa atividade no tecido subcutâneo e é parcialmente inibida por pHMB, sendo possível desprezar sua atividade residual. A atividade da FABMr é obtida, então, a partir da função entre FAT e FAL (FABMr=FAT-FAL).

Análises enzimáticas

Os resultados da atividade específica de cada enzima foram comparados entre os grupos e entre os períodos experimentais. Esses dados são apresentados na Tabela 1.

De modo geral, no grupo controle, a FAT manteve-se com atividade específica (AE) constante durante os 4 períodos experimentais (cerca de 17 nmol/min mg). A FAL só foi detectada no primeiro e terceiro períodos, em contração à Tyr-P detectada nos segundo e último períodos.

Para o Grupo II-100 (Gen-Ox®, Baumer S.A), a atividade da FAT diminuiu com o decorrer do tempo, mas voltou a elevar-se no último período experimental, similarmente às outras enzimas analisadas neste grupo. No Grupo III-1000, a AE da FAT mantém-se elevada até o período de 20 dias, diminui aos 30 dias, elevando-se

TABELA 1 - Determinação da Atividade Específica da Fosfatase Ácida e Tirosina Fosfatase nos Extratos de Tecido Subcutâneo de Rato

Atividade Enzimática	Períodos Experimentais (Dias)											
	10			20			30			60		
	Ctrl ¹	II ²	III ³	Ctrl	II	III	Ctrl	II	III	Ctrl	II	III
FAT	15,8 (0,4)	52,4 (0,2)	26,8 (2,3)	18,4 (0,3)	40,1 (0,5)	31,5 (0,8)	19,2 (0,1)	17,6 (0,6)	15,1 (0,3)	17,3 (2,3)	25,4 (0,4)	20,2 (0,6)
FABMr	6,8 (0,3)	35,6 (1,8)	13,2 (0,7)	18,4 (0,9)	16,3 (0,8)	8,9 (0,5)	10,3 (0,5)	8,2 (0,4)	7,3 (0,4)	17,2 (0,9)	10,0 (0,5)	5,4 (0,3)
FAL	9,0 (0,4)	16,9 (0,9)	13,6 (0,8)	0,0 (0,0)	24,5 (0,1)	22,4 (0,6)	8,9 (0,3)	9,4 (0,2)	7,8 (0,4)	0,0 (0,0)	15,4 (0,4)	14,8 (1,4)
Tyr-P	0,4 (0,03)	12,2 (1,3)	0,2 (0,2)	7,0 (0,2)	10,5 (2,0)	1,3 (0,3)	0,4 (0,7)	0,5 (0,3)	0,8 (0,5)	7,0 (1,1)	2,6 (0,6)	0,9 (0,3)

¹Ctrl = Grupo Controle

²II = Grupo II-100

³III = Grupo III-1000

*Atividade Específica (nmol/min.mg) e, entre parêntesis, erro padrão das determinações realizadas em triplicata para n=5.

no último período. A atividade das fosfatases e Tyr-P é mais elevada no Grupo II-100 que no III-1000 em todos os períodos experimentais, principalmente devido à atividade da FABMr. O perfil geral da AE das fosfatases quantificadas mostra uma diminuição progressiva da atividade, seguida de um pequeno aumento no último período.

As proteínas tirosina fosfatases (PTP) constituem uma superfamília dividida em 4 sub-classes: PTP Específica, Tipo VH1, PTP de BMr (= FABMr) e a cdc25. Destas, apenas a última está associada à entrada na fase mitótica (M) do ciclo celular. As outras três atuam contrapondo-se à atividade tirosina quinase, ou seja, inibindo a proliferação e diferenciação celular. A PTP de BMr era inicialmente conhecida como uma fosfatase ácida de BMr, e a diminuição de sua AE também pode indicar uma maior proliferação celular a partir de 30 dias, pois está especificamente relacionada ao controle negativo da proliferação celular (Ramponi e Stefani, 1997).

Análises microscópicas

Os resultados referentes à análise microscópica dos diferentes materiais (Grupo Ctrl, Grupo II-100 e Grupo III-1000) nos diferentes períodos são descritos a seguir.

Período de 10 dias (Figuras 1A, C e E):

Observamos no grupo controle áreas focais com grande celularidade, caracterizadas por células volumosas contendo material no citoplasma, sugestivas de macrófagos contendo parte da cápsula de colágeno implantada.

Neste período notou-se a presença de um intenso infiltrado inflamatório crônico rico em macrófagos e células gigantes multinucleadas inflamatórias (CGMIs) circunscrevendo as partículas de osso cortical bovino microgranular desproteínizado a 100°C (Gen-Ox®, Baumer S.A.), bem como interagindo com fragmentos da cápsula de colágeno utilizada como carreador do material. Este processo inflamatório encontrava-se organizado como um granuloma circunscrito perifericamente por um discreto fibrosamento tecidual. Na região central do granuloma formado os fenômenos inflamatórios agudos como a presença do exsudato e do infiltrado inflamatório rico em polimorfonucleares eram observados ao redor das partículas. As proliferações fibroblástica e angioblástica foram intensas, refletindo as necessidades metabólicas do granuloma.

Na região subcutânea dos animais onde foi implantado o osso cortical microgranular desproteínizado a 1000°C (Grupo III-1000), observamos um intenso infiltrado inflamatório crônico, caracterizado por macrófagos e CGMIs. A proliferação fibroblástica e angioblástica era leve e o grau de fibrosamento moderado. Aos 10 dias, já observamos algumas células inflamatórias no interior das partículas implantadas.

Período de 20 dias

O grupo controle já apresentava um infiltrado inflamatório menos intenso que no período anterior, com

uma moderada proliferação de vasos sanguíneos de fibroblastos. Em algumas regiões notavam-se pequenos focos com macrófagos contendo material fagocitado sugestivo de cápsula de colágeno.

Com 20 dias as características microscópicas (Grupo II-100) indicavam uma maior intensidade do infiltrado inflamatório crônico associado a um maior fibrosamento do granuloma, quando comparados com o período anterior. Fragmentos da cápsula de colágeno em franco processo de reabsorção pelos macrófagos e células gigantes multinucleadas (CGMIs) também foram observados. As proliferações fibroblástica e angioblástica eram moderadas e inúmeros capilares sanguíneos neoformados podiam ser observados entre as partículas implantadas.

Nos animais do Grupo III-1000, visualizamos um infiltrado inflamatório leve a moderado, com macrófagos e células gigantes multinucleadas inflamatórias. As proliferações fibroblástica e angioblástica eram mais intensas e o grau de fibrosamento moderado. Também observamos células inflamatórias em íntimo contato com as partículas, como no período anterior.

Período de 30 dias

No grupo controle notou-se um maior fibrosamento além da presença de inúmeros capilares sanguíneos em relação aos períodos anteriores. O infiltrado inflamatório crônico era discreto porém existiam alguns focos contendo macrófagos como visto nos períodos anteriores.

Poucas diferenças microscópicas foram observadas no granuloma do Grupo II-100 em relação ao grupo experimental de 20 dias. Os fragmentos da cápsula de colágeno eram pouco perceptíveis neste período, demonstrando uma maior reabsorção deste material.

Para o Grupo III-1000, observou-se na região subcutânea um menor infiltrado inflamatório crônico, além de uma intensa proliferação fibroblástica e moderada proliferação angioblástica, e um fibrosamento também intenso.

Período de 60 dias (Figura 1B, D e F)

No grupo controle havia focos de células inflamatórias crônicas na região subcutânea dos animais. Porém, o tecido de granulação era discreto, mas rico em vasos sanguíneos e fibroblastos.

Aos 60 dias, as partículas do material do Grupo II-100 apresentavam-se circunscritas ora por fibras colágenas bem organizadas, ora por células gigantes multinucleadas inflamatórias e alguns macrófagos. Pequenas partículas da cápsula de colágeno ainda estavam presentes neste período experimental.

Observamos um tecido granulomatoso formado adjacente ao material do Grupo III-1000 mostrando um infiltrado inflamatório crônico discreto. A proliferação fibroblástica e angioblástica era semelhante ao período anterior (30 dias) deste mesmo grupo experimental.

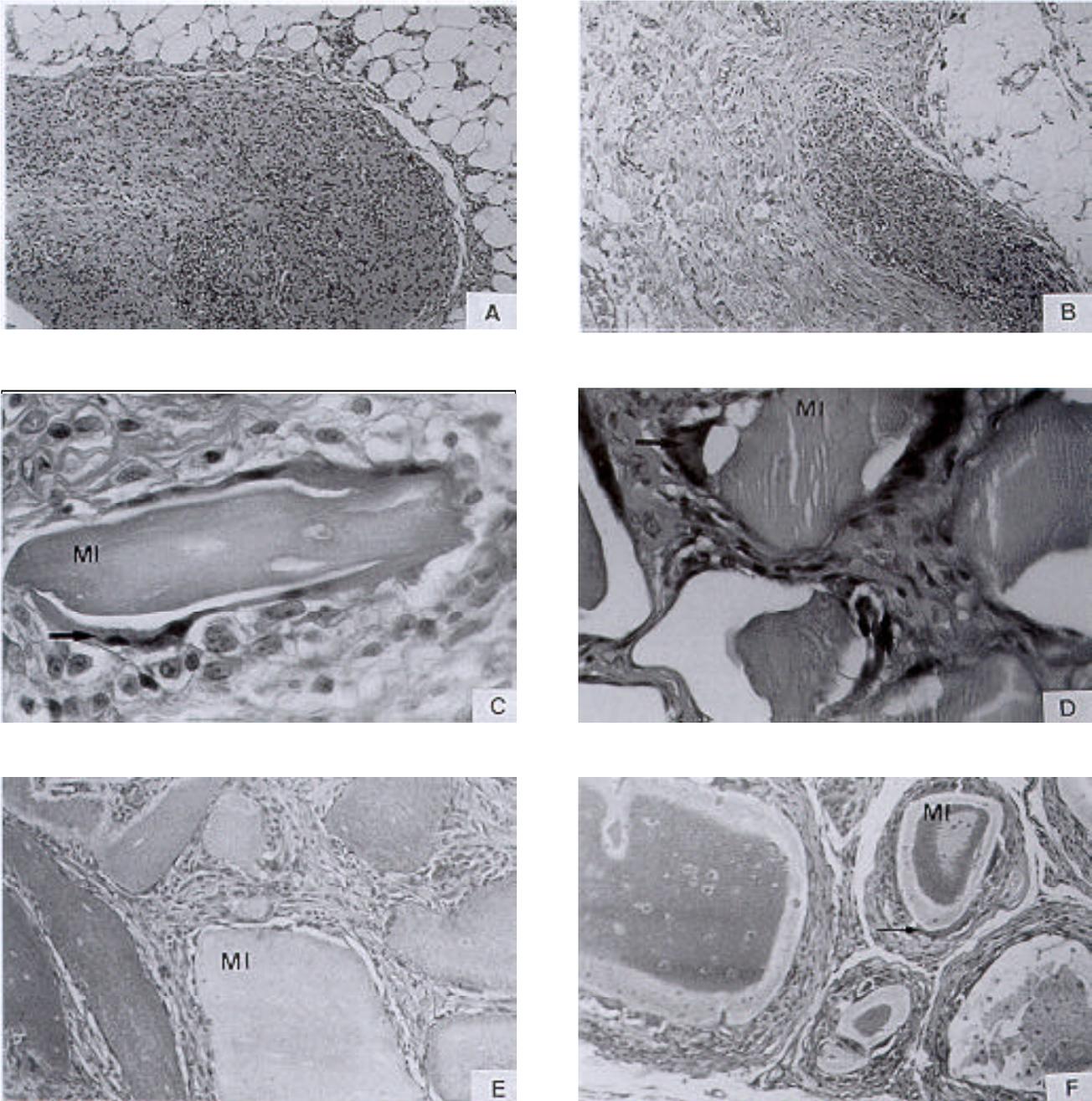


FIGURA 1 - Aspecto microscópico dos implantes de cápsulas de colágeno vazias (A, 10 dias; B, 60 dias), Grupo II-100 (C, 10 dias; D, 60 dias) e Grupo III-1000 (E, 10 dias; F, 60 dias). No grupo controle (A e B) ocorre diminuição do infiltrado inflamatório após o período de 60 dias (B). É possível encontrar partículas do osso cortical (MI) desproteinizado a 100 (C e D) ou 1000°C (E e F) envolvidas por células gigantes multinucleadas inflamatórias (CGMIs, setas). Aumento Original: 10x (A e B); 40x (E e F); 100x (D); 160x (C). Coloração H.E.

DISCUSSÃO

A identificação bioquímica da atividade enzimática dos diferentes tipos de fosfatase ácida não é comum na literatura, contudo, é possível verificar comportamentos distintos para cada fosfatase. O exato papel de cada uma delas permanece ainda sob investigação, porém é possível correlacionar a maior atividade da FAL com o grau de mobilização das células de defesa (polimorfonucleares

e macrófagos), uma vez que estas células são ricas em lisossomos.

A implantação subcutânea ou intramuscular de matriz óssea desvitalizada e desmineralizada pode induzir a osteogênese em um sítio ectópico (URIST; STRATES⁴⁰, 1970; REDDI; HUGGINS³³, 1972). Por outro lado, a implantação de matriz óssea desvitalizada e mineralizada no tecido subcutâneo ou intramuscular inibe esta capacidade indutiva (URIST; STRATES⁴⁰, 1970).

REDDI; HUGGINS³³ (1972) identificaram células gigantes multinucleadas, ricas em ácidos orgânicos presumivelmente para dissolução mineral, no sítio de implantação de matriz mineralizada. Eles propuseram que a presença de matriz mineralizada sozinha ou em combinação com matriz desmineralizada, inibia a osteogênese. A natureza das células gigantes multinucleadas inflamatórias (CGMIs) recrutadas nos enxertos subcutâneos de partículas mineralizadas é ainda motivo de controvérsia na literatura.

KELLY; SCHNEIDER²⁰ (1991) implantaram matriz desmineralizada, mineralizada e a combinação de ambas, na região subcutânea dorsal de ratos adultos jovens. Eles verificaram nos implantes mineralizados a presença de CGMIs que não possuíam atividade fosfatase tartarato resistente (TRAP) nem morfologia similar a osteoclastos. No implante de matriz desmineralizada, a maioria das CGMIs demonstrou uma expressão significativa da TRAP e morfologia similar a osteoclastos, enquanto que a implantação combinada dos materiais proporcionou a presença desses dois tipos de CGMIs.

Acredita-se hoje (GLOWACKI¹¹, 1986; KELLY; SCHNEIDER²⁰, 1991), que existam dois tipos de células multinucleadas ao redor do implante de partículas minerais de osso desvitalizado, um tipo com aspecto microscópico e estrutural típico de CGMIs com evidência de degradação óssea, e um outro tipo, em menor quantidade, e com aparência microscópica de osteoclastos mas sem a borda em escova característica. Para estes autores a reabsorção pode ocorrer tanto por CGMIs como por osteoclastos. No presente estudo, utilizando microscopia óptica, não verificamos borda em escova nas CGMIs em volta dos materiais implantados, em qualquer período experimental. No entanto, a ausência de lacunas de Howship e a aparente regularidade de contorno das partículas sugerem que as CGMIs observadas não são do tipo osteoclasto (YOUNG et al.⁴², 1999).

O implante do osso bovino microgranular desproteínizado induziu na região subcutânea, como pode ser observado na Figuras de 1C a 1F, um granuloma do tipo corpo estranho, geralmente desencadeado por partículas inertes que atraem macrófagos mas são incapazes de ativar o sistema imune (COTRAN; KUMAR; COLLINS⁷ 1999). Neste trabalho provavelmente isto ocorreu porque a eliminação da parte orgânica protéica do osso bovino permitiu que o material apresentasse um comportamento biológico semelhante ao de uma partícula inerte, sem interação com as células de defesa macrofágicas atraídas para o local. A ausência de uma maior ativação dos macrófagos pelas partículas de osso bovino microgranular desproteínizado a 100°C (Gen-Ox[®], Baumer S.A.) ou 1000°C pode ser confirmada ao longo do tempo pelo aumento do fibrosamento do granuloma formado e também por uma diminuição da atividade da FAT entre o período experimental de 10 dias e o de 60 dias.

Resultados positivos relacionados com a utilização

de osso inorgânico bovino foram relatados anteriormente. STEPHAN³⁶ (1999) sugere o grande potencial deste tipo de material quanto a seu emprego como carreador de proteínas e fatores de crescimento, devido à capacidade de osteoblastos em culturas crescerem aderidos à sua superfície. YUKNA et. al.⁴³, (1998) relataram que o osso inorgânico bovino em combinação com um peptídeo recombinante de 15 aminoácidos derivado do colágeno Tipo I proporcionou resultados clínicos melhores que o DFDBA ou o retalho total, para o tratamento de defeitos ósseos periodontais em humanos.

A matriz inorgânica derivada de osso bovino é uma hidroxiapatita xenogênica, micro porosa e natural, cujo similar nos Estados Unidos está aprovado pela Food and Drug Administration para uso como material de preenchimento (YUKNA et al.⁴³, 1998). Neste trabalho, as duas partículas de osso bovino submetidas a diferentes temperaturas de desproteínização proporcionaram uma resposta tecidual no subcutâneo de ratos similar àquela descrita para o enxerto alógeno mineralizado nas mesmas condições (KELLY; SCHNEIDER²⁰, 1991), confirmando que o osso bovino pode ser utilizado adequadamente como material de preenchimento.

C O N C L U S ã O

A implantação de matriz óssea mineralizada e desproteínizada no tecido subcutâneo de ratos, mesmo em se tratando de enxerto alo gênico, induz a formação de um granuloma tipo corpo estranho com recrutamento de macrófagos e CGMIs. Os resultados obtidos no atual trabalho mostraram que o osso mineralizado bovino, quer desproteínizado a 100 ou 1000°C, promove uma resposta tecidual semelhante à implantação subcutânea de osso autógeno ou alógeno mineralizado. Isto nos permitiu concluir que os materiais testados podem ser usados como material de preenchimento osteo-substitutos e como potenciais candidatos a carreadores das proteínas morfogenéticas do osso.

A G R A D E C I M E N T O S

Os autores agradecem os servidores da FOB-USP, Ovídio dos Santos Sobrinho, Gilmar Vicente da Silva, Luiz Carlos da Silva, Erasmo Gonçalves da Silva, Daniele Santi Ceolin, pelo auxílio técnico prestado durante a execução deste trabalho.

A B S T R A C T

The aim of this study was to investigate the biocompatibility of two mineralized bone graft produced from bovine cortical bone that were devitalized at 100°C (Gen-Ox[®], Baumer S.A.) or at 1000°C (prepared in our laboratory). Particulate (250-1000 µm) bone grafts were

implanted in the dorsal rat subcutaneous pocket and, after 10, 20, 30 and 60 days post-implantation, the reaction tissues were removed and processed for morphological and biochemical analysis. Morphologically, mono and multi-nucleated giant cells were found in close apposition to the particles, resembling a foreign body reaction, similarly to subcutaneous response to implants of autogenous bone or allografts. Devitalization temperature did not induce significant differences in acid phosphatase levels at the end of experimental period. We conclude that bovine cortical bones devitalized at 100°C (Gen-Ox®, Baumer S.A.) or 1000°C (prepared in our laboratory) could be used as bone replacement graft materials and/or potential carriers for bone morphogenic proteins.

Uniterms: Biomaterials; Bone graft; Phosphotyrosine protein phosphatase; Acid phosphatase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01- ARAGONÊS, A. et al. Uso de Hidroxiapatita microgranular em pulpotomia. **Rev. gaucha Odont.**, v.40, n.6, p.349-50, 1992.
- 02- BONACHELLA, W.C. et al. Manutenção do rebordo alveolar com hidroxiapatita microgranular. **Rev. gaucha Odont.**, v.40, n.3, p.212-14, 1992.
- 03- BURSTEIN, F.D. et al. The use of porous granular hydroxyapatite in secondary orbitocranial reconstruction. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.100, n.4, p.869-74, 1997.
- 04- BUZALAF, M.A.R. et al. Kinetic characterization of bovine lung low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase. **Expe. Lung. Res.**, v.24, n.3, p.269-72, 1998.
- 05- CIRELLI, J.A. et al. Evaluation of anionic collagen membranes in the treatment of class II furcation lesions: a histometric analysis in dog. **Biomaterials**, v.18, p.1227-34, 1997.
- 06- CONCANNON, M.J. et al. Bone induction using demineralized bone in the rabbit femur: a long-term study. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.99, n.7, p. 1983-88, 1997.
- 07- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins pathologic basis of disease**. 6 ed., Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1999. p.50-88.
- 08- DAMIEN, C.J.; PARSONS, J.R. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. **J. Appl. Biomater.**, v.2, n.3, p.187-208, 1991.
- 09- DAMIEN, C.J. et al. Effect of demineralized bone matrix on bone growth within a porous HA material: a histologic and histometric study. **J. Biomater. Appl.**, v.9, n.3, p.275-88, 1995.
- 10- DE GROOT, K. Bioceramics consisting of calcium phosphate salts. **Biomaterials**, v.1, n.1, p.47-50, 1980.
- 11- GLOWACKI, J. Osteoclastic Feature of Cells that Resorb Bone Implants in Rats. **Calcif. Tissue Int.**, v.39, n.2, p.327-31, 1986.
- 12- GOSAIN A.K. Hydroxyapatite cement paste cranioplasty for the treatment of temporal hollowing after cranial vault remodeling in a growing child. **J. Craniofac. Surg.**, v.8, n.6, p.506-11, 1997.
- 13- GRANJEIRO, J.M. et al. Características físico-químicas de Hidroxiapatita para uso clínico. **Rev. gaucha Odont.**, v.40, n.2, p.130-34, 1992.
- 14- GRANJEIRO, J.M. et al. Purification and Characterization of a Low-Molecular-Weight Bovine Kidney Acid Phosphatase. **An. Acad. Brás. Ci.**, v.69, n.4, p.451-60, 1997a.
- 15- GRANJEIRO, J.M. et al. Bovine kidney low molecular weight acid phosphatase: FMN-dependent kinetics. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, v.41, n.6, p.1201-6, 1997b.
- 16- GREGHI, S.L.A.; CAMPOS Jr., A. Estudo comparativo da biocompatibilidade de materiais cerâmicos diversos em tecido subcutâneo de ratos. **Rev. Fac. Odont. Bauru**, v.2, n.4, p.73-81, 1994.
- 17- HARTREE, E.F. Determination of proteins: a modification of the Lowry method that give a linear photometric response. **Anal. Biochem.**, v.48, n.2, p.422-27, 1972.
- 18- HERCULIANI, P. P.; CESTARI, T. M.; TAGA, E. M.; TAGA, R. Tratamento de defeito ósseo perene em calvária de cobaia com membrana de cortical óssea bovina liofilizada associada ou não a enxerto ósseo bovino desmineralizado. **Rev. bras. Implant.** v.7, n. 2, p.7-14, 2000.
- 19- JARCHO, M. Calcium phosphates ceramics as hard tissues prosthetics. **Clin. Orthop. Rel. Res.**, v.157, p.259-78, 1981.
- 20- KELLY, J.D.; SCHNEIDER, G.B. Morphological and Histochemical Comparison of Cells Elicited by Ectopic Bone Implants and Tibial Osteoclasts. **Amer. J. Anat.**, v.192, n.3, p.45-54, 1991.
- 21- KETCHAM, C.M. et al The type 5, acid phosphatase from spleen of humans with hairy cell leukemia. **J. Biol. Chem.**, v.260, p.5768-76, 1985.
- 22- LEVINE, J.P. et al. Bone morphogenetic protein promotes vascularization and osteoinduction in preformed hydroxyapatite in the rabbit. **Ann. Plast. Surg**, v.39, n.2, p.158-68, 1997.
- 23- LINDHOLM, T.S. In: **Skeletal reconstruction and bioimplantation**. Landes Bioscience and Chapman and Hall, Austin, 1997, p. 251.
- 24- MARKS, S.C.; HERMEY, D.C. The structure and development of bone. In: BILEZIKIAN, J.P.; RAISZ, L.G.; RODAN, G.A., **Principles of Bone Biology**. London, Acad. Press, 1996. Cap 1, p.3-14.
- 25- MARX, R.E.; SAUNDERS, T.R. Reconstruction and rehabilitation of cancer patients. In: FONSECA, R.J.; DAVIS, W.H. **Reconstructive Preprosthetic Oral and Maxillofacial Surgery**. Philadelphia, Saunders; 1986 p.347-428.

- 26- MARZOLA, C. et al. Implantes de Biohapatita + Osseobond + Membrana Reabsorvível Dentoflex+Aglutinante Dentoflex. Apresentação de casos clínicos. **Rev. bras. Ciênc. Estomat.**, v.1, n.2, p.51-63, 1996.
- 27- MASTERS, D.H. Implants. Bone and bone substitutes. **Calif. dent. Ass. J.**, v.16, n.1, p.56-65, 1988.
- 28- MISCH, C.E.; DIETSH, F. Bone-grafting materials in implant dentistry. **Implant Dentistry**, v.2, n.3, p.158-67, 1993.
- 29- MORONE, M.A.; BODEN, S.D. Experimental posterolateral lumbar spinal fusion with a demineralized bone matrix gel. **Spine**, v.23, n.2, p.159-67, 1998.
- 30- NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH Consensus Development Conference Statement on Dental Implants. **J. Dent. Educ.**, v.52, p.824-27, 1989.
- 31- OLIVEIRA, D.T. et al. Hidroxiapatita microgranular: comportamento biológico em tecido subcutâneo de ratos. **Rev. Odont. UNESP**, v.22, n.2, p.1997-202, 1993.
- 32- RAMPONI, G.; STEFANI, M. Structural, catalytic, and functional properties of low Mr phosphotyrosine protein phosphatases. Evidence of a long evolutionary history. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v.29, n.2, p.279-92, 1997.
- 33- REDDI, A.H.; HUGGINS, C. Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.69, p.1601-5, 1972.
- 34- RODRIGUEZ SANCHEZ, M. P.; MARZOLA, C.; TAGA, R. Avaliação microscópica em ratos (*Wistar Albinos*) de implantes de matriz de osso bovino liofilizado "BIOGRAFT"+proteína morfogenética+membrana reabsorvível de osso bovino liofilizado "dentoflex". **Rev. bras. Cirurg. Implant.**, v.7, n.26, p.32-40, 2000.
- 35- SCIADINI, M.F. et al. Evaluation of bovine-derived bone protein with a natural coral carrier as a bone-graft substitute in a canine segmental defect model. **J. Orthop. Res.**, v.15, n.6, p.844-57, 1997.
- 36- STEPHAN, E.B. Anorganic Bovine Bone Supports Osteoblastic Cell Attachment and Proliferation. **J. Periodont.**, v.70, n.4, p.364-69, 1999.
- 37- TAGA, E.M. Biomateriais para Uso em Clínica Médico-Odontológica. **Rev. bras. Cirurg. Implant.**, v.3, p.29-68, 1996.
- 38- TAGA, R.; CESTARI, T. M.; TAGA, E. M.; TAVANO, O.; GRANJEIRO, J. M. Evolução de enxertos ósseos autógenos e alógenos colocados em defeitos ósseos de tamanho crítico em calvária de cobaias. **Rev. bras. Cirurg. Implant.**, v.7, n.27, p.37-44, 2000.
- 39- URIST, M.R. Bone: formation by autoinduction. **Science**, v.150, n.698, p.893-99, 1965.
- 40- URIST, M.R.; STRATES, E.S. Bone formation in implants of partially and wholly demineralized bone matrix. **Clin. Orthop. Rel. Res**, v.71, p.271-78, 1970.
- 41- URIST, M.R. Bone transplants and implants. In: **Fundamental and Clinical Bone Physiology**. Philadelphia, J.B. Lippincott, 1980, p.331-68.
- 42- YOUNG, C. et al. A comparative study of anorganic xenogenic bone and autogenous bone implants for bone regeneration in rabbits. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v.14, n.1, p.72-76, 1999.
- 43- YUKNA, R. A. et al. Multi-Center clinical evaluation of combination anorganic bovine-derived hidroxyapatite matrix (ABM)/Cell Binding Peptide (P-15) as a bone replacement graft material in human periodontal osseous defects. 6-month results. **J. Periodont.**, v.69, n.6, p.655-663, 1998.
- 44- ZITZMANN, N.U. et al. Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v.12, n.6, p.844-52, 1997.