

ATIVIDADE MORFOGENÉTICA DA MATRIZ DENTINÁRIA DESMINERALIZADA: ESTUDO EM CÃES

MORPHOGENETIC ACTIVITY OF DEMINERALIZED DENTIN MATRIX: A STUDY IN DOGS

Evelyn A. Lucas GONÇALVES

Professora Adjunto do Curso de Odontologia da Universidade Estadual de Maringá.

Angelo José PAVAN

Professor Adjunto do Curso de Odontologia da Universidade Estadual de Maringá.

Orivaldo TAVANO

Professor Titular (Aposentado) do Departamento de Estomatologia da FOB-USP.

Sérgio Augusto Catanzaro GUIMARÃES

Professor Titular (Aposentado) do Departamento de Estomatologia da FOB-USP – Prof. Livre docente da CPPG – USC - Bauru.

O tratamento de perdas ósseas amplas representa um desafio em cirurgias de reconstrução, demandando investigações continuadas do desenvolvimento do reparo ósseo. Este trabalho objetivou avaliar a atividade osteoindutora da matriz dentinária e o padrão da formação óssea no processo de reparo. Defeitos ósseos confeccionados no osso rádio de doze cães adultos foram implantados com fatias de matriz dentinária desmineralizada autógena. Após períodos de 30, 60, 90 e 120 dias, os animais foram sacrificados. A análise microscópica revelou que o reparo ósseo nos defeitos confeccionados no rádio apresenta mecanismos distintos de formação óssea. A matriz dentinária desmineralizada em forma de fatias induziu a neoformação óssea direta e estimulou a atividade morfogênética integral, sendo completamente incorporada no tecido ósseo neoformado.

UNITERMOS: Osteoindução; Reparo ósseo; Dentina; Implantes dentários.

INTRODUÇÃO

O tratamento de perdas ósseas devido a traumas, infecções, neoplasias e anomalias de desenvolvimento, permanece um dos problemas mais significantes em cirurgias de reconstrução óssea. Os resultados dos tratamentos utilizados são muitas vezes imprevisíveis, demandando investigações continuadas na natureza da osteogênese e em métodos de controlá-la e estimulá-la.

Diversas pesquisas, desenvolvendo estudos na elaboração de métodos para induzir o reparo ósseo, sugerem que as matrizes óssea e dentinária desmineralizada possam iniciar ou acelerar o processo de reparo ósseo. Implantes in situ de dentina desmineralizada em músculo, tecido conjuntivo subcutâneo, alvéolo dentário e ossos maxilares, e in vitro foram relatados em diversos trabalhos^{2-4, 8, 9, 13, 14, 16, 18, 20-22, 27-29}.

Lesões ósseas, fraturas, defeitos, bem como a inserção de implantes, ativam o reparo ósseo local pela liberação de fatores de crescimento e de indutores, como as proteínas morfogênicas (BMPs)¹⁰. Vários destes fatores detectados no tecido ósseo, como o fator de crescimento similar à insulina (IGF), o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), o fator de crescimento transformador beta (TGFβ) e BMPs, também foram isolados da dentina^{1, 3, 4, 15, 19, 24, 27} e podem atuar como determinantes da formação óssea local e do reparo^{8, 9, 13, 20-23, 28, 30}.

O mecanismo e o curso da formação óssea em resposta ao implante de materiais permanecem questões de importância fundamental na instituição de terapias de reconstrução óssea. Com o objetivo de estudar o desenvolvimento do processo de reparo ósseo em defeitos cirúrgicos, bem como avaliar a

capacidade osteoindutora da matriz dentinária, analisou-se a resposta tecidual do osso rádio de cães ao implante de fatias de matriz dentinária autógena desmineralizada.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o presente trabalho foram empregados 12 cães adultos, sem raça definida, com peso médio de 14 Kg, fornecidos pelo Biotério da Universidade Estadual de Maringá. Para a obtenção do material de implante, a matriz dentinária, de cada animal foram removidos dois incisivos inferiores, preparados segundo técnica de Catanzaro Guimarães, et al⁸. Após a remoção da polpa por via retrógrada e do ligamento periodontal por raspagem da raiz, os dentes foram imersos em uma solução 0,6N de ácido clorídrico a 2^o C, por 4 dias, até a completa desmineralização.

Para a remoção do ácido residual, os dentes foram lavados em água destilada, sob constante agitação e, com o auxílio de um micrótomo de congelação, foram cortados longitudinalmente para a obtenção de fatias de oito micrometros de espessura. O material processado foi acondicionado em recipientes esterilizados, contendo álcool etílico 70^o/gentamicina (5ml/0,2 sol), e armazenados a frio até a sua utilização como material de implante.

Para a confecção dos defeitos, em seguida à administração intramuscular do medicamento pré-anestésico, realizou-se a tricotomia das regiões a serem incisadas, a anti-sepsia, e a anestesia geral com o Tiopental sódico. Após o deslocamento dos retalhos, com uma broca tipo Trefina acionada por um micromotor cirúrgico, sob constante irrigação com soro fisiológico, confeccionaram-se as lojas cirúrgicas na diáfise do rádio esquerdo e direito, atingindo a cavidade medular, com o tamanho padronizado de 16 x 8mm. No rádio direito, determinado como defeito experimental, implantaram-se fatias de dentina desmineralizada. No defeito do rádio esquerdo, determinado como defeito controle, preencheu-se a cavidade apenas com coágulo sanguíneo. Doses intramusculares de analgésico foram aplicadas de acordo com a recuperação do animal, bem como doses de estreptomicina/penicilina, sendo os animais mantidos sob os cuidados da médica veterinária.

Decorridos os períodos de 30, 60, 90 e 120 dias, os animais foram sacrificados em grupos de três a cada período, pela administração excessiva de Tiopental sódico. As peças contendo os defeitos

foram removidas em bloco, com serra cirúrgica sob constante irrigação, e fixadas em formol a 10%. Os espécimes foram desmineralizados em solução de citrato de sódio e ácido fórmico, segundo técnica de Morse modificada⁸, por períodos de 60 a 80 dias, e lavados em água corrente por 24 horas. Após os procedimentos histotécnicos de rotina, os cortes dos blocos em parafina, obtidos no sentido transversal, apresentaram cerca de oito micrometros de espessura. As técnicas de coloração utilizadas foram hematoxilina-eosina e o tricrômico de Mallory.

RESULTADOS

Os achados morfológicos mais freqüentemente observados nos espécimes foram analisados em conjunto, dentro de cada período considerado no experimento, procurando-se ressaltar as diferenças entre o grupo controle e o experimental, bem como entre um período e o período anteriormente analisado.

No período de 30 dias, nos defeitos experimentais, notam-se fatias de matriz dentinária com superfícies regulares sem sinais de reabsorção, encontrando-se de permeio, tecido de granulação mesenquimal. A matriz dentinária encontra-se parcialmente envolvida por células mesenquimais hipertróficas, com aspecto osteoblástico, ativas na deposição de matriz óssea (Figura 1 A). Nota-se ausência de clastos ou células inflamatórias junto à dentina. O processo de reparo encontra-se mais desenvolvido nos defeitos implantados, apresentando áreas mais extensas de ossificação. Tecido cartilaginoso, com células hipertrofiadas, bem como tecido ósseo imaturo também podem ser observados. Nos defeitos controles, o tecido conjuntivo mesenquimal fibrocelular preenche uma grande área do defeito, encontrando-se também tecido de granulação, proliferação vascular, esparsas áreas de coágulo sanguíneo, e um discreto infiltrado inflamatório difuso de células mononucleares. Um colar de tecido conjuntivo fibrocelular pode ser observado na superfície óssea externa, próxima ao defeito, dando início à formação de um calo.

No período de 60 dias, nos defeitos experimentais, o reparo ósseo encontra-se mais evoluído, revelando intensa atividade osteogênica junto às fatias de matriz dentinária, em algumas regiões já incorporadas por tecido ósseo neoformado (Figura 1 B). Observam-se também áreas de cartilagem em processo de reabsorção e substituição, caracterizando o mecanismo endocondral de ossificação (Figura 1 C), além de áreas de ossificação intramembranosa. Nos

defeitos controle, notam-se trabéculas ósseas irregulares, bem celularizadas, e, em menor proporção comparando-se com os defeitos experimentais, eventuais trabéculas regulares com poucos osteócitos e organização uniforme, pavimentadas por osteoblastos. Extensas áreas com tecido cartilaginoso são encontradas na superfície externa do defeito, formando um calo condrogênico.

No período de 90 dias, nos defeitos experimentais, as fatias de matriz dentinária encontram-se completamente incorporadas pelo tecido ósseo neoformado, tornando-se difíceis de serem visualizadas (Figura 1D). A neoformação óssea preencheu completamente o defeito. Osso maduro de aparência lamelar organizada está presente e experimenta, neste período, um início de processo de remodelação. Células sanguíneas hematopoiéticas, células adiposas e fibras constituem o espaço medular. Nos defeitos controles, observam-se trabéculas ósseas imaturas e o reparo encontra-se incompleto.

No período de 120 dias, nos defeitos experimentais, os cortes microscópicos revelam tecido ósseo com aspecto de normalidade, com remodelação óssea mais ativa comparada ao defeito controle. Nota-se a formação de ósteons secundários. A cortical óssea mostra-se intacta, com presença de lamelas circunferenciais e intersticiais. As fatias de dentina desmineralizada foram totalmente incorporadas pelo tecido ósseo neoformado, tornando-se indistinguíveis do tecido ósseo neoformado (Figura 1 E). Nos defeitos controle, o processo de reparo do tecido ósseo encontra-se menos evoluído. Encontram-se eventuais áreas de ossificação endocondral, remanescentes do calo condrogênico e tecido ósseo não lamelar em processo de substituição por tecido lamelar.

DISCUSSÃO

A atividade dos implantes osteoindutores está relacionada com a competência osteogênica do animal receptor^{4, 11, 18}. Embora cada modelo animal tenha suas próprias singularidades e diferenças quando comparados ao processo de reparo ósseo em humanos, espécies filogenéticas inferiores, como roedores, oferecem um alto potencial para osteogênese, tornando os resultados obtidos não tão adequados e passíveis de serem transferidos para humanos²⁴. Cães são mais evoluídos na escala filogenética e apresentam a anatomia vascular dos

ossos longos similar à humana, sendo considerados um modelo experimental mais relevante²⁶. O arranjo vascular e o suprimento sanguíneo, deve-se ressaltar, têm importância primordial na evolução do processo de reparo ósseo, possibilitando a chegada de células de linhagem clastogênica no sítio de reparo¹⁷.

Os defeitos, confeccionados em membros pares objetivando controlar a variabilidade devida a fatores biológicos e a amostragem, foram criados buscando-se as dimensões apropriadas para a análise do reparo, compatível com a dimensão do osso utilizado. A criação de defeitos com maiores dimensões, conforme estudo piloto, poderia tornar-se anatomicamente inviável, devido ao porte pequeno dos animais experimentais¹.

As análises microscópicas revelaram morfogênese óssea, ou seja, a formação de osso com medula desenvolvida do mesênquima²⁸, envolvendo uma cascata complexa de determinação de linhagens celulares²³ definindo o mecanismo e o curso da regeneração óssea. Após a formação de tecido de granulação mesenquimal, neste estudo, a formação óssea no reparo desenvolveu-se por mecanismos distintos: neoformação óssea intramembranosa nas paredes do defeito confeccionado, e formação de cartilagem no local do hematoma nas áreas centrais do defeito, resultando posteriormente em ossificação endocondral. A ossificação intra-membranosa no rádio está relacionada com a estabilidade biomecânica das margens do defeito, bem como com a angiogênese e a proximidade da medula óssea. A irrigação e a oxigenação adequada da região, provida pela neoformação vascular, associada à liberação de citocinas pelas células endoteliais, podem afetar as células osteoprecursoras diretamente¹². A proximidade da medula óssea possibilitando um suprimento abundante de células fonte-mesenquimais formadoras de clones celulares osteogênicos^{5, 7} certamente favorece o desenvolvimento de ossificação intramembranosa⁹.

A ossificação endocondral no defeito e a permanência do calo condrogênico, como observado em alguns animais sacrificados em períodos posteriores, estão relacionadas à estabilidade biomecânica, as dimensões amplas do defeito, à intensidade da inflamação, ao excesso de colágeno tipo III e ao mecanismo embriológico de ossificação do rádio. Defeitos ósseos são passíveis de sofrerem instabilidade biomecânica, principalmente nas áreas centrais do defeito, sujeitas à ação dos músculos adjacentes. A mobilidade acima do nível fisiológico prejudica a angiogênese e a tensão de oxigênio cai,

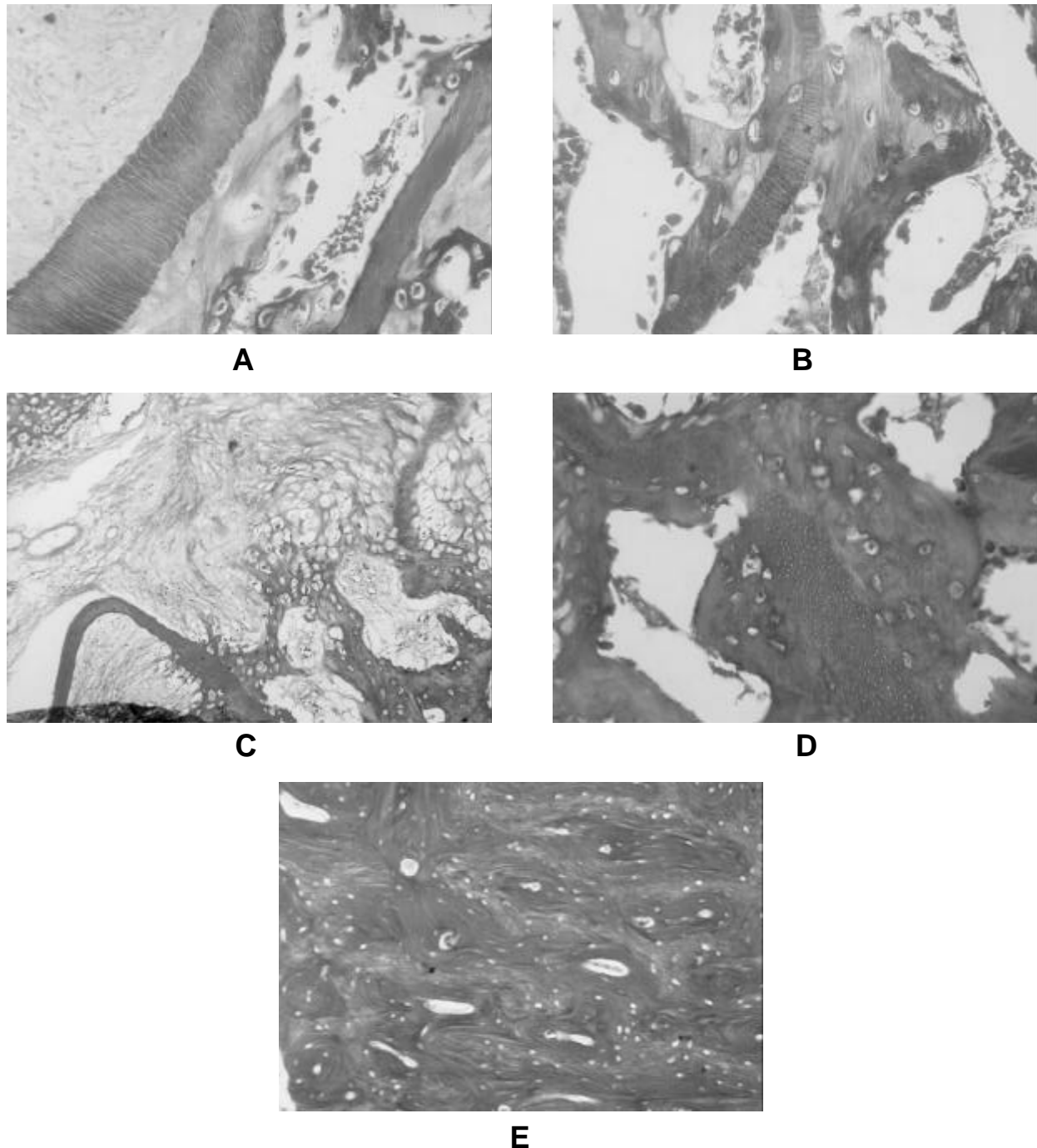


FIGURA 1- Aspecto microscópico dos defeitos ósseos cirúrgicos. (A) Aos 30 dias, notam-se fatias de matriz dentinária com condensação celular de perfil osteoblástico. (B) Intensa atividade osteogênica evidenciada junto à dentina no período de 60 dias, formando trabéculas de tecido ósseo imaturo. Observa-se ausência de reação inflamatória localizada. (C) Células com perfil fenotípico de condroblastos formando tecido cartilaginoso e fatias de matriz dentinária induzindo a neoformação óssea. (D) Aos 90 dias, a dentina encontra-se completamente incorporada pelo tecido ósseo neoformado. (E) Aos 120 dias, nota-se a remodelação óssea ativa. Aumento original: 40x (C e E); 100x (B); 160x (A e D). Coloração Tricrômico de Mallory.

criando assim um microambiente condrogênico¹². Com necessidades metabólicas reduzidas em relação ao tecido ósseo, o tecido cartilaginoso pode

desenvolver-se em áreas sem estabilidade²⁵.

O produto final do implante de fatias de matriz dentinária autógena desmineralizada, corroborando

os resultados obtidos em outros estudos^{8, 9, 14, 15, 18, 21, 28, 30} consiste em osso. A heteroindução promovida pela dentina desmineralizada está associada às proteínas morfogenéticas (BMPs), contidas na matriz dentinária, responsáveis por modular a expressão fenotípica de células osteoprogenitoras em osteoblastos^{4, 8, 10, 14}. A velocidade do processo de reparo ósseo desenvolvida nos defeitos experimentais, maior que nos defeitos controles, pode ser explicada como conseqüência da estimulação das células fonte-mesenquimais, provenientes do assoalho, margens laterais e superiores do defeito, pela liberação de BMPs e fatores de crescimento da matriz dentinária, bem como pela presença de receptores nas células para estes fatores. O aumento nos eventos da biossíntese óssea, por células osteogênicas residentes ou pré-osteoblastos, bem como pela diferenciação de células fonte-mesenquimais formadoras de clones celulares osteogênicos, resultam na regeneração óssea.

A facilidade de obtenção e preparo das fatias de dentina, aliadas a flexibilidade e facilidade de adaptação nas lojas cirúrgicas são características favoráveis a serem destacadas na metodologia do presente estudo. Biocompatível e bem tolerada pelo organismo, a matriz dentinária demonstra não elicitar inflamação. A atividade quimiotática da matriz dentinária sobre as células fonte-mesenquimais, atraindo tais células para o sítio de implante, pode ser observada pela condensação celular associada à dentina. Suas propriedades de osteoindução, estimulando a neoformação óssea em áreas centrais do defeito desde os períodos iniciais, e de osteocondução, direcionando a formação de trabéculas ósseas, mostra-se bem evidenciada desde os períodos de 30 e 60 dias, quando trabéculas ósseas envolvendo as fatias seguem o curso das mesmas (Figuras 1A e 1B). Uma vez aprisionada pelo osso neoformado, a matriz se decompõe de modo natural, sem a intervenção de células tipo clastos, e acelera a neoformação óssea indireta, atuando na substituição de tecido cartilaginoso em tecido ósseo (Figuras 1C e 1D). A decomposição das fatias de matriz dentinária se desenvolve paralelamente ao processo de remodelação observado no período de 120 dias, acelerando a remodelação de osso não osteonal para osso osteonal maduro (Figura 1 E). Com a decomposição da matriz na forma de fatias desaparece o estímulo para maior crescimento ósseo. O calo ósseo neoformado se restringe a dimensão do defeito realizado.

CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo claramente indicam que a matriz dentinária autógena desmineralizada na forma de fatias apresenta propriedades osteoindutora e osteocondutora, estimulando a neoformação óssea direta e a atividade morfogenética integral, com formação de tecido e medula óssea, podendo ser uma alternativa para a osteoindução em cirurgias de reconstrução óssea.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos Profs. Edevaldo T. Camarini e Roberto Hayacibara da UEM, pela colaboração na execução cirúrgica deste trabalho; à médica veterinária Dra. Vânia Steffens, e a Juracy Nascimento e Fátima A. Silveira pelo auxílio técnico.

ABSTRACT

The treatment of large osseous defects presents a challenge in reconstructive procedures, demanding continuing investigations on bone regeneration. The present study was designed to evaluate the osteoinductive activity of demineralized dentin matrix and the pattern of bone repair. Bone defects were created at the radius of twelve adult dogs and implanted with slices of demineralized autogenous dentin matrix. At harvesting periods of 30, 60, 90, and 120 days, the animals were sacrificed. Histological analysis revealed bone healing at the radius bone defects exhibited distinct mechanisms of bone formation. Slices of demineralized autogenous dentin matrix induced direct bone formation and stimulated integral morphogenetic activity, and were completely incorporated by bone neoformation.

UNITERMS: Bone induction; Bone repair; Dentin matrix; Dental implants.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Aaboe M; Pinholt, EM; Hjorting-Hawsen E. Unicortical critical size defect of rabbit tibia is larger than 8 mm. *J craniofac Surg* 1994; 5:201-3.
- 2- Amar S, Sires B, Veis A. A rat incisor dentin matrix protein can induce neonatal rat muscle fibroblasts, in culture, to express phenotypic products of chondroblastic cells. *J Biol Buccale* 1991; 19:55-60.

- 3- Bessho K, Takaka N, Matsumoto J, Tagawa T, Murata M. Dentin matrix derived bone morphogenetic protein. *J Dent Res* 1994; 70:171-5.
- 4- Bessho K, Tagawa T, Murata M. Purification of rabbit bone morphogenetic protein derived from bone, dentin, and wound tissue after tooth extraction. *J Oral Maxillofac Surg* 1990; 48:162-9.
- 5- Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem* 1994; 56:283-94.
- 6- Butler WT. Sialoproteins of bone and dentin. *J Biol. Buccale* 1991; 19:83-9.
- 7- Caplan AI. Bone development and repair. *Bioessays* 1987; 6:171-5.
- 8- Catanzaro Guimarães S.A. Possibility to reinforce bone repair with decalcified dentin matrix. In: *Jahrbuch für orale Implantsologie*. Berlin: Quintessenz Verlags-GmbH; 1993. p.33-4.
- 9- Catanzaro Guimarães SA, Catanzaro Guimarães BPN, Garcia RB, Alle N. Osteogenic potential of autogenic demineralized dentin implanted in bony defects in dogs. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1986, 15:160-9.
- 10- Gonçalves EAL, Catanzaro Guimarães SA, Garcia RB. Proteínas morfogenéticas ósseas: terapêutica molecular no processo de reparo. *Rev Odontol USP* 1998; 12:299-304.
- 11- Göransson H, Patiala H, Linden M, Vuola J, Rokkanen P. Histology and histomorphometry of bone regeneration after experimental injuries. *Ann Chirur Gynaecol* 1992; 81:58-65.
- 12- Hollinger J, Wong J. The integrated processes of hard tissue regeneration with special emphasis on fracture healing. *Oral Surg* 1996; 82:594-606.
- 13- Inoue, T, Deporter DA, Melcher AH. Induction of chondrogenesis in muscle, skin, bone marrow, and periodontal ligament by demineralized dentin and bone matrix in vivo and in vitro. *J Dent Res* 1986; 65:12-22.
- 14- Katz RW, Hollinger JO, Reddi AH. The functional equivalence of demineralized bone and tooth matrices in ectopic bone induction. *J Biomed Mater Res* 1993; 27:239-45.
- 15- Kawai T, Urist MR. Bovine tooth-derived bone morphogenetic protein. *J Dent Res* 1989; 68:1079-74.
- 16- Linde A, Lussi A. Mineral induction by polyanionic dentin and bone proteins at physiological ionic conditions. *Connect Tissue Res* 1989; 21:197-203.
- 17- Mann FA, Payne JT. Bone healing. *Semin Vet Med Surg (small Anim)* 1994; 4:312-21.
- 18- Moehl T, Ripamonti U. Primate dentine extracellular matrix induces bone differentiation in heteropoic sites of the baboon (*Papio ursinus*). *J Periodont Res* 1992; 27:92-6.
- 19- Mundy GR. Peptides and growth regulatory factors in bone. *Rheum Dis N Amer* 1994; 20:577-87.
- 20- Nebgen DR, Inoue H, Sabsay B, Wei K, Ho CS, Veis A. Identification of the chondrogenic-inducing activity from bovin dentin as low-molecule-mass amelogenin polypeptide. *J Dent Res* 1999; 78:1484-94.
- 21- Pinholt EM, Bang G, Haanes HR. Alveolar ridge augmentation by osteoinduction in rats. *J Dent Res* 1990; 98:434-41.
- 22- Rabinowitz T, Syftestad GT, Caplan AI. Chondrogenic stimulation of embryonic chick limb mesenchymal cells by factors in bovine and human dentine extracts. *Arch Oral Biol* 1990; 35:49-54.
- 23- Ripamonti U, Reddi AH. Periodontal regeneration: potential role of bone morphogenetic proteins. *J Periodont Res* 1994; 29:225-35.
- 24- Rosen V, Thies RS. The cellular and molecular basis of bone formation and repair. Heidelberg: Springer; 1995.
- 25- Sandberg MM, Aro HT, Vuorio ET. Gene expression during bone repair. *Clin Orthop* 1993; 289:292-312.
- 26- Schwarz N, Dinges HP, Schiesser A, Redl H, Schlag G. Dog bone less osteogenic than rat bone: bone-matrix transplants in nude rats. *Acta Orthop Scand* 1989; 60:693-5.
- 27- Somerman MJ, Nathanson MA, Saulk JJ, Manson B. Human dentin matrix induces cartilage formation in vitro by mesenchymal cells derived from embryonic muscle. *J Dent Res* 1987; 66:1551-58.
- 28- Urist M. Bone histogenesis and morphogenesis in implants of demineralized enamel and dentin. *Oral Surg* 1971; 29:88-102.
- 29- Veis A, Sires B, Clohisy J. A search for the osteogenic factor in dentin: rat incisor dentin contains a factor stimulating rat muscle cells in vitro to incorporate sulfate into an altered proteoglycan. *Connect Tissue Res* 1989; 23:137-44.
- 30- Waal H, Ruben MP, Castellucci G, Bloom A. Histological evaluation of lyophilized demineralized dentin for the treatment of periodontal osseous defects in dogs. *Int J Periodont Restorat Dent* 1988; 8:49-63.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Rua Bragança 630 / 301
Cep.: 87020-220 - Maringá - PR.
e-mail: ealg@terra.com.br