

# Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular a enxertos de osso cortical bovino em subcutâneo de ratos. Efeito do tamanho da partícula

*Microscopic and biochemical analysis of the cellular response to cortical bovine grafts implanted in rat subcutaneous. Effect of particle sizes*

**Cristina Miguel SICCA**

**Rodrigo Cardoso de OLIVEIRA**

Alunos do Curso de Odontologia, FOB-USP.

**Thelma Lopes da SILVA**

**Tânia Mary CESTARI**

Biólogas – Técnicas do Departamento de Ciências Biológicas, FOB-USP.

**Denise Tostes OLIVEIRA**

Professora Doutora 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.

**José Ricardo KINA**

Professor Doutor do Departamento de Periodontia, UNESP-Araçatuba.

---

**E**sse trabalho teve o propósito de avaliar comparativamente a reposta celular em subcutâneo de ratos ao enxerto de osso cortical bovino desproteínizado a 100°C (Gen-Ox<sup>®</sup>, Baumer S.A.), na forma microgranular (250-1000 mm) e macrogranular (1000-2000 mm). Após 10, 20, 30 e 60 dias da implantação dos materiais, os animais foram sacrificados e as peças histológicas removidas. A análise microscópica mostrou para ambos os materiais uma reação granulomatosa tipo corpo estranho de baixa renovação contendo macrófagos e células gigantes multinucleadas em contato com o material. A partícula microgranular induziu uma resposta celular pouco mais exuberante após 10 dias da implantação, diferença que não foi mais observada após 60 dias. A análise bioquímica não acusou diferenças substanciais entre os grupos testados; a atividade específica da fosfatase ácida total foi mais acentuada no início do processo em resposta à forma microgranular, mas praticamente igualou-se ao grupo macrogranular depois de 60 dias. Podemos concluir que osso cortical bovino desproteínizado a 100°C, quer macro ou microgranular promoveu resposta tecidual semelhante à descrita para implantação subcutânea de osso autógeno ou alógeno mineralizado, sugerindo que possa ser usado como material de preenchimento osteosubstituto e como potencial carreador das proteínas morfogenéticas do osso.

**Unitermos:** Biomateriais; Enxerto ósseo; Fosfotirosina proteína fosfatase; Fosfatase ácida.

---

## Introdução

Na busca de desenvolver substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar a função de diversos tecidos, um novo campo interdisciplinar tem emergido com intenso vigor: a Engenharia de Tecidos. Várias estratégias têm sido utilizadas nesse campo<sup>27</sup>, como: 1) reposição com material sintético; 2) enxertos xenogênicos submetido à ligação cruzada para estabilização; 3) células presas em câmaras de difusão, microcápsulas ou que cresceram sobre substratos reabsorvíveis; 4) substâncias, capazes de induzir células ou tecidos (fatores de crescimentos e morfogenes), destinadas e/ou implantadas no local adequado.

Um dos poucos tecidos de mamíferos capazes de regeneração é o tecido ósseo. Em grande parte isto se deve a habilidade dos fatores de crescimento em direcionar as células-tronco para as vias condrogênica e osteogênica, e ao papel das forças mecânicas estimulando a remodelação óssea.

Contudo, grandes perdas ósseas ocasionadas por doenças ou acidentes simplesmente não reparam. Nas décadas recentes, temos aprendido a utilizar enxertos de outros locais do corpo para seu tratamento. No entanto, em vários pacientes, a quantidade e qualidade do osso que poderia ser utilizado simplesmente são insuficientes<sup>35</sup>. Com a finalidade de superar tais limitações, vários pesquisadores em todo mundo têm buscado materiais alternativos para substituição do enxerto autógeno.

As características desejadas de um material ósseo-substituto são: biocompatibilidade, previsibilidade e aplicação clínica sem riscos transoperatórios e seqüelas pós-operatórias mínimas, além de aceitação por parte do paciente. Apesar de não se ter encontrado um 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.

Os materiais para enxerto ósseo podem ser classificados como osteogênicos, osteoindutores e osteocondutores. Os osteogênicos referem-se a materiais orgânicos capazes de estimular a formação de osso diretamente a partir de osteoblastos<sup>25</sup>. Os osteoindutores são aqueles capazes de induzir a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos ou condroblastos, aumentando a formação óssea no local ou mesmo estimular a formação de osso em um sítio heterotópico<sup>39,41</sup>. Os materiais osteocondutores (geralmente inorgânicos) permitem a aposição de um novo tecido ósseo na sua superfície, requerendo a presença de tecido ósseo pré-existente como fonte de

células osteoprogenitoras<sup>24</sup>.

Deste modo, diversos materiais têm sido empregados na clínica odontológica em defeitos intra-ósseos, como: o enxerto alógeno mineralizado (FDDBA) ou o desmineralizado liofilizado (DFDBA), e as cerâmicas biocompatíveis como a de coral natural, fosfato de cálcio e hidroxiapatita sintética, vidros bioativos e polímeros<sup>5,17,26,38,43,45</sup>. Os derivados inorgânicos sintéticos como a hidroxiapatita e fosfato tricálcico, têm recebido grande atenção como materiais de preenchimento, espaçadores e substitutos para os enxertos ósseos, principalmente devido a sua biocompatibilidade, bioatividade e características de osteocondução em relação ao tecido hospedeiro<sup>1,2,3,7,9,12,15,28,20,37</sup>. Contudo, Stephan<sup>36</sup> (1999) relatou que a hidroxiapatita sintética possui microestrutura e tamanho do cristal muito diferente do osso natural, o que poderia produzir resposta biológica indesejada. O osso cortical bovino é uma hidroxiapatita natural de composição química, porosidade, tamanho e forma semelhantes à humana, que parece ter um comportamento mais fisiológico durante a regeneração óssea.

Durante o desenvolvimento de novos biomateriais a preocupação com a forma e o tamanho do material utilizado tem sido uma preocupação constante. Ainda é muito controverso o real papel do tamanho de partículas na resposta celular e tecidual aos enxertos ósseos<sup>10,33</sup>.

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<sup>43</sup>. 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<sup>8,32</sup>.

Continuando o estudo sistemático sobre potenciais carreadores para fatores de crescimento ou materiais para preenchimento ósseo<sup>29</sup>, objetivamos neste trabalho comparar a resposta tecidual ao osso inorgânico cortical bovino desproteínizado a 100°C (Gen-Ox®, Baumer S.A.), nas formas micro (250-1000 µm) e macrogranular (1000-2000 µm), implantados em tecido subcutâneo de ratos. Foi avaliada a correlação entre as características microscópicas do tecido reacional com a atividade específica da fosfatase ácida de alta massa molecular (um marcador lisossomal) e da fosfotirosina proteína fosfatase, uma classe de enzimas responsáveis pelo controle do processo de proliferação e diferenciação celular<sup>13,14</sup>.

## Material e Método

Um total de 60 ratos albinos da linhagem wistar (*Rattus norvegicus*), 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: Partículas de osso cortical microgranular, 0,1g (250-1000  $\mu\text{m}$ ), desproteinizadas a 100°C (Gen-Ox®, Baumer S.A., Registro MS nº 103.455.00001), acondicionadas em cápsulas de colágeno;

Grupo III: Partículas de osso cortical macrogranular, 0,1g (1000-2000  $\mu\text{m}$ ), desproteinizadas a 100°C (Gen-Ox®, Baumer S.A., Registro MS nº 103.455.00001), acondicionadas em cápsulas de colágeno.

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 o material. 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 à 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 e submetida a processamento para inclusão em Paraplast. Cortes de 6  $\mu\text{m}$  de espessura foram obtidos e corados pela técnica da hematoxilina-eosina.

Microscopia (análise qualitativa)

A morfologia e a regularidade superficial das partículas dos materiais empregados no estudo, assim como a resposta biológica do tecido subcutâneo a esses materiais foi analisada 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, seguida de centrifugação 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-hidroxidomercuribenzoato (pHMB), como descrito anteriormente<sup>4,13,14</sup>.

Uma unidade de atividade enzimática (UE) é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1  $\mu\text{mol}$  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. No controle, 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 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 (Tyr-P)

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)<sup>14</sup> foi dada pela leitura da absorvância em 293nm,  $\epsilon=2411 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### *Determinação de proteína*

A proteína foi quantificada pelo método de Lowry como descrito anteriormente<sup>16</sup>, utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. A leitura da Absorvância 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 solúvel 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<sup>13,30</sup>. A isoforma de Mr intermediária, nos ossos, está relacionada à reabsorção óssea. Em outros tecidos sua função ainda é obscura, embora tenha seus níveis aumentados em algumas patologias como a leucemia retículo endotelial<sup>22</sup>.

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 e FABMr é inibida, restando apenas a atividade da FAL. 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).

### *Resultado das análises enzimáticas*

Os resultados da atividade específica de cada enzima foram comparados entre os grupos e entre os períodos experimentais, sendo mostrados na Tabela 1.

No grupo controle, observou-se que a atividade da fosfatase ácida total (FAT) foi de 15,8 nmol/min mg, mantendo-se em torno deste valor até o final do experimento, similarmente à atividade específica determinada para a fosfatase ácida de baixa massa

molecular relativa (FABMr) nos períodos de 20 e 60 dias. A atividade específica da fosfatase ácida lisossomal (FAL) foi de 9,0 nmol/min mg no período de 10 e 30 dias, zerando nos outros períodos. Em contraposição, a atividade tirosina fosfatase (Tyr-P) foi máxima nos períodos de 20 e 60 dias, 7,0 nmol/min mg, mas desprezível nos períodos de 10 e 30 dias.

Comparando-se a atividade específica da FAT do grupo controle com os grupos que receberam osso cortical bovino macro ou microgranular desproteínizado a 100°C, notou-se um aumento de cerca de 3 vezes no período de 10 dias. Destaca-se que a atividade enzimática no grupo microgranular foi maior que no grupo macrogranular. Outra diferença reside na clara diminuição da atividade específica da FAT e da FABMr em função do tempo, mais acentuada no grupo macrogranular.

Com 20 dias, a atividade da FABMr no grupo macrogranular foi cerca de 80% menor que no período de 10 dias, mantendo-se constante até o final do experimento. Porém no grupo microgranular, a atividade da FAT e FABMr diminuíram mais lentamente, apresentando atividade específica de 25,4 e 10,0 nmol/min mg, respectivamente, 60 dias após a cirurgia.

A atividade específica para a FAL também apresentou resultados diferentes para os 3 grupos estudados. A atividade específica no período de 10 dias do grupo macrogranular foi de 14,9 nmol/min mg, diminuindo paulatinamente até o valor de 8,7 nmol/min mg após 60 dias. Para o grupo microgranular, houve um pequeno aumento na atividade específica no período de 20 dias (24,5 nmol/min mg) mantendo-se, após 60 dias, no valor de 15,4 nmol/min mg.

É importante ressaltar o perfil da atividade tirosina fosfatase nos diferentes grupos. Enquanto no controle houve um aumento na atividade específica tirosina fosfato, nos grupos macro e microgranular ocorreu o inverso, houve diminuição. A atividade tirosina fosfatásica foi máxima no período de 10 dias: 15,7 e 12,6 nmol/min mg nos grupos macro e microgranular respectivamente, zero no período de 30 dias no grupo macrogranular e 0,5 nmol/min mg no microgranular.

As proteínas tirosina fosfatases (PTP) constituem uma superfamília dividida em 4 subclasses: 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

**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 <sup>1</sup>	II	III	Ctrl	II	III	Ctrl	II	III	Ctrl	II	III	
<b>FAT</b>	15,8 <sup>*</sup> (0,4)	45,9 (1,1)	52,4 (0,2)	18,4 (0,3)	19,0 (0,3)	40,1 (0,5)	19,2 (0,1)	17,1 (1,7)	17,6 (0,6)	17,3 (2,3)	14,3 (0,1)	25,4 (0,4)
<b>FABMr</b>	6,8 (0,3)	30,9 (1,5)	35,6 (1,8)	18,4 (0,9)	6,4 (0,3)	16,3 (0,8)	10,3 (0,5)	6,9 (0,3)	8,2 (0,4)	17,2 (0,9)	5,3 (0,3)	10,0 (0,5)
<b>FAL</b>	9,0 (0,4)	14,9 (0,6)	16,9 (0,9)	0,0 (0,0)	12,6 (0,5)	24,5 (0,1)	8,9 (0,3)	10,2 (0,6)	9,4 (0,2)	0,0 (0,0)	8,7 (0,1)	15,4 (0,4)
<b>Tyr-P</b>	0,4 (0,03)	15,7 (1,9)	12,2 (1,3)	7,0 (0,2)	16,1 (0,4)	10,5 (2,0)	0,4 (0,7)	0,0 (0,0)	0,5 (0,3)	7,0 (1,1)	9,7 (1,4)	2,6 (0,6)

<sup>1</sup>Ctrl = Grupo Controle II = Grupo II (Microgranular) III = Grupo III (Macrogranular)

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

proliferação celular<sup>30</sup>.

### Resultado das análises microscópicas

Os resultados referentes à análise microscópica dos diferentes materiais (Grupos I, II e Grupo III) nos diferentes períodos são descritos a seguir.

#### Período de 10 dias

Observamos no Grupo I (Figura 1A) 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 tanto do Grupo II (Figura 2A) como do Grupo III (Figura 3A), bem como interagindo com fragmentos da cápsula de colágeno presentes. 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

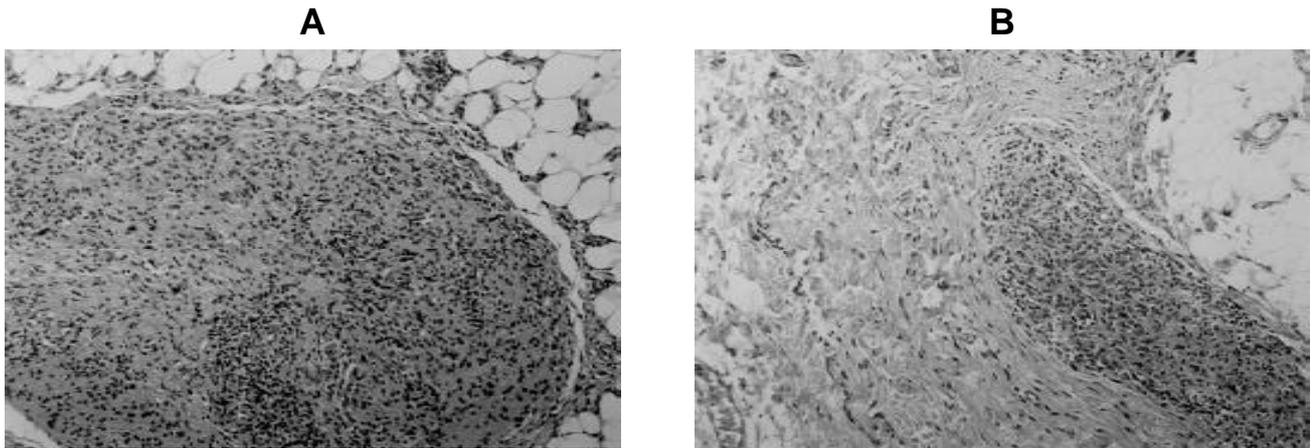
em polimorfonucleares eram observados ao redor das partículas. As proliferações fibroblástica e angioblástica foram intensas, refletindo as necessidades metabólicas do granuloma. Os aspectos microscópicos foram semelhantes entre os Grupo II e Grupo III, exceto pela presença de uma maior celularidade no granuloma induzido pelos implantes do Grupo II.

#### Período de 20 dias:

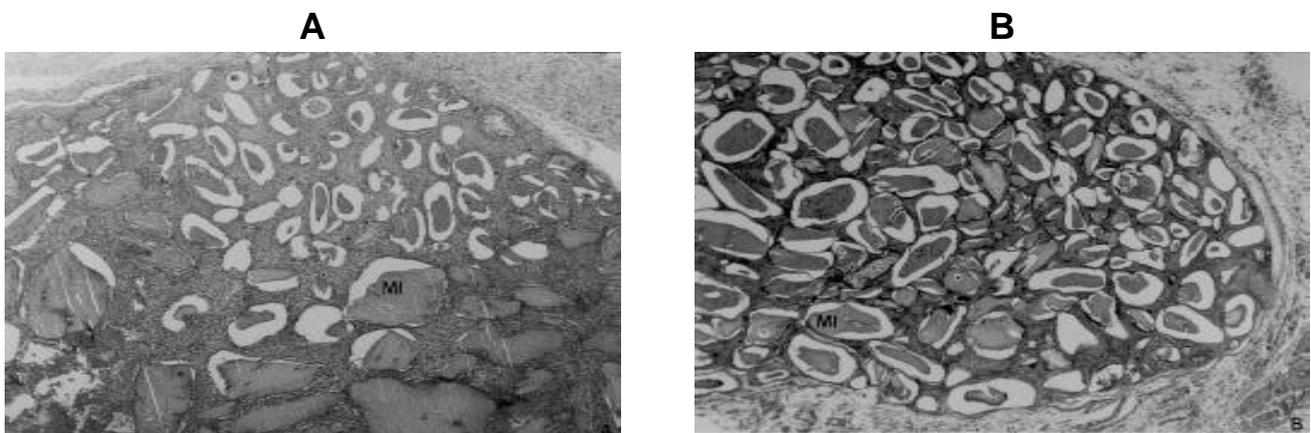
O grupo I já apresentava um infiltrado inflamatório menos intenso que no período anterior, com uma moderada proliferação de vasos sanguíneos e fibroblastos. Em algumas regiões notavam-se pequenos focos com macrófagos contendo material sugestivo de fagocitose da cápsula de colágeno.

Com 20 dias as características microscópicas eram semelhantes entre os Grupos II e III. Caracterizavam-se por uma maior intensidade do infiltrado inflamatório associado a um maior fibrosamento do granuloma, quando comparados com o período anterior. Fragmentos da cápsula de colágeno em franco processo de absorção pelos macrófagos e CGMIs também foram observados.

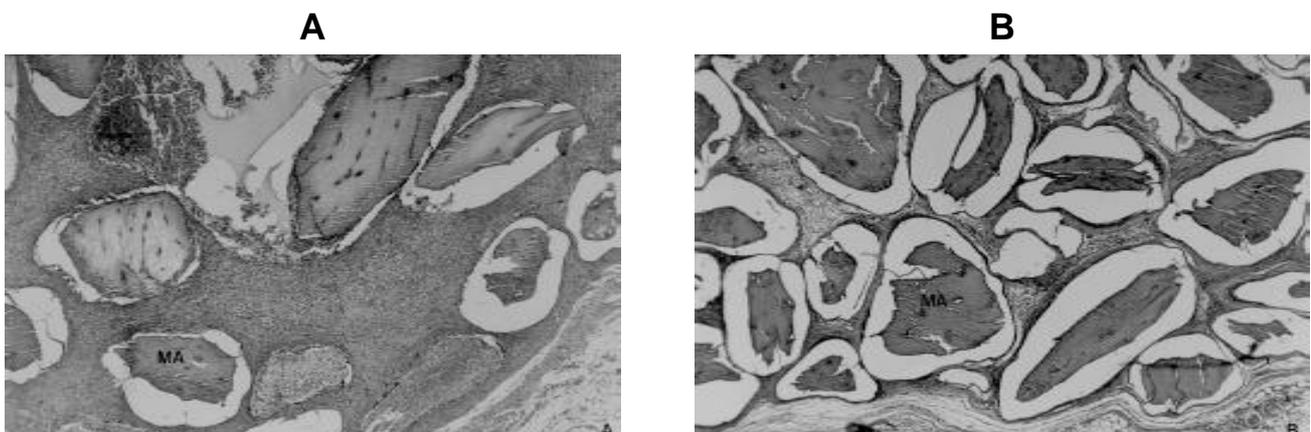
As proliferações fibroblástica e angioblástica eram moderadas e inúmeros capilares sanguíneos neoformados podiam ser observados entre as partículas implantadas.



**FIGURA 1-** Aspecto microscópico dos implantes de cápsulas de colágeno vazias no grupo controle (A, 10 dias; B, 60 dias). Notamos a diminuição do infiltrado inflamatório após o período de 60 dias. Aumento Original: 10x. Coloração H.E.



**FIGURA 2-** Aspecto microscópico dos implantes das partículas do Grupo II-100 (A, 10 dias; B, 60 dias). Encontramos partículas do osso cortical microgranular (MI) em A e B. Aumento Original: 10x. Coloração H.E.



**FIGURA 3-** Aspecto microscópico dos implantes das partículas do Grupo III-100 (A, 10 dias; B, 60 dias). Encontramos partículas do osso cortical macrogranular (MA) em A e B. Aumento Original: 10x. Coloração H.E.

#### *Período de 30 dias:*

No Grupo I 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 em relação ao grupo experimental de 20 dias. No Grupo III o grau de fibrosamento era maior em relação ao período anterior e algumas partículas de osso cortical bovino já se

encontravam circunscrita por fibras colágenas bem organizadas. Os fragmentos da cápsula de colágeno eram pouco perceptíveis neste período.

### **Período de 60 dias**

No Grupo I (Figura 1B) 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 de osso cortical bovino (Grupos II e III), implantadas na região subcutânea, apresentavam-se circunscritas ora por fibras colágenas bem organizadas, ora por células gigantes multinucleadas inflamatórias e alguns macrófagos. Neste período, os aspectos microscópicos eram muito similares entre os dois grupos. Pequenas partículas da cápsula de colágeno ainda estavam presentes neste período.

## **Discussão**

A identificação bioquímica da atividade enzimática dos diferentes tipos de fosfatase ácida não é comum na literatura, contudo, é possível verificar alterações na atividade das fosfatases ácidas em diversas situações. 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.

Recentemente, Oliveira et al.<sup>29</sup> demonstraram que a temperatura de desproteíntização do osso cortical bovino mineralizado (100 ou 1000°C) não afetou a resposta celular quando implantada em subcutâneo de ratos, quer através de análises bioquímicas ou microscópicas.

A implantação subcutânea ou intramuscular de matriz óssea desvitalizada e desmineralizada podem induzir a osteogênese ectópica<sup>31,40</sup>. Por outro lado, a implantação de matriz óssea desvitalizada e mineralizada no tecido subcutâneo ou intramuscular inibe esta capacidade indutiva<sup>40</sup>. Reddi e Huggins<sup>31</sup> 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 CGMIs recrutadas nos enxertos subcutâneos de partículas mineralizadas é ainda motivo de controvérsia na literatura.

Kelly e Schneider<sup>21</sup> 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<sup>11,21</sup> hoje 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 notamos borda em escova nas CGMIs em volta dos materiais implantados, em qualquer período experimental. A ausência de lacunas de Howship e a aparente regularidade de contorno das partículas sugerem que as CGMIs observadas não são do tipo osteoclasto<sup>42</sup>.

O implante do osso cortical bovino micro e macrogranular desproteíntizado (Gen-Ox) induziu na região subcutânea (Figuras 2B e 3B) um granuloma do tipo corpo estranho similar ao desencadeado por partículas inertes que atraem macrófagos mas são incapazes de ativar o sistema imune<sup>6</sup>. 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 dos materiais testados 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.

O tamanho de partículas dos diferentes tipos de material para enxerto é fator importante para o sucesso do reparo ósseo. Zaner e Yukna<sup>44</sup> e Shapoff et al.<sup>34</sup> advogaram o uso de partículas menores que 0,5 mm para o tratamento de defeitos periodontais. Higashi e Okamoto<sup>18,19</sup> determinaram que a formação de barreira dentinária se tornava inviável com o uso de partículas menores que 40µm, mas resultava em barreira mineralizada em 11 de 17 espécimes quando a partícula tinha ao redor de 300µm. Contudo, ainda não há uma definição clara de qual tamanho de partícula é adequado

para cada tecido ou condição clínica, uma vez que as características físico-químicas de cada material e/ou do defeito ósseo também afetam a resposta tecidual ao enxerto. Partículas grandes, mas friáveis, resultam em fragmentos pequenos que intensificam a resposta inflamatória<sup>19</sup>. Fucini et al.<sup>10</sup> não encontraram diferença estatisticamente significativa no tratamento de defeitos ósseos periodontais de pacientes utilizando DFDBA de diferentes tamanhos (250-500 e 850-1000µm). Certamente, estudos padronizados serão ainda necessários para se estabelecer a correta relação entre o tamanho e características do material com o tipo e local do defeito ósseo.

A matriz inorgânica derivada de osso cortical bovino é uma hidroxiapatita xenogênica, microporosa e natural, cujo similar nos Estados Unidos está aprovado pela “Food and Drug Administration” para uso como material de preenchimento<sup>43</sup>. Neste trabalho, as partículas de osso cortical bovino, micro ou macrogranulares, produzidas no Brasil, proporcionaram uma resposta tecidual no subcutâneo de ratos similar àquela descrita para o enxerto alógeno mineralizado nas mesmas condições<sup>21</sup>, confirmando que o osso bovino pode ser utilizado adequadamente como material de preenchimento.

Resultados positivos relacionados com a utilização de osso inorgânico bovino foram relatados anteriormente. Stephan<sup>36</sup> 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<sup>43</sup> e colaboradores 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.

Recentemente, Mankani et al<sup>23</sup> relataram que a extensão e qualidade do osso formado por células do estroma de medula óssea humana é fortemente dependente da matriz carreadora dessas células. Neste estudo demonstraram que partículas de hidroxiapatita/fosfato de cálcio com 0,1-0,25 mm de tamanho resultavam na maior formação de osso.

Nossos resultados mostram, tanto bioquimicamente quanto microscopicamente, que a resposta celular ao osso cortical bovino inorgânico desproteínizado a 100° C (Gen-Oxâ) é independente do tamanho da partícula e morfológicamente similar ao observado em enxertos alógenos em subcutâneo de ratos.

## Conclusão

A implantação de matriz óssea mineralizada e desproteínizada no tecido subcutâneo de ratos induz a formação de um granuloma tipo corpo estranho com recrutamento de macrófagos e CGMIs. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o osso mineralizado bovino desproteínizado a 100°C quer micro (250-1000 µm) ou macrogranular (1000-2000 µm), promove uma resposta tecidual semelhante à implantação subcutânea de osso autógeno ou alógeno mineralizado. Isto nos sugeriu que os materiais testados podem ser usados como material de preenchimento osteosubstitutos e como potenciais candidatos a carreadores das proteínas morfogenéticas do osso.

## Agradecimentos

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. Este trabalho foi financiado pela FAPESP, PIBIC/CNPq, FOB-USP, PRP-USP.

## Abstract

The aim of this study was to investigate the cellular response upon implantation of micro (250-1000 µm) or macrogranular (1000-2000 µm) particles of mineralized bone graft produced from bovine cortical bones devitalized at 100°C (Gen-Ox®, Baumer S.A.). Particulate bone grafts were implanted at 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. Despite the initial more intensive reaction induced by microgranular particles, after 60 days no significant differences were observed even by microscopic or biochemical analysis. We conclude that bovine cortical bones devitalized at 100°C 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

- 1- ARAGONÊS, A. et al. Uso de Hidroxiapatita microgranular em pulpotomia. **Rev. gaucha Odont.**, v.40, n.6, p.349-50, 1992.
- 2- BONACHELLA, W.C. et al. Manutenção do Rebordo Alveolar com Hidroxiapatita Microgranular. **Rev. gaucha Odont.**, v.40, n.3, p.212-14, 1992.
- 3- 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.
- 4- BUZALAF, M.A.R. et al. Kinetic characterization of bovine lung low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase. **Exp. Lung. Res.**, v.24, n.3, p.269-72, 1998.
- 5- CIRELLI, J.A. et al. Evaluation of anionic collagen membranes in the treatment of class II furcation lesions: na histometric analysis in dog. **Biomaterials**, v.18, n.18, p.1227-34, 1997.
- 6- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins pathologic basis of disease**. 6 ed. Philadelphia, Saunders 1999. p.50-88.
- 7- 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.
- 8- 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.
- 9- DE GROOT, K. Bioceramics consisting of calcium phosphate salts. **Biomaterials**, v.1, n.1, p.47-50, 1980.
- 10- FUCINI, S.E. et al. Small versus large particles of demineralized freeze-dried bone allografts in human intrabony periodontal defects. **J. Periodont.**, v.64, n.9, p.844-7, 1996.
- 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- GRANJEIRO, J.M. et al. Características físico-químicas de Hidroxiapatita para uso clínico. **Rev. gaucha Odont.**, v.40, n.2, p.130-4, 1992.
- 13- GRANJEIRO, J.M. et al. Purification and characterization of a low-molecular-weight bovine kidney acid phosphatase. **An. Acad. bras. Cirurg.**, v.69, n.4, p.451-60, 1997.
- 14- 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, 1997.
- 15- GREGHI, S.L.A.; CAMPOS JUNIOR, A. Estudo comparativo da biocompatibilidade de materiais cerâmicos diversos em tecido subcutâneo de ratos. **Rev. FOB**, v.2, n.4, p.73-81, 1994.
- 16- 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.422-7, 1972.
- 17- HERCULIANI, P. P. et al. 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.
- 18- HIGASHI, T., OKAMOTO, H. Influence of particle size of calcium phosphate ceramics as a capping agent on the formation of a hard tissue barrier in amputated dental pulp. **J. Endod.**, v. 22, n. 6, p.281-3, 1996.
- 19- HIGASHI, T., OKAMOTO, H. Influence of particle size of hydroxyapatite as a capping agent on cell proliferation of cultured fibroblasts. **J. Endod.**, v. 22, n. 5, p.236-9, 1996.
- 20- JARCHO, M. Calcium phosphates ceramics as hard tissues prosthetics. **Clin. Orthop. Rel. Res.**, v.157, p.259-78, 1981.
- 21- 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.
- 22- 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.
- 23- MANKANI, M.H. et al. In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: effect of carrier particle size and shape. **Biotechn. Bioeng.**, v. 72, n. 1, p.96-107, 2001.
- 24- MASTERS, D.H. Implants. Bone and bone substitutes. **Calif. dent. Ass. J.**, v.16, n.1, p.56-65, 1988.
- 25- MARX, R.E.; SAUNDERS, T.R. Reconstruction and rehabilitation of cancer patients. In: FONSECA, R.J.; DAVIS, W.H. **Reconstructive preprosthetic oral and maxillofac. 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. Cienc. Estomat.**, v.1, n.2, p.51-63, 1996.
- 27- NIMNI, M.E. Polypeptide growth factors: targeted delivery systems. **Biomaterials**, v18, n.18, p.1201-25, 1997.
- 28- 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.
- 29- OLIVEIRA, R.C., et al. Efeito da temperatura de desproteínização no preparo de osso cortical bovino microgranular. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular em subcutâneo de ratos. **Rev. FOB**, v. 7, n.3/4, p.85-93, 1999.
- 30- 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.

- 31- 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.
- 32- 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.
- 33- SCHAWRTZ, Z., et al. Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation. **J. Periodont.**, v. 67, n. 9, p.918-26, 1993.
- 34- SHAPOFF, C.A., et al. The effect of particle size on the osteogenic activity of composite grafts of allogeneic freeze-dried bone and autogenous marrow. **J. Periodontol.**, v. 51, n. 11, p.625-30, 1980.
- 35- SERVICE, R.F. Tissue Engineers build new bone. **Science**, v. 289, n. 5484, p.1498-500, 2000.
- 36- STEPHAN, E.B. Anorganic bovine bone supports osteoblastic cell attachment and proliferation. **J. Periodont.**, v.70, n.4, p.364-9, 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.; et al. 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.893-9, 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.271-8, 1970.
- 41- URIST, M.R. Bone transplants and implants. In: *Fundamental and clinical bone physiology*. Lippincott, Ed. Philadelphia J.B., 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.72-6, 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.655-63, 1998.
- 44- ZANER, D.J., YUKNA, R.A. Particle size of periodontal bone grafting materials. **J. Periodont.**, v. 55, n. 7, p.406-9, 1984.
- 45- 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.