

AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA COMPARATIVA DE REPARO ÓSSEO EM TÍBIA DE COELHO TRATADA COM XENOENXERTOS

COMPARATIVE HISTOLOGICAL EVALUATION OF TIBIAL BONE REPAIR IN RABBITS TREATED WITH XENOGRAFTS

MÔNICA DIUANA CALASANS-MAIA¹, FABIO OLIVEIRA ASCOLI², ADRIANA TEREZINHA NEVES ALVES NOVELLINO³, ALEXANDRE MALTA ROSSI⁴, JOSÉ MAURO GRANJEIRO^{1,5}

RESUMO

Objetivo: Os xenoenxertos são uma alternativa aos enxertos autogênicos e devem ser osteocondutores e biocompatíveis. Um estudo recente demonstrou que as características físicas e químicas das hidroxiapatitas encontradas no comércio não são condizentes com as descrições dos fabricantes. Este estudo avalia a biocompatibilidade e a osteocondução de um xenoenxerto derivado de osso medular bovino. **Métodos:** Quinze coelhos adultos, pesando entre 2.500g e 3.000g cada um, foram anestesiados e submetidos a procedimentos cirúrgicos para criar três perfurações na tíbia, com 2 mm de diâmetro. Esses orifícios foram preenchidos com coágulo sanguíneo, Osseus® e Bio-Oss®. Os animais foram sacrificados depois de 7, 14 e 28 dias. **Resultados:** A análise histopatológica da interface de osso e biomaterial mostrou ligeira resposta inflamatória depois de 7 dias, que esteve ausente nos períodos subsequentes. Ambos os materiais foram parcialmente substituídos por tecido ósseo diretamente em contato com a superfície dos materiais, sem ocorrência de fibrose. **Conclusão:** Concluímos que ambos os materiais são biocompatíveis e absorvíveis, o que permite progressiva aposição óssea na superfície durante todo o período de avaliação.

Descritores: Transplante ósseo. Coelhos. Teste de materiais.

ABSTRACT

Objective: Xenografts are an alternative to autogenic grafts and must be osteoconductive and biocompatible. A recent study has demonstrated that the physical and chemical characteristics of commercially available hydroxyapatites do not fit the manufacturers' descriptions. This study evaluates the biocompatibility and osteoconduction of a xenograft derived from bovine medullary bone. **Methods:** Fifteen adult rabbits weighing between 2,500 g and 3,000 g each were anesthetized and subjected to surgical procedures to create three perforations in the tibia, with a diameter of 2 mm. These were filled with blood clot, Osseus® and Bio-Oss®. The animals were euthanized after 7, 14 and 28 days. **Results:** Histopathological analysis of the interface between the bone and the biomaterial showed a slight inflammatory response after 7 days, which was absent in the subsequent periods. Both materials were partially replaced by bone tissue directly in contact with the surface of the materials, without the occurrence of fibrosis. **Conclusion:** We concluded that both materials are biocompatible and absorbable, allowing for progressive bone apposition on the surface throughout the evaluation period.

Keywords: Bone transplantation. Rabbits. Materials testing.

Citação: Calasans-Maia MD, Ascoli FO, Novellino ATN, Rossi AM, Granjeiro JM. Avaliação histológica comparativa de reparo ósseo em tíbia de coelho tratada com xenoenxertos. *Acta Ortop Bras.* [periódico na Internet]. 2009; 17(6):340-3. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>

Citation: Calasans-Maia MD, Ascoli FO, Novellino ATN, Rossi AM, Granjeiro JM. Comparative histological evaluation of tibial bone repair in rabbits treated with xenografts. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2009; 17(6):340-3. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>

Todos os autores declaram não haver nenhum potencial conflito de interesses referente a este artigo.

- 1 – Programa de Pós-graduação em Patologia e Faculdade de Odontologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil
- 2 – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil
- 3 – Faculdade de Odontologia, Universidade Gama Filho, Rio de Janeiro, Brasil
- 4 – Laboratório de Biomateriais - LABIOMAT / MCT, Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, RJ, Brasil
- 5 – Núcleo de Terapia Celular e Instituto de Biologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil

Trabalho realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental Firmino M. Filho, Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense (UFF), Rio de Janeiro, Brasil.
Endereço para Correspondência: Av. Rui Barbosa, 582/501 - Flamengo - Rio de Janeiro - RJ - E-mail: monicacalasans@terra.com.br

Trabalho recebido em 10/02/09 aprovado em 08/05/09

INTRODUÇÃO

O reparo de grandes defeitos ósseos continua a ser um desafio para ortopedistas que usam enxertos ósseos autólogos tradicionais, devido a suas propriedades osteogênicas e à incorporação mais fácil do que a dos enxertos aloplásticos e xenogênicos.¹

Os materiais transplantados podem ser classificados de acordo com sua origem, como autólogos (autoenxertos), homólogos (aloxenxertos), heterólogos (xenoenxertos) e aloplásticos (que consistem de material inorgânico ou sintético). Os autoenxertos são colhidos do paciente e agem por mecanismos denominados osteogênese, osteocondução (regeneração óssea) e osteoindução.² A inserção de autoenxertos acarreta riscos para o paciente, inclusive outros procedimentos cirúrgicos, aumento da morbidade pós-operatória, debilitação da região doadora e, com frequência, quantidade insatisfatória de tecido existente para autoenxerto.¹ Os aloenxertos podem ser obtidos de cadáveres ou de doadores vivos, e são processados em condições estéreis e armazenados em bancos de ossos humanos. A vantagem de usar materiais homólogos é que é necessário só um local de cirurgia, portanto, menos tempo cirúrgico e menos morbidade. A osteoindução de aloenxertos ocorre através das proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), responsáveis pela diferenciação mesenquimática de células-tronco em osteoblastos.³ As desvantagens de usar tecido de outro indivíduo são a possibilidade de transmissão de doenças e a disponibilidade limitada de enxertos.⁴ Os xenoenxertos são obtidos de uma espécie diferente da do receptor⁵ e são predominantemente feitos da porção inorgânica do tecido ósseo animal, sendo classificados como osteocondutores.^{2,3} Os materiais sintéticos para regeneração óssea, classificados como osteocondutores,⁵ são uma alternativa às limitações existentes e às dificuldades de se obter autoenxertos e à possibilidade de transmissão de doenças dos aloenxertos.

O processamento do osso bovino pode resultar em dois tipos distintos de material: inorgânico e orgânico (predominantemente colágeno tipo I). O material inorgânico não tem proteínas e células, porque consiste apenas em hidroxiapatita. As proteínas são removidas por tratamento térmico, em temperaturas superiores a 300 °C, porém, quanto maior for a temperatura, menor será a probabilidade de bioabsorção desses materiais.⁶ O tratamento térmico interfere diretamente com o nível de cristalinidade do material, aumentando a calcinação (1000 °C) ou a sinterização (1250 °C).⁶⁻⁸ Por outro lado, o tratamento de osso bovino com solventes orgânicos, álcalis e ácidos em concentração e temperatura controladas, permite a remoção de células, resíduos celulares e várias proteínas não-colagênicas, assim como a porção mineral, deixando uma estrutura proteica constituída basicamente de colágeno tipo I e uma pequena quantidade de fatores de crescimento, como proteínas morfogenéticas ósseas.⁹ O tratamento acima de 300 °C ou com álcalis, seguido por neutralização elimina o risco de transmissão de doenças.¹⁰ De fato, o Brasil ainda está em posição invejável com relação a isso, porque seu gado é livre de encefalopatia espongiforme (BSE ou doença da vaca louca).⁹ Estudos anteriores demonstraram a viabilidade de xenoenxertos em defeitos ósseos em fêmur de rato,¹¹ com resultados diferentes, dependendo do defeito experimental usado.^{12,13}

Um estudo recente mostrou que, das seis hidroxiapatitas particuladas analisadas, entre as encontradas no comércio brasileiro, apenas uma era compatível com as especificações do fabricante.¹⁴ Isso significa que a qualidade do material não é previsível para uso em aplicações clínicas, e que há necessidade de padrões, que são importantes na avaliação da qualidade de fabricação, na busca de materiais adequados.

Este estudo compara, por análise histológica, a biocompatibilidade, a biodegradação e a osteocondução de dois xenoenxertos bovinos - Osseus® e Bio-Oss®.

MATERIAIS E MÉTODOS

Quinze coelhos New Zealand White adultos, cada um pesando entre 2.500 g e 3.000 g, foram randomicamente divididos em três grupos: Osseus®, Bio-Oss® e coágulo sanguíneo. Este projeto recebeu aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (no. 0003/07). Os animais receberam um pré-anestésico (20 mg/kg de cetamina e 1 mg/kg de xilazina IM), seguido por um anestésico geral (isoflurano a 1% inalatório) e 0,3 mg/kg de lidocaína mais 0,1 mg/kg de morfina para anestesia espinal. Empregou-se clorexidina tópica para desinfecção, os pelos em torno da tíbia dos animais foram removidos e realizou-se uma incisão de 4 cm na pele das pernas traseiras. Depois de expor a superfície da tíbia (Figura 1A), três orifícios de 2 mm foram feitos com broca, a 1 cm de distância (Figura 1B) em cada tíbia, com irrigação contínua de solução salina. Foi usada furadeira de baixa rotação, com broca cirúrgica de 2 mm. Dois orifícios nas tíbias direita e esquerda foram imediatamente preenchidos com hidroxiapatitas bovina (A-Osseus® e B-Bio-Oss®) e os terceiros orifícios foram preenchidos com um coágulo sanguíneo. Os animais foram sacrificados com uma superdose de anestésico geral, nos períodos de 7, 14 e 28 dias após a cirurgia. Três fragmentos de tecido foram coletados e colocados em formaldeído tamponado a 10% por 48 horas, e desmineralizados em solução de descalcificação (Allkimia®) por 24 horas. Os cortes histológicos com 5 µm de espessura foram corados com hematoxilina e eosina (H&E), e examinados ao microscópio óptico. A reação das células aos xenoenxerto foi observada, focalizando-se a intensidade e a natureza da resposta inflamatória, e a presença de necrose, tecido conectivo fibroso e neoformação óssea em contato direto com o enxerto.

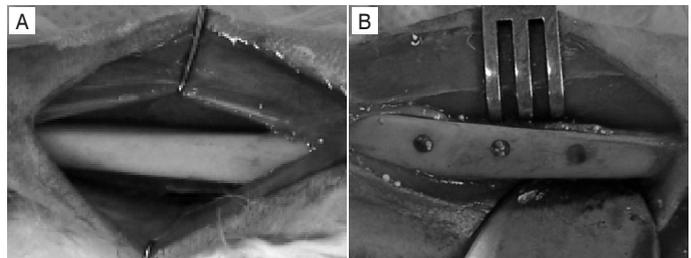


Figura 1 – Procedimento cirúrgico: A) Vista da tíbia depois de incisão e separação. B) Orifícios perfurados com biomateriais e sangue.

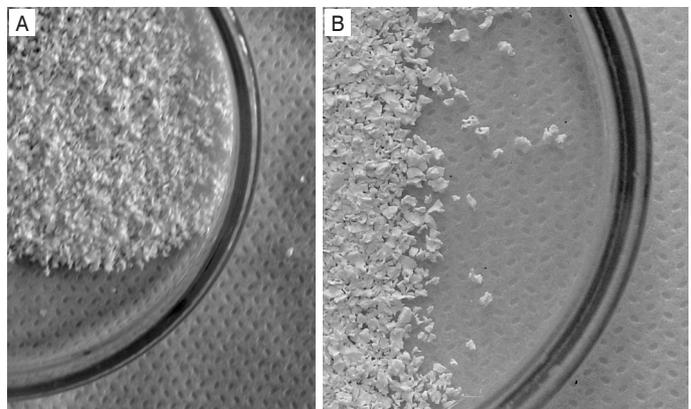


Figura 2 – Aspecto macroscópico dos xenoenxertos utilizados. A) Bio-Oss® e B) Osseus®.

RESULTADOS

Os biomateriais testados foram fáceis de manipular durante os procedimentos cirúrgicos. O grupo controle teve preenchimento completo com novo osso e não se observou inflamação adversa. As observações macroscópicas não apresentaram diferenças morfológicas entre os xenoenxertos (Figura 2). A análise microscópica mostrou muitos padrões similares em ambos os biomateriais. Infiltrados inflamatórios leves estavam presentes aos 7 dias (Figura 3) e ausentes aos 14 dias. Não foram observadas células gigantes multinucleadas. O processo de regeneração predominava depois de 14 dias. A osteogênese começou aos 7 dias, nas margens da lesão e expandiu-se durante todo o período experimental, preenchendo o defeito ósseo. A análise subjetiva sugeriu redução do tamanho das partículas que estavam totalmente incorporadas ao tecido ósseo (Figura 4).

DISCUSSÃO

Coelhos New Zealand White (*Orytolagus cuniculus*) são usados frequentemente como modelo em experiências ortopédicas e craniomaxilofaciais, devido à semelhança entre a densidade óssea e a resistência a fraturas desses animais e do ser humano.¹⁵ Os materiais osteocondutores precisam ter estrutura tridimensional e um grande número de poros interconectados, que permitam a proliferação celular e vascular e a formação de tecido de granulação em seu interior.¹⁶ Precisam ser biocompatíveis e absorvíveis, com degradação lenta e controlável e devem ter propriedades físico-químicas superficiais que favoreçam a proliferação celular. Os xenoenxertos testados apresentam todas essas

características durante as experiências, inclusive um certo grau de absorção do material e intussuscepção celular e óssea. Isso, provavelmente, deve-se à sua geometria favorável de poros biologicamente desenhados.

A regeneração óssea depende de irrigação vascular adequada, com os osteoblastos funcionando nas regiões adjacentes aos vasos sanguíneos, onde a formação de tecido ósseo altamente organizado requer superfície mecanicamente estável e sólida sobre a qual o osso neoformado pode ser depositado.¹⁷ Esse aspecto foi demonstrado em análise microscópica, na qual, em todos os estágios da experiência, a neoformação óssea originou-se da borda do osso basofílico desvitalizado e se estendeu sobre a superfície do biomaterial, juntamente com evidências de reabsorção. Isso mostra a adequação do xenoenxerto para proporcionar uma estrutura apropriada para revascularização e ossificação.¹⁸ Um biomaterial é considerado biocompatível quando mostra alta capacidade de induzir a resposta apropriada no hospedeiro, para uma aplicação específica.^{19,20} As observações histopatológicas confirmaram a avaliação clínica pós-operatória dos animais. Não havia sinais negativos como supuração, dor ou perda de peso. É digno de nota que, embora os defeitos na tíbia dos coelhos não tivessem tamanho crítico, eles foram completamente reparados com osso em contato direto com biomateriais, confirmando sua biocompatibilidade e osteocondução. O biomaterial ideal deve ser osteocondutor, reabsorvível e suscetível à ação osteoclástica, de modo a permitir a substituição óssea na área enxertada.²⁰ Neste estudo, observamos clara evidência de que os materiais eram parcialmente absorvidos e substituídos por tecido ósseo na borda dos biomateriais (Figura 3B e C).

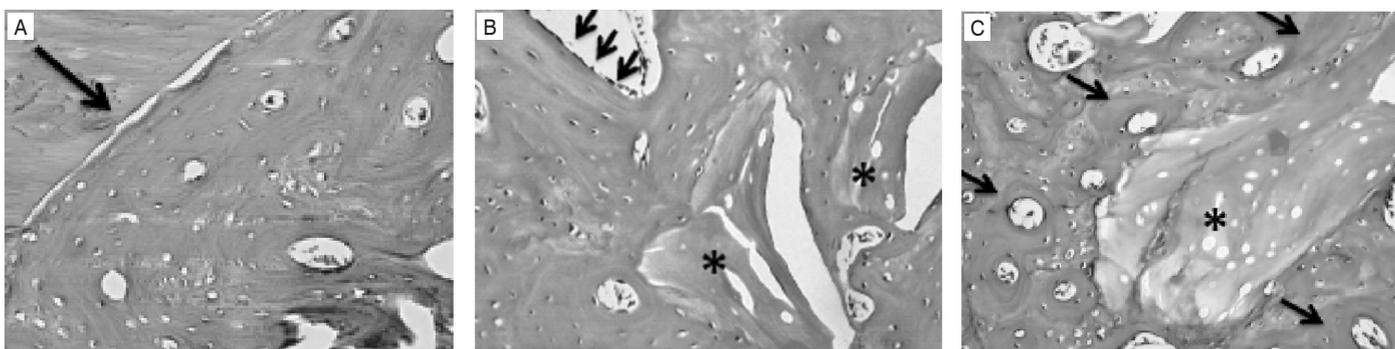


Figura 3 – Microfotografia do defeito ósseo 7 dias após a cirurgia. Grupo controle (coágulo): osteogênese iniciando na borda da lesão (setas, A). Grupo Bio-Oss®: com osteogênese evidente (setas, B). Grupo Osseus®: osteogênese envolvendo partículas de biomaterial (*). H&E. Aumentos: A, B: x12,5; C: x25.

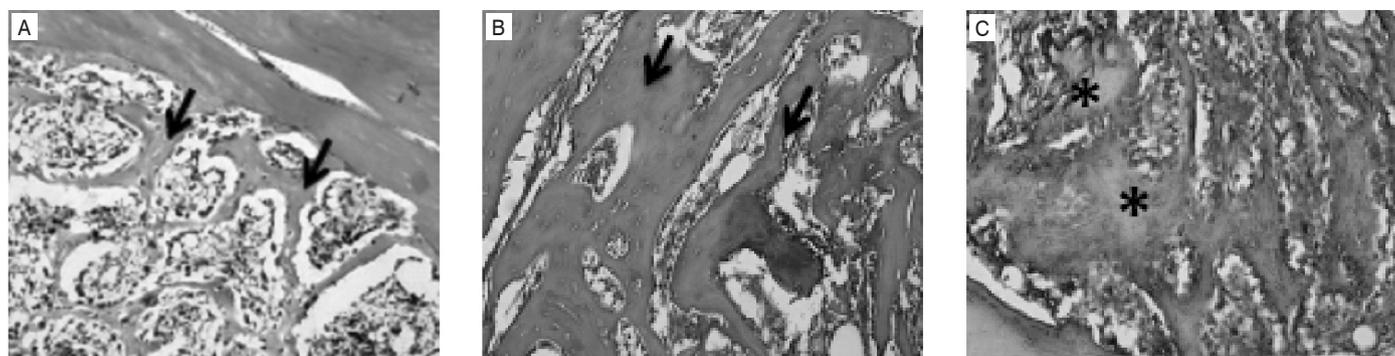


Figura 4 – Microfotografia do defeito ósseo 28 dias após a cirurgia A) Grupo controle (coágulo); a seta mostra a borda do defeito. B) Grupo Bio-Oss®, com setas mostrando uma camada de osteoblastos e biomaterial. C) Grupo Osseus®, onde as setas mostram áreas remodeladas. Os asteriscos mostram o biomaterial (Osseus®). H&E. Aumento: x12,5.

Uma das desvantagens dos xenoinxertos citada por alguns autores é a transmissão de doenças, mas sabe-se que os materiais desproteinizados como os usados em nossa experiência oferecem risco menor com relação a isso, em comparação com o tecido fresco congelado, devido à maneira como são processados.

Quando o grupo controle (coágulo sanguíneo) foi comparado aos grupos experimentais, sempre mostrou melhor neoformação óssea. Isso foi atribuído à evolução mais lenta da regeneração óssea quanto são usados enxertos em cavidade ou defeito ósseo, observação já feita por outros autores antes.^{3,12,13}

CONCLUSÃO

As observações clínicas e microscópicas levaram-nos a concluir que

partículas de ambos os biomateriais usados (Bio-Oss® e Osseus®) são biocompatíveis, permitem deposição direta de tecido ósseo em contato com o material e são, aparentemente, absorvíveis.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi parcialmente financiado pela SIN – Sistema de Implante, Sao Paulo, Brazil, mas sem qualquer influência na condução e análise do mesmo. Dr. Granjeiro e Dr. Rossi foram parcialmente financiados pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Cientista do Nosso Estado) e Departamento de Ciência e Tecnologia do Ministério da Saúde (DECIT/MS).

REFERÊNCIAS

1. Finkemeier CG. Bone grafting and bone graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am.* 2002;84:454-65.
2. Misch C. Contemporary Implant dentistry. St. Louis: Mosby; 1999.
3. Granjeiro JM, Oliveira RC, Bustos-Valenzuela JC, Sogayar MC, Taga R. Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. *Braz J Med Biol Res.* 2005;38:1463-73.
4. Pruss A, Seibold M, Benedix F, Frommelt L, von Garrel T, Gurtler L et al: Validation of the 'Marburg bone bank system' for thermoinfection of allogenic femoral head transplants using selected bacteria, fungi, and spores. *Biologicals.* 2003;31:287-94.
5. Eid K, Zelicof S, Perona BP, Sledge CB, Glowacki J. Tissue reactions to particles of bone-substitute materials in intraosseous and heterotopic sites in rats: discrimination of osteoinduction, osteocompatibility, and inflammation. *J Orthop Res.* 2001;19:962-9.
6. Rosa AL, Shareef MY, Noort RV. Efeito das condições de preparação e sinterização sobre a porosidade da hidroxiapatita. *Pesqui Odontol Bras.* 2000;14:273-7.
7. Yoshikawa T, Ohgushi H, Nakajima H, Yamada E, Ichijima K, Tamai S et al. In vivo osteogenic durability of cultured bone in porous ceramics: a novel method for autogenous bone graft substitution. *Transplantation.* 2000;69:128-34.
8. Macedo CAS, Galia CR, Silva ALB, Cesar PC, Sanches PRS, Duarte LS. Comparação da resistência à compressão do osso bovino congelado e liofilizado. *Rev Bras Ortop.* 1999; 34:529-534.
9. Sanada JT, Canova GC, Cestari TM, Taga EM, Taga R, Buzalaf MAR. Análise histológica, radiográfica e do perfil de imunoglobulinas após a implantação de enxerto de osso esponjoso bovino desmineralizado em bloco em músculo de ratos. *J Appl Oral Sci.* 2003;11:209-15.
10. Wentz B, Oesch B, Horst M. Analysis of the risk of transmission bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. *Biomaterials.* 2001;22:1599-606.
11. Torricelli P, Fini M, Rocca M, Giavaresi G, Giardino R. Xenogenic demineralized bone matrix: osteoinduction and influence of associated skeletal defects in heterotopic bone formation in rats. *Int Orthop.* 1999;23:178-81.
12. Torricelli P, Fini M, Giavaresi G, Rimondini L, Giardino R. Characterization of bone defect repair in young and aged rat femur induced by xenogenic demineralized bone matrix. *J Periodontol.* 2002;73:1003-9.
13. Calasans-Maia MD, Fernandes GVO, Rossi AM, Dias EP, Almeida GDS, Mitri FF et al. Effect of hydroxyapatite and zinc-containing hydroxyapatite on osseous repair of critical size defect in rat calvaria. *Bioceramics.* 2007;20:1273-6.
14. Conz MB, Granjeiro JM, Soares GA. Physicochemical characterization of six commercial hydroxyapatites for medical-dental applications as bone graft. *J Appl Oral Sci.* 2005;13:136-40.
15. Wang X, Mabrey JD, Agrawal CM. An interspecies comparison of bone fracture properties. *Biomed Mater Eng.* 1998;8:1-9.
16. Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials.* 2000;21:2529-4.
17. Sverzut CE, Lucas MA, Sverzut AT, Trivellato AE, Beloti MM, Rosa AL et al. Bone repair in mandibular body osteotomy after using 2.0 miniplate system--histological and histometric analysis in dogs. *Int J Exp Pathol.* 2008;89:91-7.
18. Sicca CM, Oliveira RC, Silva TL, Cestari TM, Oliveira DT, Buzalaf MAR. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular a enxertos de osso cortical bovino em subcutâneo de ratos. Efeito do tamanho da partícula. *Rev Fac Odontol Bauru.* 2000;8:1-10.
19. Zambuzzi WF, Oliveira RC, Piozzi R, Cestari TM, Taga R, Buzalaf MAR et al. Avaliação histológica do implante do osso fetal bovino acelular e desmineralizado em subcutâneo de ratos. *Rev Bras Ortop.* 2006;41:227-32.
20. Williams DF. Definitions in biomaterials. In: Proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials, England. New York: Elsevier; 1986.