

Jonas Dantas Batista

**ENXERTO ÓSSEO AUTÓGENO MANTIDO EM DIFERENTES
MEIOS DE ARMAZENAGEM NO PERÍODO TRANS-CIRÚRGICO.
ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA EM COELHOS.**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia da Universidade Federal de
Uberlândia, como requisito para obtenção
do título de Mestre em Odontologia: Área
de Concentração em Cirurgia e
Traumatologia Buco-Maxilo-Facial

Uberlândia, 2007

Jonas Dantas Batista

**ENXERTO ÓSSEO AUTÓGENO MANTIDO EM DIFERENTES
MEIOS DE ARMAZENAGEM NO PERÍODO TRANS-CIRÚRGICO.
ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA EM COELHOS.**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia da Universidade Federal de
Uberlândia, como requisito para obtenção
do título de Mestre em Odontologia: Área
de Concentração em Cirurgia e
Traumatologia Buco-Maxilo-Facial

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Paula Dechichi

Co-Orientador: Prof. Dr. Darceny Zanetta-Barbosa

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Paula Dechichi

Prof. Dr. Darceny Zanetta-Barbosa

Prof. Dr. Aparecido Eurípedes Honório Magalhães

Prof. Dr. Wilson Roberto Poi

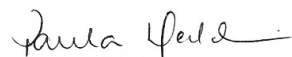
Uberlândia
2007

**RELATÓRIO DA COMISSÃO JULGADORA DA PROVA DE DEFESA DE MESTRADO,
NA QUAL ESTÁ INSCRITO O CIRURGIÃO DENTISTA JONAS DANTAS BATISTA DO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA DESTA UNIVERSIDADE.**

Às quatorze horas do dia vinte e três de março do ano de dois mil e sete, reuniu-se a Comissão Julgadora indicada pelo colegiado de Pós-Graduação desta Faculdade, para o julgamento da Dissertação apresentada pelo candidato, JONAS DANTAS BATISTA DO com o título: *“Enxerto ósseo autógeno mantido em diferentes meios de armazenagem durante o período trans-cirúrgico - Análise histomorfométrica em coelhos”*.

O julgamento do trabalho foi realizado em sessão pública compreendendo a exposição, seguida de arguição pelos examinadores. Encerrada a arguição, cada examinador expressou o seu julgamento, em sessão secreta e exarou o seu parecer. A Comissão Julgadora, após análise do Trabalho, verificou que o mesmo encontra-se em condições de ser incorporado ao banco de dissertações da Biblioteca. Acompanham este relatório os pareceres individuais dos membros da Comissão Julgadora.

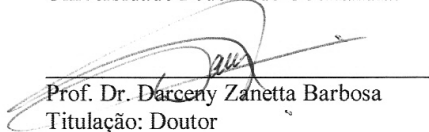
Uberlândia, 23 de março de 2007.



Prof. Dra. Paula Dechichi
Titulação: Doutora
Universidade Federal de Uberlândia.



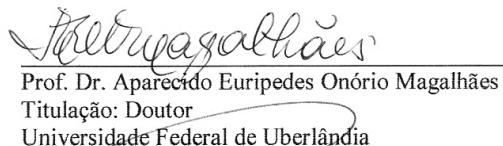
Aprovado/Reprovado/Conceito



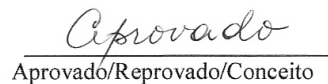
Prof. Dr. Darcenly Zanetta Barbosa
Titulação: Doutor
Universidade Federal de Uberlândia



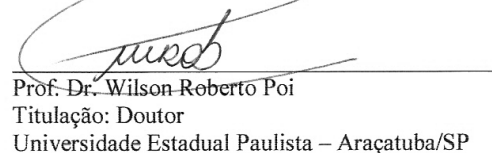
Aprovado/Reprovado/Conceito



Prof. Dr. Aparecido Euripedes Onório Magalhães
Titulação: Doutor
Universidade Federal de Uberlândia



Aprovado/Reprovado/Conceito



Prof. Dr. Wilson Roberto Poi
Titulação: Doutor
Universidade Estadual Paulista – Araçatuba/SP



Aprovado/Reprovado/Conceito

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais e irmãos, pelo suporte dado nestes anos para a concretização dos meus objetivos pessoais.

AGRADECIMENTOS

À Professora Paula Dechichi, orientadora desse trabalho, pela dedicação, enorme paciência e motivação constante, por ter feito possível a realização desse trabalho importante para minha formação profissional, e por acreditar em mim;

Ao Professor Darceny Zanetta-Barbosa, co-orientador deste trabalho, pela contribuição científica em muitos momentos decisivos, ajuda no refinamento da técnica cirúrgica do experimento e incentivo como exemplo de cirurgião buco-maxilo-facial e docente;

Aos Professores do Mestrado acadêmico de Odontologia, pelos conhecimentos adquiridos durante o curso;

Ao Professor Cirilo Antônio de Paula Lima, professor adjunto da Faculdade de Medicina Veterinária da UFU, por orientação no manejo de animais;

À Juliana Martins da Silva, mestranda do curso de Medicina Veterinária, pela orientação e ajuda no manejo dos coelhos;

Ao Professor Carlos José Soares, Coordenador do Programa de Pós Graduação da UFU pela ajuda na obtenção dos animais utilizados na pesquisa;

Ao Professor Sérgio Vitorino Cardoso, professor da área de Patologia Oral da UFU, pela ajuda na análise estatística;

Ao Dr. Amado, gerente do Hospital Veterinário da UFU, por ter cedido local para a realização dos estudos;

À Flaviana, pelo companheirismo, amizade e ajuda em todos os momentos da minha dissertação;

À Patrícia, Antônio, Lara, Andréia pela ajuda nas cirurgias experimentais deste trabalho;

À Andréia, Camila, pelo apoio no Laboratório de Histologia;

Aos amigos buco-maxilos Marcelo, Lair, Leonardo, Danilo, Fernanda, Rafaela, Nadim pela ajuda nas cirurgias experimentais;

À Cidinha, Giselda, Flaviane, Soraya, Nelson, Abigail, Josélia que me ajudaram nos momentos burocráticos para execução desse trabalho;

Aos técnicos de funcionários do Hospital Veterinário pela ajuda no tratamento dos animais;

A todos que contribuíram na execução desse trabalho que marca minha vida profissional e pessoal.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	01
RESUMO	02
ABSTRACT	04
1. INTRODUÇÃO	05
2. REVISÃO DE LITERATURA	07
2.1 HISTOFISIOLOGIA DO TECIDO ÓSSEO	07
2.2 REPARO ÓSSEO	08
2.3 ENXERTOS ÓSSEOS	09
2.4 CONSERVAÇÃO NO PERÍODO TRANS-CIRÚRGICO	12
3. PROPOSIÇÃO	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1 ANIMAIS	15
4.2 OBTENÇÃO DO PLASMA POBRE EM PLAQUETAS	15
4.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	16
4.4 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	17
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
5. RESULTADOS	21
6. DISCUSSÃO	25
7. CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

PPP	Plasma Pobre em Plaquetas
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
mm	Milímetros
%	Porcentagem
PBS	Tampão Fosfato Salina
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetracético
μm	Micrometros
α	Alfa
x	Veze
BMP	Proteína Óssea Morfor-genética
PDGF	Fator de Crescimento Derivada de Plaquetas
TGF- β	Fator de Crescimento Transformante Beta
IGF	Fator de Crescimento Similar a Insulina
Rpm	Rotações por Minutos
g	Gramas
cm	Centímetros
mg	Miligramas
G	Aceleração da gravidade

RESUMO

O sucesso do enxerto ósseo autógeno está relacionado à viabilidade das células deste, transferidas para o leito receptor. Durante os procedimentos de enxertia óssea, transcorre certo período entre a remoção e fixação do enxerto no leito receptor. Diversos meios de armazenagem têm sido sugeridos para minimizar os efeitos deletérios ao enxerto durante esse período. O objetivo deste estudo foi realizar análise histomorfométrica de enxertos ósseos autógenos *in vivo*, mantidos em diferentes meios de armazenagem no período trans-cirúrgico. Neste estudo, foram utilizados 18 coelhos dos quais foram removidos dois fragmentos da calvária. Em cada coelho, um fragmento foi imediatamente fixado na região de ângulo mandibular direito (grupo controle). O outro foi armazenado por 30 minutos em um dos seguintes meios: soro fisiológico (grupo soro), meio seco (grupo seco), plasma pobre em plaquetas (grupo PPP) e, em seguida, parafusado em local simétrico ao enxerto controle, no mesmo animal. Após 4 semanas os animais foram sacrificados e as regiões enxertadas foram removidas, fixadas em formol em PBS, desmineralizadas em EDTA e processadas para inclusão em parafina. O número de osteoclastos, número de vasos e a área total do enxerto foram quantificados e analisados através do teste t pareado, teste de ANOVA 1 e teste de Tukey. Nos lados experimental e controle, a análise histológica em todos os grupos apresentou enxerto revascularizado, preservado e integrado ao leito receptor, com presença de neoformação óssea. Na análise estatística, o lado experimental do grupo soro apresentou maior número de osteoclastos ($p=0,02$) e menor número de vasos ($p=0,03$) em relação ao grupo controle, mas não apresentou diferença na área total do enxerto. Nos grupos seco e PPP, não houve diferença estatística significativa na quantidade de osteoclastos, vasos e área total do enxerto em relação ao controle. Na comparação entre grupos experimentais, o grupo PPP apresentou maior número de vasos ($p<0,001$) e maior área total do enxerto ($p<0,001$) em relação aos grupos seco e soro. O plasma pobre em plaquetas favoreceu a revascularização e a manutenção do volume do enxerto, sendo um meio de armazenagem de enxerto, no período trans-cirúrgico, melhor que os meios soro e seco.

ABSTRACT

The success of autogenous bone graft is related to the graft cells viability transferred to receptor site. During surgical bone grafting procedures, a time passes by the graft removal till its fixation in receptor site. Various media for temporary storage of bone grafts during the surgical procedure have been suggested to minimize the deleterious effect during this period. This study performs histomorphometric analysis of autogenous bone graft, stored in different medias during surgical period. Two grafts were removed bilaterally from calvarian of 18 rabbits. One graft was removed and immediately fixed in one of the mandibular angles (control group). The other graft was stored during 30 minutes in one of the following storage media: saline solution (saline group), air (dry group), platelets poor-plasma (PPP group), and then screwed in the symmetrical side of the first graft, in the same animal. Four weeks later the animals were killed and the grafted areas were harvested and fixed in formaldehyde in PBS and embedded in parafin. The 5 μ m sections were stained in Hematoxylin Eosin and Mallory. Osteoclasts, blood vessels and total graft area were assessed and analyzed through, ANOVA 1, Tukey and t-matched pair tests. Histological analysis of all groups showed vascularized, preserved bone graft well-incorporated to receptor site. Statistical analysis of saline group shows higher amount of osteoclasts ($p=0,02$) and lower amount of blood vessels ($p=0,03$) than the control group. No differences between control and experimental groups were observed in dry and PPP groups. Comparing experimental groups, PPP group presented higher amount of blood vessels ($p<0,001$) and larger total graft area ($p<0,001$) than dry and saline group. The platelets poor plasma favored the vascularization and maintenance of graft area, being considered a better storage media than air way and saline solution.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de enxertos ósseos é uma ferramenta clínica que possibilita a reconstrução do esqueleto na região craniofacial (Gleizal & Beziat, 2007). Diferentes enxertos são utilizados para favorecer a regeneração óssea, sendo o enxerto autógeno o que melhor corresponde às características de um enxerto ideal (Foitzik & Staus, 2003).

Diversos fatores podem influenciar a integração e manutenção do enxerto autógeno tais como: origem embrionária (Smith & Abramson, 1974; Zins & Whitaker, 1983; Hardesty & Marsh, 1990), revascularização, (Albrektsson, 1980; Kusiak *et al.*, 1985; Hardesty & Marsh, 1990; Lin *et al.*, 1990; Phillips & Rahn, 1990; Sullivan & Szwajkun, 1991; Chen *et al.*, 1994), uso de fixação rígida (Latrenta *et al.*, 1989; Lin *et al.*, 1990; Phillips & Rahn, 1990), vascularização do leito receptor, contato enxerto-leito receptor e estresse fisiológico sofrido pelo enxerto (Latrenta *et al.*, 1989).

A manutenção do volume e a remodelação precoce do enxerto são fatores importantes para o sucesso cirúrgico (Alberius *et al.*, 1996). A revascularização precoce é importante para a manutenção de volume do enxerto (Kusiak *et al.*, 1985), apesar de não haver consenso neste aspecto (Lin *et al.*, 1990; Sullivan & Szwajkun, 1991; Chen *et al.*, 1994)

A obtenção do enxerto e o preparo do leito receptor devem preservar as células para um melhor resultado clínico. Estudos experimentais em animais mostraram que as células do enxerto ósseo têm papel importante na osteogênese (Burwell, 1964; Gray & Elves, 1979; 1981).

Durante o procedimento cirúrgico, entre a remoção do enxerto e sua fixação no leito receptor, geralmente transcorre um período que pode variar de minutos a horas (Gray & Elves, 1981). Diversos meios de conservação são estudados como alternativas para armazenamento do enxerto, tais como: soro fisiológico (Bohr *et al.*, 1968; Marx *et al.*, 1979; Steiner & Ramp, 1988; Mcanulty, 1999; Dechichi *et al.*, 2004; Moura *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2006), água destilada (Marx *et al.*, 1979; Steiner & Ramp, 1988), plasma sanguíneo (Marx *et al.*, 1979), sangue (Mcanulty, 1999; Ramos *et al.*, 2006), plasma pobre em plaquetas (Dechichi *et al.*, 2004; Ramos *et al.*, 2006), meio seco (Puranen, 1966; Bohr *et al.*, 1968; Gray & Elves, 1981; Laursen *et al.*, 2003; Ramos *et al.*,

2006), solução de dextrose lactato 5% (Marx *et al.*, 1979; Steiner & Ramp, 1988; Ramos *et al.*, 2006) e diversos meios de cultura (Gray & Elves, 1981; Steiner & Ramp, 1988; Marx & Stevens, 1997; Mcanulty, 1999).

Vários métodos são utilizados para avaliar a qualidade dos enxertos mantidos em meios de conservação tais como contagem de células (Marx *et al.*, 1979; Mcanulty, 1999), morfologia (Dechichi *et al.*, 2004; Moura *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2006), metabolismo celular (Steiner & Ramp, 1988) e proliferação de osteoblastos (Laursen *et al.*, 2003), assim como mensuração da neoformação óssea (Bohr *et al.*, 1968; Gray & Elves, 1981).

O comportamento biológico *in vivo*, de enxertos armazenados em diferentes meios no período trans-cirúrgico ainda está pouco esclarecido, principalmente em relação à revascularização, redução de células viáveis transplantadas e o efeito destes fatores na ativação de osteoclastos e conseqüente redução da área total do enxerto.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Para o melhor entendimento do objetivo deste estudo, serão abordados aspectos gerais da histofisiologia do tecido ósseo, reparo ósseo e a utilização de enxertos ósseos

2.1 Histofisiologia do tecido ósseo

O osso é um tecido conjuntivo especializado constituído de matriz extracelular mineralizada. A porção orgânica da matriz representa 33% e destes, 28% são constituídos por colágeno tipo I e 5% de proteínas não colágenas. Os 67% restantes correspondem à porção inorgânica da matriz, representada pelos cristais de hidroxiapatita (Katchburian & Arana Chaves, 2004).

As células responsáveis pela produção da matriz orgânica são os osteoblastos, que também participam do processo de mineralização. Adjacentes aos osteoblastos existem células osteogênicas que se diferenciam nos mesmos, quando necessário. Durante a formação da matriz óssea alguns osteoblastos ficam aprisionados na matriz, sendo então denominados osteócitos. Estas células constituem uma rede celular que permite a comunicação entre elas e destas com os osteoblastos da superfície. Os osteoclastos, responsáveis pela reabsorção óssea, são células multinucleadas, que se localizam na superfície da matriz, sendo ativos no processo de remodelação óssea (Katchburian & Arana Chaves, 2004).

Macroscopicamente, o tecido ósseo pode apresentar um arranjo trabecular delimitando pequenas cavidades, preenchidas por medula óssea, caracterizando o osso esponjoso. O osso compacto é formado por lamelas ósseas paralelas ou concêntricas (sistemas de Havers), não apresentando cavidades. Osso esponjoso e compacto apresentam arquitetura macroscópica diferente mas possuem a mesma constituição histológica (Katchburian & Arana Chaves, 2004).

Histologicamente, o tecido ósseo pode ser classificado em primário (imaturo) ou secundário (maduro ou lamelar). O tecido ósseo imaturo apresenta fibrilas colágenas sem organização definida, maior número de osteócitos

incluídos na matriz óssea e menor conteúdo mineral. No adulto, ocorre apenas nas suturas dos ossos do crânio, nos alvéolos dentários e em alguns pontos de inserção de tendões. O tecido ósseo maduro apresenta fibrilas colágenas organizadas formando lamelas ou camadas, possui menor número de osteócitos incluídos na matriz e maior conteúdo mineral, sendo o tipo predominante no adulto.

As superfícies internas e externas dos ossos são revestidas por células osteogênicas e tecido conjuntivo, que constituem o endóstio e o perióstio, respectivamente. Estes tecidos possuem a função de nutrir o tecido ósseo e fornecer osteoblastos para o crescimento e a reparação do osso (Junqueira & Carneiro, 2004). O endóstio é mais rico em células, principalmente precursoras de células ósseas e suprimento vascular enquanto, o perióstio é um conjuntivo fibroso (Ten Cate, 2001; Katchburian & Arana Chaves, 2004).

Apesar da rigidez e aparente inatividade, o tecido ósseo é muito dinâmico, apresentando um processo combinado de formação e reabsorção, denominado de remodelação óssea. Este processo é contínuo e fisiológico permitindo que o tecido ósseo se renove constantemente, responda aos estímulos externos e também sofra reparação (Katchburian & Arana Chaves, 2004).

2.2 Reparo Ósseo

O processo de reparo tecidual pode ocorrer por regeneração ou cicatrização. A regeneração caracteriza o processo de reparo que resulta no restabelecimento integral de forma e função originais, já na cicatrização ocorre o restabelecimento parcial. O tecido ósseo geralmente sofre reparo por regeneração (Khan *et al.*, 2005).

Nos locais de lesão óssea ocorre hemorragia, pela lesão de vasos sanguíneos, destruição de matriz e morte de células ósseas (Junqueira & Carneiro, 2004). Nesta região surge um espaço morto, hipóxico ($PO_2 = 5$ a 10mmHg) e acidótico (pH 4 a 6) contendo plaquetas, leucócitos, eritrócitos, e fibrina adjacente a osteócitos, osteoblastos e células mesenquimais (Lynch *et al.*, 1999). As plaquetas, ativadas pela lesão vascular, liberam mediadores químicos (PDGF, TGF, IGF) presentes nos grânulos α (Lynch *et al.*, 1999).