



EDUARDO MORESCHI

**EFEITO DA DOLOMITA NO REPARO DE CAVIDADES  
ÓSSEAS EM RATOS: ANÁLISE RADIOGRÁFICA E  
HISTOLÓGICA**

**MARINGÁ**

**2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

EDUARDO MORESCHI

EFEITO DA DOLOMITA NO REPARO DE CAVIDADES ÓSSEAS  
EM RATOS: ANÁLISE RADIOGRÁFICA E HISTOLÓGICA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos, da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Dra Ciomar Aparecida Bersani-Amado

Maringá

2008

**Agradeço a Deus, Pai supremo, por ter me concedido de forma brilhante a sabedoria, o discernimento e a compreensão. E consagro este trabalho ao Sagrado Coração de Jesus.**

## DEDICO ESTE TRABALHO

À **Ana Regina,**

pelo que representa em minha vida, como esposa e amiga, por todo incentivo e apoio nunca negados.

Carinhosamente, aos meus irmãos:

**Dorival, Marcos e Fernando,**

por tanto investimento na minha formação.

Aos meus pais:

**Dorival** (*in memoriam*) e **Lucília,**

pela sabedoria e discernimento com que conduziram minha educação, pelo amor que sempre esteve presente, de forma real e muito sincera.

## AGRADECIMENTOS

A minha Orientadora,

***Prof. Dra. Ciomar A. Bersani-Amado***

Meu respeito e admiração

**O meu muitíssimo obrigado !!!**

À professora ***Dra Luzmarina Hernandes***, pela brilhante co-orientação prestada neste trabalho.

## AGRADECIMENTOS PESSOAIS

Aos amigos **Renato Zardetto Jr, Vilmar Gottardo, Cleverson Trento e Manfredo Zamponi**, pela amizade e trocas de conhecimentos.

Ao amigo e companheiro **Wagner Simm** por acreditar, mesmo de forma imparcial, na minha carreira de docência.

Aos funcionários do Laboratório de Inflamação do Departamento de Farmácia e Farmacologia da Universidade Estadual de Maringá **Jailson Araújo Dantas e Célia Regina Miranda** por todo apoio e dedicação nas fases experimentais deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Histologia do Departamento de Ciências Morfofisiológicas da Universidade Estadual de Maringá **Maria Euride Carlo Cancino, Ana Paula Sonti e Maria dos Anjos Fortunato** pelo apoio técnico.

## **AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS**

À direção da Universidade Estadual de Maringá (UEM), na pessoa do magnífico reitor

***Prof. Décio Sperandio***

À direção do Centro Universitário de Maringá (CESUMAR), na pessoa do magnífico reitor

***Prof. Wilson de Matos Silva***



## **“EPÍGRAFE”**

*“Eu sei quem eu sou, os outros só me imaginam...”*

(Pe. Fábio de Melo)

# SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO.....2

MATERIAL E MÉTODOS.....4

RESULTADOS .....8

    ANÁLISE RADIOGRÁFICA .....8

    ANÁLISE HISTOLÓGICA .....11

DISCUSSÃO.....19

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....23

ANEXOS

## RESUMO

O presente estudo objetivou a avaliação radiográfica e histológica do efeito da dolomita ( $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$ ) no processo de reparo ósseo de cavidades na calvária de ratos. Em cada animal foi produzido um defeito ósseo circular, com 10mm de diâmetro, que foi preenchido com dolomita, osso bovino inorgânico (controle positivo) ou coágulo (controle negativo). Os animais foram mortos após 7, 15, 30 e 60 dias pós-cirurgia. Os defeitos foram removidos, radiografados para determinar a evolução da neoformação óssea e processados para inclusão em parafina e coloração com hematoxilina e eosina para estudo histopatológico. As radiografias foram escaneadas para obtenção das áreas inicial e final de cada defeito, por meio de programa de análise de imagem (*Image-ProPlus*). A diferença média entre as áreas foi calculada. A análise radiográfica demonstrou que os defeitos preenchidos com osso bovino inorgânico apresentaram aumento significativo na formação óssea em relação à dolomita e ao coágulo após 30 e 60 dias. Nos mesmos períodos, o estudo histológico demonstrou que os defeitos preenchidos com dolomita apresentaram uma resposta inflamatória predominantemente do tipo mononuclear, com predomínio de macrófagos e células gigantes. Diferentes padrões de deposição de fibras colágenas, de acordo com o material estudado foram observados. Não foi detectada atividade osteocondutora por parte da dolomita, em comparação com o osso bovino. Demonstrou-se radiograficamente o emprego da dolomita foi favorável ao processo de reparo, quando comparado com o grupo coágulo.

**Palavras-chave:** dolomita, osso bovino inorgânico, reparo ósseo, estudo histopatológico, estudo radiográfico

## **ABSTRACT**

The aim of this study is to evaluate radiographic and histologically the effect of dolomite ( $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$ ) in the repair of bone cavities in the calvaria of rats. In calvaria of each animal was produced a circular bone defect with a diameter of 10mm and 1mm, which was filled with dolomite, inorganic bovine bone (positive control) and coagulum (negative control). The animals were killed after 7, 15, 30 and 60 days after surgery. The defects were removed, radiographed to determine the evolution of bone neoformation and processed for inclusion in paraffin and staining with hematoxylin and eosin for histological study. The radiographs were scanned to obtain the start and end of each defect area, through the image programme (Image-ProPlus). The average difference between the areas was calculated. The radiographic analysis showed that the bone defects filled with inorganic bovine bone showed significant increase in bone formation in relation to dolomite and the coagulum after 30 and 60 days. The histological study showed that the defects filled by dolomite showed an inflammatory response predominantly the type mononuclear, with a predominance of macrophages and giant cells. Different patterns of deposition of collagen fibers, according to the material studied were observed. No osteoconductive activity was detected by the dolomite, compared with the inorganic bovine bone. It was evident radiographically that dolomite use was favourable to the process of bone repair, compared with the group coagulum.

**Key-words:** dolomite, inorganic bovine bone, bone repair, radiographic study, histological study

## INTRODUÇÃO

O tecido ósseo se caracteriza por apresentar potencial regenerativo, com capacidade para restaurar completamente sua estrutura e funções originais. No entanto, em algumas situações, os defeitos ósseos não conseguem ser reparados (LINDHE, 2005). Assim, para auxiliar ou promover o reparo ósseo, uma variedade de biomateriais são pesquisados e desenvolvidos para uso na Odontologia e Medicina (CARNEIRO, 2003).

Van Meeken em 1682, foi o primeiro a relatar, na literatura, um caso de enxerto ósseo, retirando osso do crânio de cão, para corrigir um defeito cranial no homem. Posteriormente, esse assunto foi objeto de estudo de diversos pesquisadores que foram motivados pelo sucesso clínico dos procedimentos realizados (PHEMISTER, 1914; MOWLEN, 1963; ADELL, 1974; FRAZILI et al., 1978; OKLUND et al., 1985; JENSEN et al, 1996 ; MENDONÇA, 2005).

O material utilizado para enxertia, dependendo de sua composição e origem, pode atuar no osso receptor por meio de três mecanismos biológicos: osteogênese, osteoindução e osteocondução (MISCH, 1993; MARX, 1994; LEE, 1997).

O único material disponível com a característica de osteogênese é o osso autógeno (MISCH, 1993, VASCONCELOS et al., 1999). Sua capacidade de neoformar o tecido ósseo, mesmo na ausência de células mesenquimais indiferenciadas, caracteriza esta propriedade por ser composto de células viáveis, as quais produzem fatores de crescimento para este fim (MATSUMOTO, 1999).

A osteoindução refere-se à capacidade de um material induzir a transformação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos, em um local onde espontaneamente isto não ocorreria (MISH, 1993; MARX, 1994). Os aloenxertos são exemplos mais representativos desse mecanismo.

A osteocondução é caracterizada pela formação de um novo osso sobre um arcabouço de substância biológica ou aloplástica, a partir de células osteogênicas já existentes no osso (MISCH, 1993; MARX, 1994). São exemplos de materiais osteocondutores: a hidroxiapatita, osso bovino inorgânico e o osso congelado.

Adell (1974) foram os primeiros pesquisadores que estudaram a utilização de enxertos ósseos autógenos com implantes de titânio (endósseo) em maxilas intensamente atroficas. A escolha das áreas doadoras para reconstrução óssea depende, dentre outros fatores, do volume de osso necessário para preencher o defeito ósseo. Para pequenas e médias perdas ósseas, áreas intra-bucais podem ser utilizadas, como o mento, a área retro-molar e o túber da maxila.

No entanto, para reconstruções maiores, normalmente são utilizadas áreas doadoras externas como, o osso ilíaco, a calota craniana e a tíbia (KUABARA et al., 2000).

A possibilidade da correção de defeitos ósseos tem despertado grande interesse no desenvolvimento de materiais que apresentam características biológicas compatíveis como substitutos ósseos. De modo geral, o enxerto autógeno é o mais recomendado, por apresentar melhores resultados na correção de defeitos. No entanto, muitas vezes a indicação e o uso desse material é limitada por fatores como tamanho do defeito ósseo e desconforto do paciente (GRANJEIRO et al., 1992; JENSEN et al., 1996; BOECK, 1997; BECKER et al., 1998; FURUSAWA et al., 1998; KOEMPEL et al., 1998; CAMARINI, 2001).

Assim, a utilização de biomateriais tem sido sugerida a fim de restabelecer a função e a morfologia de áreas que sofreram intervenções cirúrgicas, aumentar o rebordo alveolar atrófico em defeitos ósseos periodontais e nas perdas ósseas associadas ou não a implantes osseointegrados (CAMARINI, 2001). Entre eles, o interesse naqueles à base de fosfato de cálcio se justifica em razão das suas semelhanças química e cristalográfica com a fase mineral do osso e também por não induzirem reações adversas (CAMARINI, 2001). Os materiais aloplásticos, por sua vez, são considerados mais biocompatíveis, por apresentarem propriedades osteocondutoras, mantendo um arcabouço sobre o qual ocorre a neoformação óssea (GRANJEIRO et al., 1982; COBB et al., 1990; GREGHI & CAMPOS Jr., 1994; JENSEN et al., 1996; ZENÓBIO 1996; KOEMPEL et al., 1998).

A dolomita é um mineral à base de carbonato de cálcio e magnésio na proporção de 2:1, respectivamente, cuja fórmula química é  $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$ . Na Idade Média a dolomita era utilizada na forma de pó como um valioso tratamento para doenças da pele e dos ossos. Em 1972, este mineral recebeu o nome de dolomita pelo mineralogista francês Déodat de Dolomieu. Atualmente é conhecida popularmente por suas ações alcalinizante, antiinflamatória, analgésica, calmante, descongestionante, tonificante, relaxante e revitalizante muscular. Contudo, não há estudos comprovando tais efeitos biológicos (STARK & MEIER, 2002). A proposta deste trabalho foi investigar o efeito da dolomita no processo de reparo de cavidades ósseas criadas cirurgicamente.

## MATERIAL E MÉTODO

Todos os procedimentos envolvendo o uso de animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (025/2006-CEEA).

### *Procedimento experimental*

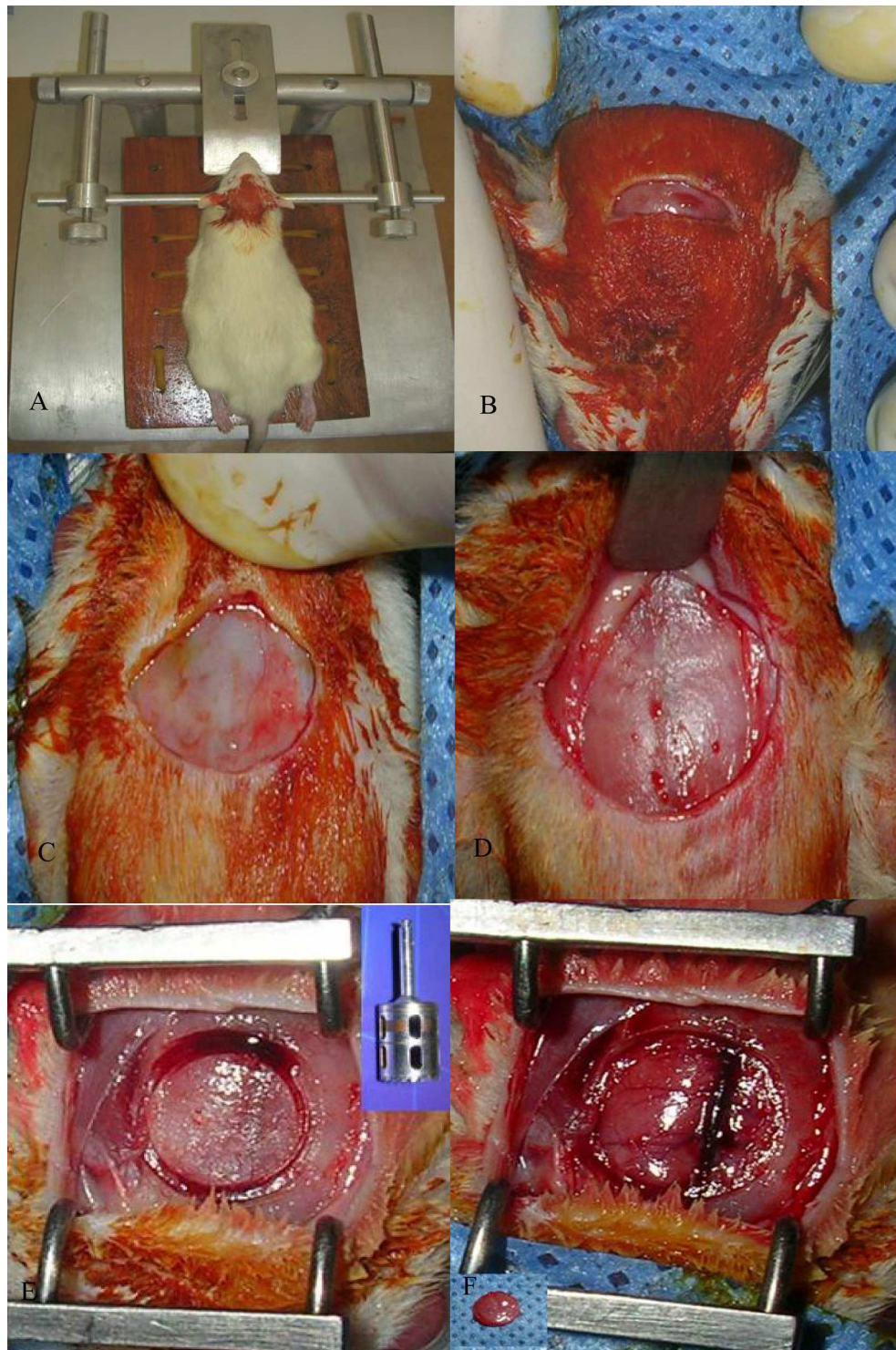
Foram utilizados 48 ratos da linhagem Wistar, machos, com peso corporal de 250 a 300g.

Os animais foram anestesiados por via intramuscular com Xilazina e Ketamina (1:1) e posicionados em mesa cirúrgica própria (Figura 1A). Após tricotomia da região da cabeça e anti-sepsia com iodo tópico foi realizada infiltração anestésica local com 0,6 ml de Mepivacaína 2% com adrenalina 1: 100.000 (Mepiadre®), para incisão transversal da pele e tecido subcutâneo, na região dorsal do animal (Figura 1B). A pele foi então deslocada até a região do crânio (Figura 1C) onde se incisou o perióstio para acesso ao osso calvarial (Figura 1D).

Na calvária de cada animal foi produzido um defeito ósseo com 10 mm de diâmetro e 1 mm de profundidade, utilizando-se uma broca do tipo trefina NEODENT® montada em peça-reta (Kavo®) acoplada a um motor elétrico cirúrgico (Beltec®) sob rotação de 30000 r.p.m. com abundante irrigação com soro fisiológico estéril (Figura 1E e 1F). No detalhe (Figura F) é mostrado a porção removida.

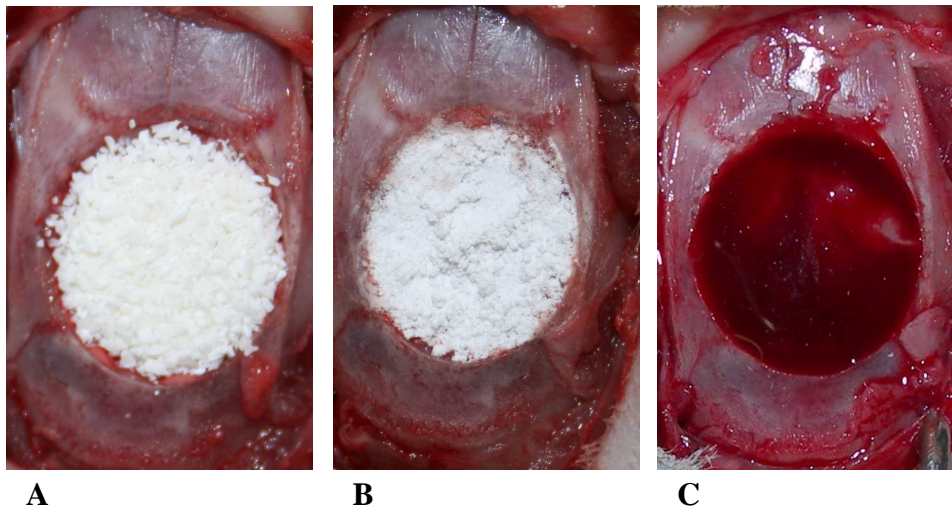
Os animais foram divididos em três grupos experimentais, de acordo com o tipo de material utilizado para preencher o defeito ósseo (Figura 2):

1. Grupo teste (n=16): as cavidades foram preenchidas com dolomita (Dr. Kanyo®) previamente autoclavada e submetida a exame toxicológico e microbiológico (em anexo), os quais foram concludentes para ausência de metais pesados e microorganismos;
2. Grupo controle positivo (n=16): os defeitos foram preenchidos com osso bovino inorgânico particulado liofilizado (Consulmat®);
3. Grupo controle negativo (n=16): nestes animais assegurou-se a formação de um coágulo preenchendo todo defeito.



**Figura 1.** Posicionamento do animal em plataforma específica para o procedimento operatório (A). Incisão na pele na região dorsal do animal (B). Tracionamento da pele até o osso calvarial (C). Incisão e descolamento do periósteo e exposição do osso calvarial (D). Cavidade óssea de formato circular realizada com broca trefina (E). Remoção de porção circular do osso calvarial e obtenção da cavidade óssea (F). No detalhe, porção removida.





**Figura 2.** Cavidades ósseas preenchidas por osso bovino inorgânico particulado liofilizado (A), dolomita (B) e coágulo (C).

Após o preenchimento das cavidades, o periósteo foi reaproximado, procedendo-se a sutura da pele por pontos simples utilizando fio de nylon 4-0 Mononylon®.

No pós-operatório, os animais foram mantidos em Biotério com ração e água *ad libitum*, em ciclo claro/escuro de 12/12 horas e temperatura de 20°C.

Após 7, 15, 30 e 60 dias os animais (quatro/tempo) foram mortos por aproveitamento anestésico e os espécimes foram coletados para análises radiográfica e microscópica.

#### *Procedimento radiográfico*

Os espécimes contendo os defeitos ósseos foram coletados preservando-se uma margem de tecido ósseo. Padronizou-se uma distância de 5,0 cm entre o material biológico e o tubo do aparelho de raios-x. Foram realizadas radiografias ortorradaiais utilizando-se filme radiográfico Kodak Ektaspeed®, com tempo de exposição de 0,4 segundos e mantendo o processo de revelação padrão. Todos os espécimes foram radiografados e escaneados em escaner específico *HP scanjet 4890*

A área inicial das cavidades foi obtida a partir das imagens das margens do defeito dos animais do grupo controle negativo, aos 7 dias de pós operatório, quando ainda era possível observar a margem inicial, devido à sua maior radiopacidade em relação ao osso neoformado.

A área final dos defeitos foi obtida por meio de programa de análise de imagem (*Image- Pro Plus*). Posteriormente calculou-se a diferença média entre as áreas inicial e final dos grupos estudados, como forma de determinar a evolução da neoformação óssea. Os resultados foram expressos em  $\text{mm}^2$ . As médias foram estatisticamente comparadas pelo teste *t* de Student, sendo o valor de  $p < 0,05$  considerado significativo.

#### *Processamento histológico*

Após serem radiografadas as peças foram mergulhadas em solução de formaldeído 10% por 48 h, desmineralizadas em solução de Morse (ácido fórmico 50% e citrato de sódio 20%) e processadas após inclusão em parafina. Foram realizados cortes semi-seriados de 5  $\mu\text{m}$ , que foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para avaliação histológica.

## **RESULTADOS**

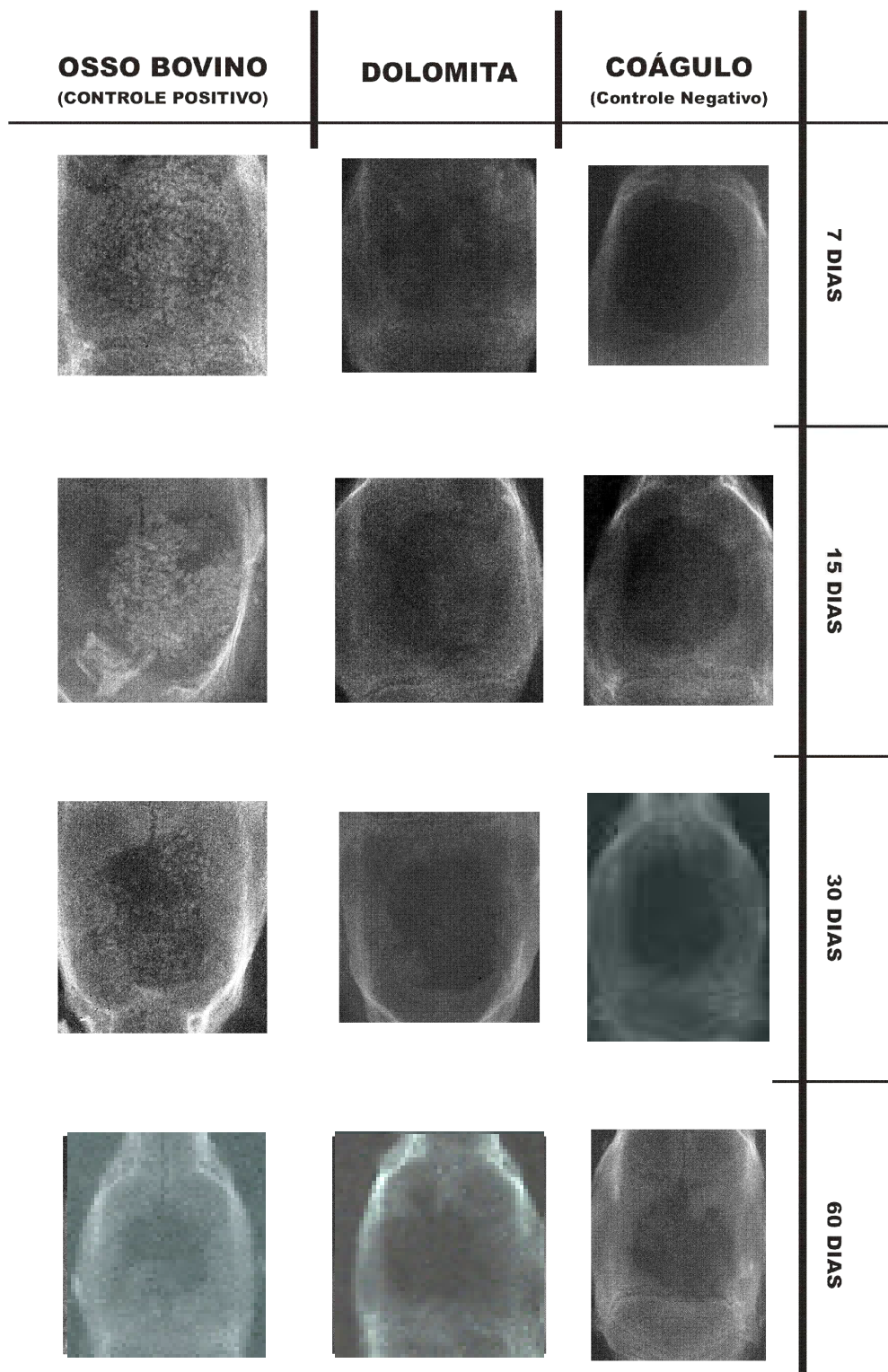
### **1. ANÁLISE RADIOGRÁFICA**

#### **1.1. Projeção radiográfica do processo de reparo ósseo nos períodos experimentais de 7, 15, 30 e 60 dias.**

No grupo osso bovino (controle positivo) observou-se radiograficamente aos 7 dias a cavidade cirúrgica totalmente preenchida pelo material; aos 15 dias parte de foi reabsorvido e um progressivo processo de reparo ósseo pode ser observado nas bordas e no centro da cavidade nos períodos de 30 e 60 dias (Figura 3).

No grupo dolomita observou-se radiograficamente resultados similares ao osso bovino. Aos 7 dias a cavidade cirúrgica se encontrava totalmente preenchida pelo material; aos 15 dias parte desse material foi reabsorvido, e nos períodos de 30 e 60 dias um progressivo processo de reparo ósseo pode ser observado nas bordas e no centro da cavidade (Figura 3), porém sem obliterar completamente o defeito.

No grupo coágulo (controle negativo) observou-se radiograficamente que a cavidade cirúrgica de 10 mm de diâmetro permaneceu inalterada aos 7 e 15 dias. Nos períodos de 30 e 60 dias, foi observado um progressivo processo de reparo ósseo nas bordas da cavidade, no entanto, a cavidade não obliterou completamente (Figura 3), à semelhança do ocorrido nos demais grupos.

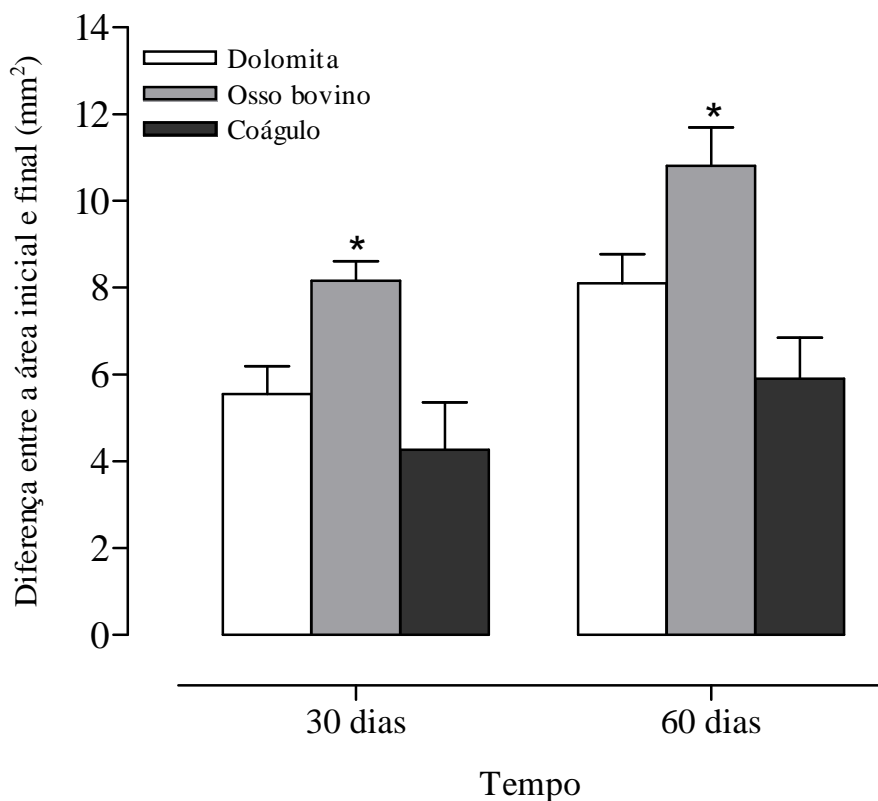


**Figura 3.** Projeção radiográfica do processo de reparo ósseo na calvária de ratos após o preenchimento com osso bovino, dolomita, e coágulo, nos períodos experimentais de 7, 15, 30 e 60 dias de pós-operatório.

## 1.2. Análise da área do osso neoformado

Os períodos de 7 e 15 dias foram excluídos da análise morfométrica por apresentarem, nos grupos dolomita e osso bovino, uma radiopacidade própria da não reabsorção destes materiais.

A Figura 4 apresenta a neoformação média de tecido ósseo para o interior do defeito, expresso como a diferença média ( $\text{mm}^2$ ) entre as áreas inicial e final. A Tabela 1 demonstra a porcentagem de redução da cavidade inicial na calvária de ratos preenchidas com osso bovino, dolomita e coágulo.



**Figura 4.** Diferença entre as áreas inicial e final do defeito ósseo após 30 e 60 dias pós-operatório. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (n=4).\*  $P < 0,05$  quando comparado aos grupos dolomita e coágulo. Teste  $t$  de Student.

**Tabela 1.** Percentual de redução da cavidade inicial na calvária após a colocação de biomateriais.

<b>Grupos</b>	<b>Redução da cavidade (%) 30 dias*</b>	<b>Redução da cavidade (%) 60 dias*</b>
Osso bovino	40,76	55,38
Dolomita	28,64	39,8
Coágulo	21,71	29,92

\* Dias após o preenchimento das cavidades ósseas com os respectivos materiais de reparo (osso bovino inorgânico, dolomita e coágulo).

## **2. ANÁLISE HISTOLÓGICA**

### **2.1. Observação clínica**

Na avaliação clínica da região operada após 7, 15, 30 e 60 dias da enxertia com dolomita, osso bovino ou coágulo não foram observadas alterações como rubor, aumento de temperatura ou edema.

### **2.2. Observação microscópica**

#### **2.2.1. Grupo experimental: dolomita**

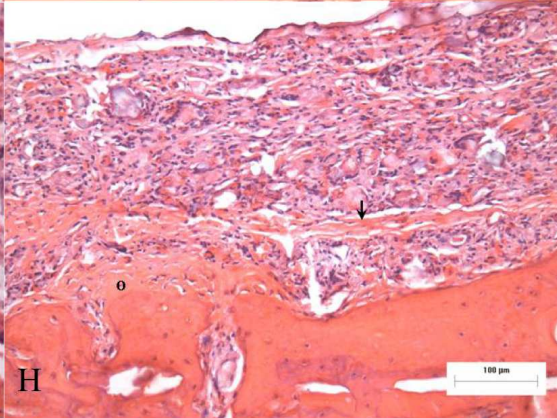
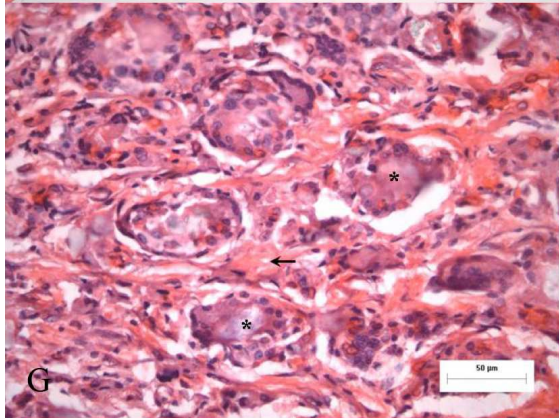
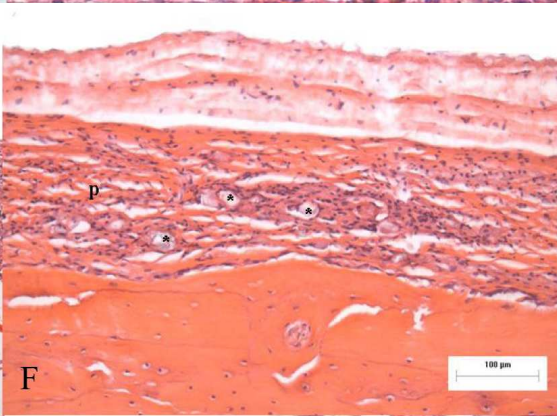
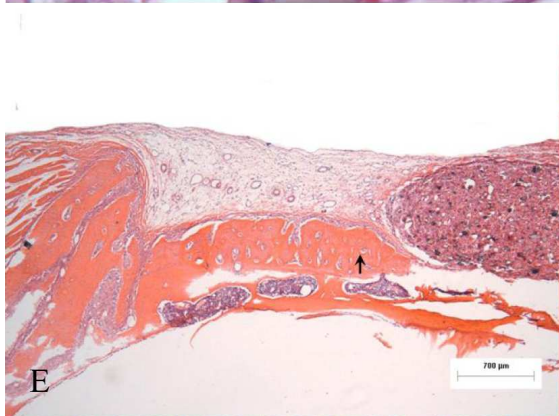
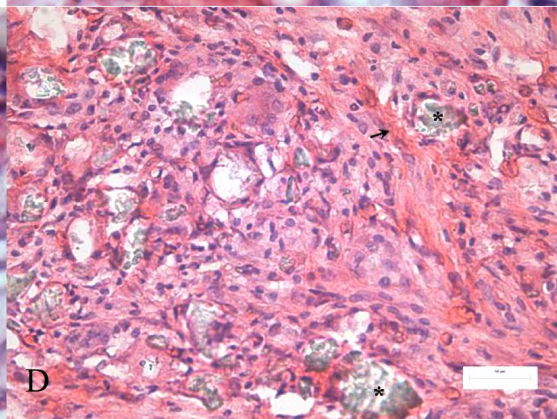
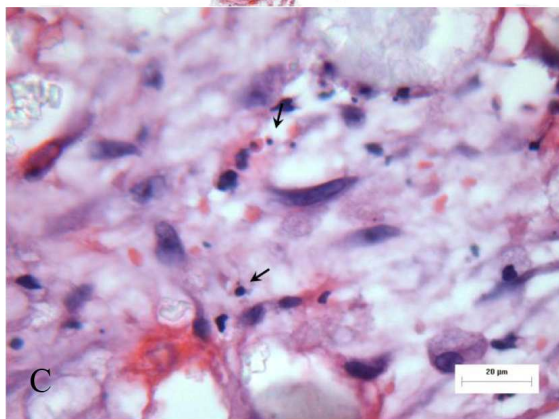
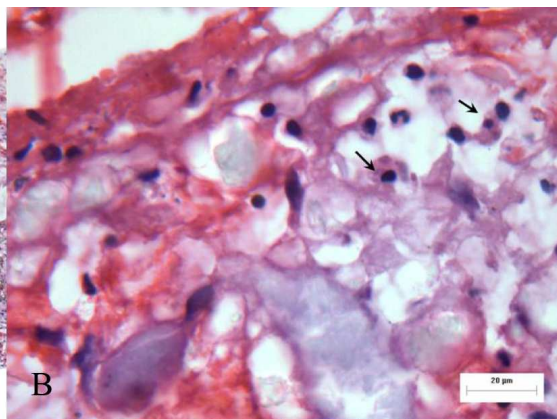
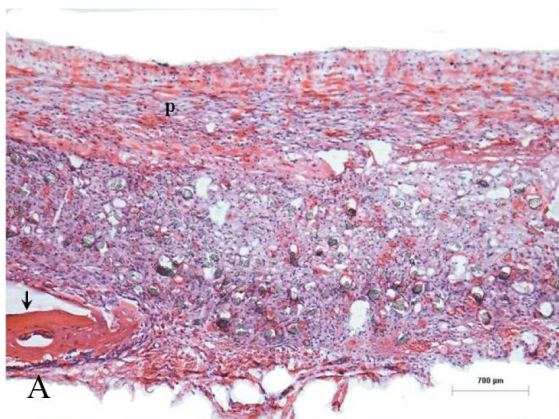
A dolomita foi identificada à microscopia de luz como grânulos birrefringentes de tamanhos variados (Figura 5A). Pelo estudo histopatológico observou-se, aos 7 dias, o reparo invadido por fibroblastos, neutrófilos e macrófagos isolados ou como células gigantes. Muitas células, algumas identificadas como neutrófilos, apresentaram, seus contornos irregulares, encolhimento e núcleos picnóticos (Figura 5B). Grande quantidade de corpos apoptóticos foram observados (Figura 5C). Vasos sanguíneos foram identificados apenas na periferia do

reparo, enquanto o centro, embora invadido por células, apresentou-se avascular. Aos 15 dias o reparo apresentou os mesmos tipos celulares observados no 7º dia, com predomínio de macrófagos; porém nesta fase, as células com distorções morfológicas se concentraram no centro do reparo, enquanto a periferia apresentou-se nitidamente mais celularizada e vascularizada. A maior parte dos grânulos encontrou-se envolvida por células gigantes multinucleadas. Em alguns casos houve deposição de fibras colágenas ao redor de grupos de grânulos de dolomita fagocitados (Figura 5D). Observou-se neste período uma tendência do organismo do animal em isolar o material enxertado, com o desenvolvimento de um tecido conjuntivo frouxo entre o coto ósseo em crescimento e o enxerto (Figura 5E).

Aos 30 dias o reparo, com macrófagos, fibroblastos e poucos neutrófilos, apresentou-se mais deslocado centripetamente pelo osso em crescimento cujo perióstio possuía muitos grânulos dolomíticos inseridos entre as fibras colágenas (Figura 5F). Nesta fase, praticamente todos os grânulos apresentaram-se fagocitados por macrófagos organizados como células epitelióides (Figura 5G).

Ao longo do tempo de observação, notou-se um aumento gradual, mais evidente a partir do 15º dia, na deposição de fibras colágenas na matriz celularizada entre os grânulos de dolomita. Aos 30 dias as fibras se caracterizaram por uma disposição mais irregular (Figura 5G), porém, aos 60 dias apareceram como faixas de tecido conjuntivo fibroso, dispostas paralelamente uma em relação às outras e ao osso neoformado (Figura 5H).

A osteogênese foi observada a partir do 7º dia, e sempre a partir dos cotos ósseos que emergiram das margens da cavidade criada (Figura 5H). Não foi observado encapsulamento dos grânulos pelo osso neoformado.





**Figura 5.** Defeito na calvária de ratos preenchido com dolomita por 7 dias (A- Coloração H.E.; aumento original: 4x; B- Coloração H.E.; aumento original: 100x; e C- Coloração H.E.; aumento original: 100x), 15 dias (D- Coloração H.E.; aumento original: 40x; e E- Coloração H.E.; aumento original: 4x), 30 dias (F- Coloração H.E.; aumento original: 20x; e G- Coloração H.E.; aumento original: 40x) e 60 dias (H- Coloração H.E.; aumento original: 20x). Aos 7 dias o reparo é constituído por grânulos de dolomita envolvidos por fibroblastos, neutrófilos e macrófagos. Neste período foram observados (setas) núcleos picnóticos (B- Coloração H.E.; aumento original: 100x) e corpos apoptóticos (C- Coloração H.E.; aumento original: 100x). No período do 15º dia, os grânulos dolomíticos (\*) aparecem, no reparo, envolvidos por macrófagos organizados como células epitelíoides (D- Coloração H.E.; aumento original: 40x; e G- Coloração H.E.; aumento original: 40x). Neste período (D- Coloração H.E.; aumento original: 40x) observou-se deposição irregular de fibras colágenas (seta) e um tecido conjuntivo frouxo entre o coto e o reparo (E- Coloração H.E.; aumento original: 4x). No período de 30 dias (F- Coloração H.E.; aumento original: 20x) os grânulos (\*) são encontrados no reparo e entre as fibras colágenas do perióstio (p) que recobre o osso neo-formado, circundados por células epitelíoides (G- Coloração H.E.; aumento original: 40x). No período de 60 dias os grânulos aparecem mais dispersos, envoltos por macrófagos e entremeados por fibroblastos e fibras colágenas organizadas em feixes (seta). Nesse grupo a osteogênese (o) foi observada a partir do coto neoformado.

### **2.2.2. Controle positivo: osso bovino inorgânico particulado liofilizado**

O osso bovino inorgânico foi identificado na microscopia de luz, como fragmentos acidófilos com tamanhos e formas variadas (Figura 6A). Ao longo do período de observação parte dos fragmentos de osso bovino inorgânico sofreu reabsorção e/ou foi encapsulado por tecido conjuntivo fibroso e uma menor parte foi incorporada pelo tecido ósseo que cresceu a partir das margens do defeito.

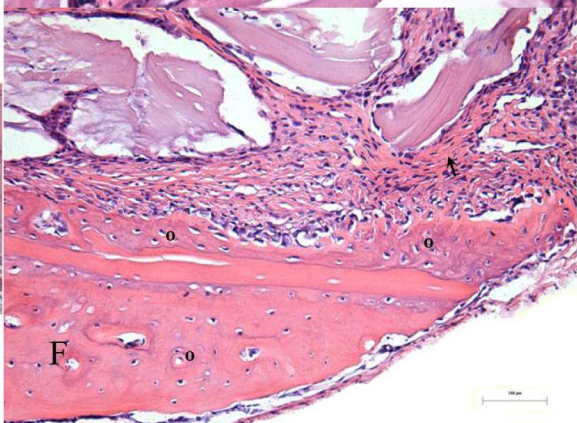
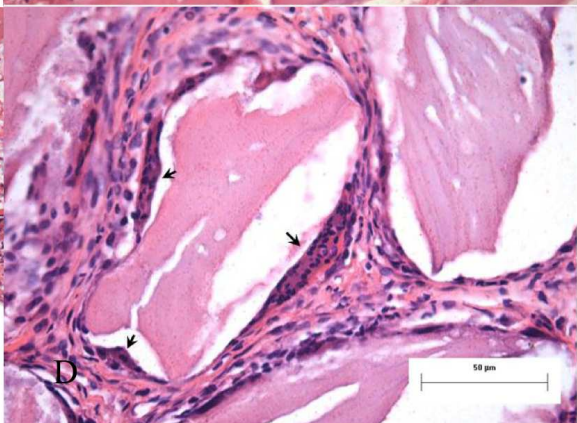
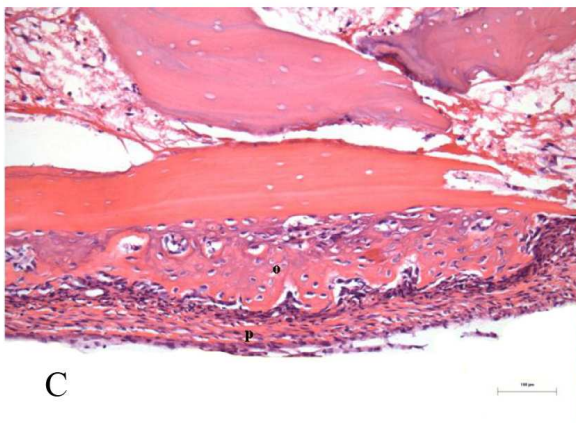
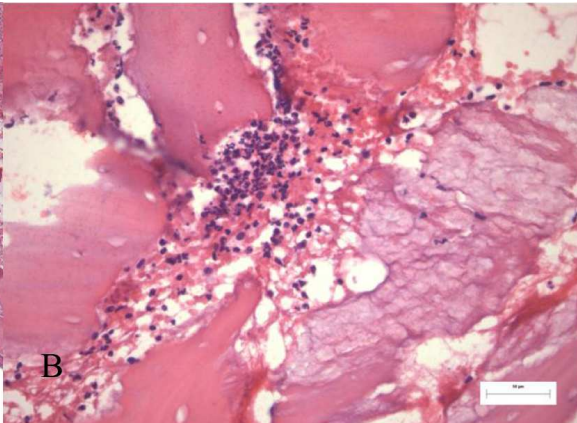
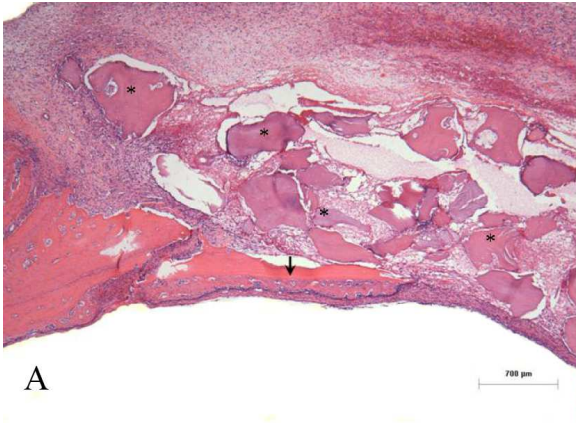
No 7º dia após a colocação do biomaterial, as partículas de osso bovino apresentaram-se envolvidas por um tecido conjuntivo bem vascularizado e celularizado (Figura 6A), com fibroblastos, macrófagos e muitos neutrófilos (Figura 6B). Nesse período, observou-se o coto ósseo desenvolvido a partir das margens do defeito com intensa osteogênese (Figura 6C).

Aos 15 dias a resposta celular e vascular se intensificou. Foram observados os mesmos tipos celulares descritos no 7º dia. Os fragmentos de osso bovino foram isolados do restante da matriz, rica em vasos e fibroblastos, por células gigantes multinucleadas (Figura 6D). Também foram observados poucos neutrófilos e macrófagos isolados.

Entre os grânulos envoltos por células fagocíticas o aumento na deposição de colágeno constituiu um tecido conjuntivo fibroso disposto regularmente ao redor dos fragmentos, caracterizando uma tendência inicial de encapsulamento e melhor organização do reparo nesta fase (Figuras 6E, 6F).

Após 30 dias, exceto por poucos neutrófilos e pelas células gigantes com núcleos pequenos, alongados e intensamente basofílicos aos redor dos fragmentos, não havia evidências de uma resposta inflamatória. Muitos fragmentos apareceram em processo de reabsorção (Figuras 6G)

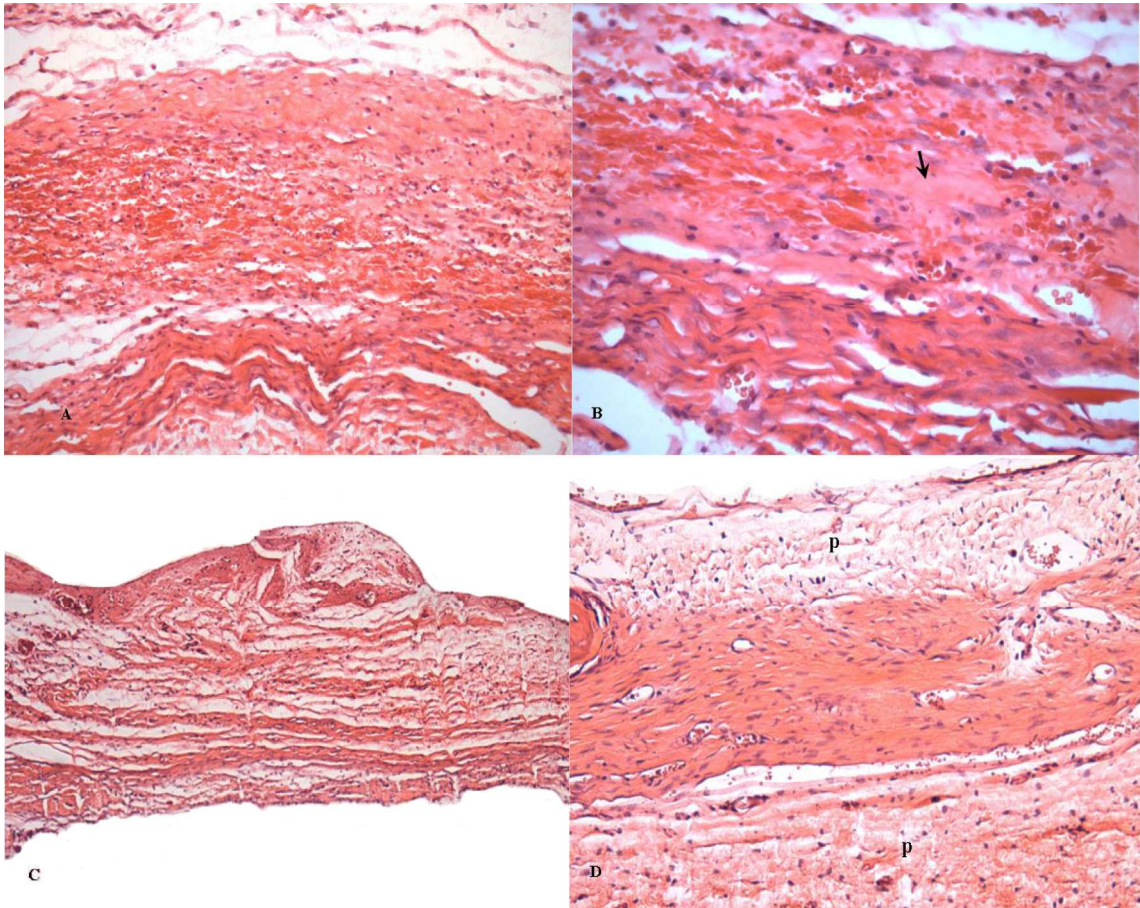
Aos 60 dias observou-se uma intensificação no encapsulamento por tecido conjuntivo fibroso. A atividade osteocondutora do osso bovino foi detectada pela identificação de fragmentos incorporados à matriz óssea neoformada (Figura 6H).



**Figura 6.** Defeito na calvária de ratos preenchido com osso bovino inorgânico por 7 dias (A- Coloração H.E.; aumento original: 4x; B- Coloração H.E.; aumento original: 40x; e C- Coloração H.E.; aumento original: 20x), 15 dias (D- Coloração H.E.; aumento original: 40x; E- Coloração H.E.; aumento original: 4x; e F- Coloração H.E.; aumento original: 20x), 30 dias (G- Coloração H.E.; aumento original: 10x) e 60 dias (H- Coloração H.E.; aumento original: 10x). (A- Coloração H.E.; aumento original: 4x) Fragmentos de osso bovino (\*) envolvidos por infiltrado inflamatório rico em neutrófilos (detalhe em B- Coloração H.E.; aumento original: 40x). Na seta em A (Coloração H.E.; aumento original: 4x) e C (Coloração H.E.; aumento original: 20x) observa-se o coto ósseo em crescimento, a partir de uma das margens do defeito. Pode-se notar a ocorrência de osteogênese (o) na parte inferior do coto. Aos 15 dias os fragmentos de osso aparecem circundados por células gigantes de corpo estranho (setas) e por um tecido conjuntivo rico em fibroblastos e fibras colágenas (D- Coloração H.E.; aumento original: 40x; E- Coloração H.E.; aumento original: 4x; e F- Coloração H.E.; aumento original: 20x). Aos 30 dias (G- Coloração H.E.; aumento original: 10x) observa-se diversos fragmentos em processo de reabsorção (\*) e a fibrose é mais evidente. Aos 60 dias (H- Coloração H.E.; aumento original: 10x) observa-se fragmentos incorporados (\*) pelo osso neo-formado e outros encapsulados por tecido conjuntivo fibroso (setas).

### 2.2.3. Controle negativo: coágulo

No defeito preenchido com coágulo não ocorreu processo inflamatório. Aos 15 dias o leito apresentou-se bem vascularizado (Figuras 7A e 7B) e aos 30 dias o coágulo foi substituído por um tecido conjuntivo fibroso, vascularizado (Figura 7C, bem evidente aos 60 dias (Figura 7D ).



**Figura 7.** Defeito na calvária de ratos preenchido com coágulo 15 dias (A-Coloração H.E.; aumento original: 20x; e B- Coloração H.E.; aumento original: 40x), 30 dias (C- Coloração H.E.; aumento original: 4x) e 60 dias (D- Coloração H.E.; aumento original: 20x). A partir do 15º dia (A- Coloração H.E.; aumento original: 20x; e B- Coloração H.E.; aumento original: 40x) observou-se uma deposição de colágeno (seta) no reparo, sendo mais evidente aos 30 dias (C- Coloração H.E.; aumento original: 4x) e que aparece aos 60 dias (D- Coloração H.E.; aumento original: 20x) como um tecido fibrótico envolvido pelo periósteo (p).

## DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o efeito de um enxerto constituído por um mineral à base de carbonato de cálcio e magnésio, conhecido como dolomita, após 7, 14, 30 e 60 dias no processo de reparo de cavidades ósseas criadas experimentalmente na calvária de ratos.

O modelo de defeito ósseo na calvária de ratos é, segundo alguns autores, um modelo ideal para o teste de materiais de enxertia na região crânio-maxilo-facial. Este sítio anatômico foi escolhido pela sua inacessibilidade por parte do animal e por apresentar pobre vascularização e relativa deficiência de medula óssea com relação a outros ossos. Além disso, a calvária desenvolve-se por ossificação intramembranosa, semelhante aos ossos membranosos da face (MENDONÇA, 2005; SCHMITZ & HOLLINGER, 1986; HOLLINGER & KLEINSCHMIDT, 1990). Ademais, possibilita a criação de um defeito de tamanho crítico, ou seja, um defeito de dimensões entre 5 a 8 mm (DAHLIN et al, 1991; MARDAS et al, 2002) que não permite a regeneração espontânea do tecido ósseo durante o tempo de vida do animal, a não ser que algum tipo de material osteogênico, osteoindutor ou osteocondutor seja colocado dentro ou sobre este defeito (SCHMITZ & HOLLINGER, 1986).

A dolomita como material de reparo a ser investigado foi escolhida pela sua composição química rica em carbonato de cálcio e magnésio, elementos minerais importantes na constituição da matriz óssea inorgânica, de modo que, hipoteticamente, poderia estimular uma ação osteogênica e uma vez que a suposta atividade antiinflamatória e analgésica atribuídas popularmente a este mineral poderiam desempenhar um papel coadjuvante importante no processo de reparo ósseo.

O osso bovino inorgânico foi utilizado como controle positivo em função de sua propriedade osteocondutora já descrita (SCIADINI et al., 1997; TAGA, 2004) e confirmada neste estudo. Embora o coágulo não tenha ação osteogênica, foi utilizado como controle negativo porque age como uma matriz que permite a migração de células osteoprogenitoras e osteoblastos preservados nas margens do defeito (MARKS & ODGREN, 2002; MENDONÇA, 2005).

Os resultados radiográficos deste estudo mostraram que nos períodos de observação de 7 e 15 dias, os grupos dolomita e osso bovino inorgânico se caracterizaram por uma radiopacidade, não sendo observada neo-formação óssea. No controle negativo, as imagens radiográficas mostraram cavidades radiolúcidas. Apesar disso, a análise histológica revelou o crescimento de um coto ósseo a partir das margens dos defeitos, nesses períodos, nos três grupos estudados.

Aos 30 e 60 dias foram observados radiograficamente uma reabsorção progressiva da dolomita e do osso bovino e, simultaneamente, a ocorrência de neo-formação óssea no sentido centrípeto, a partir das bordas da cavidade. No grupo coágulo a reabsorção não pôde ser observada radiograficamente. Em nenhum grupo foi observada a obliteração total do defeito no período de 60 dias.

Em estudo semelhante, Mendonça (2005) afirma não ter observado pela análise histológica a obliteração total de cavidades de tamanho crítico na calvária de ratos após 9 meses de enxerto com osso bovino orgânico e /ou inorgânico e atribuiu esse resultado à proliferação fibroblástica e fibrosamento de parte da lesão. Discute-se que o tecido conjuntivo proveniente da sutura pode interferir na avaliação da regeneração (BOSCH et al, 1998). Neste estudo a sutura da pele e do periósteo após a incisão, foi realizada abaixo da região do defeito, de modo que a sutura não interferisse no processo de reparo. Apesar disso, constatou-se nos três grupos experimentais ocorreu síntese de tecido conjuntivo fibroso que se organizou diferentemente, de acordo com o material avaliado.

No reparo com dolomita houve a formação de tecido conjuntivo fibroso, a princípio irregular, que posteriormente se organizou em faixas densas no meio do reparo, porém sem desenvolvimento de cápsulas ao redor dos grânulos. Não ficou claro o destino dos grânulos neste período analisado. Aparentemente foram reduzidos de tamanho ao longo do tempo, mas sua reabsorção não foi evidente.

Por outro lado, muitos fragmentos de osso bovino sofreram encapsulamento, por um tecido conjuntivo fibroso, e/ou reabsorção total ou parcial, enquanto uma menor parte foi incorporada pelo osso neoformado, caracterizando desta forma a atividade osteocondutora desse biomaterial (CAMELO et al, 1998; LORENZONI et al, 1998; MARGOLIN et al, 1998; McALLISTER et al, 1999; MELLONIG, 2000). O processo de fibrose também foi descrito em reparos ósseos constituídos por osso inorgânico de origem bovina (Bio-Oss®) na calvária de ratos (MENDONÇA, 2005), em alvéolos dentários de cães (INDOVINA & BLOCK, 2002) e em defeitos produzidos na tíbia de coelhos (JENSEN et al, 1996)

A dolomita não apresentou atividade osteocondutora. Em nenhum período foi observado grânulos de dolomita incorporados à matriz óssea neoformada. No entanto, percebeu-se uma tentativa do organismo dos animais de isolar a dolomita, formando um tecido conjuntivo entre o coto e o reparo.

Aos 30 dias após a colocação do osso bovino observou-se em algumas secções histológicas a deposição de matriz óssea primária, na interface entre o coto ósseo e o fragmento encapsulado. Contudo, apesar dessa observação acredita-se que esse efeito seja

atribuído ao coto e não ao osso bovino inorgânico que é desprovido de elementos capazes de induzir osteogênese.

No grupo controle negativo, o coágulo foi completamente substituído por um tecido conjuntivo fibroso.

A dolomita e o osso bovino, que já é amplamente utilizado como biomaterial em enxertos ósseos, não foram totalmente inócuos. Ambos induziram uma resposta inflamatória aguda por polimorfonucleares, embora no grupo dolomita tenha sido menos intensa. É possível que a elevada alcalinidade do meio, proporcionada por este mineral não tenha favorecido a angiogênese e uma migração mais intensa de neutrófilos para as partes centrais do reparo. A presença de células com alterações morfológicas típicas de dano e morte celular reforça esta hipótese.

Os macrófagos foram as células de defesa mais envolvidas na resposta inflamatória, sendo aparentemente mais numerosos e mais persistentes no reparo do grupo dolomita. Nesse grupo, os macrófagos adquiriram um padrão semelhante à célula epitelial, sendo denominados epitelióides. Em contraposição, os macrófagos encontrados ao redor dos fragmentos de osso bovino apresentavam uma morfologia de células gigantes de corpo estranho com núcleos dispostos aleatoriamente no citoplasma.

Mediante análise da área de osso neoformado constatou-se que os defeitos preenchidos com osso bovino inorgânico apresentaram aumento significativo na formação óssea, em comparação com a dolomita e com o coágulo, de modo que o percentual de redução da cavidade foi maior no grupo osso bovino seguido do grupo dolomita e do grupo coágulo, aos 30 (40,76%, 28,64% e 21,71% respectivamente) e aos 60 (55,38%, 39,8% e 29,94% respectivamente) dias. Esses percentuais demonstraram que a dolomita apresentou aos 60 dias um bom índice de formação óssea ( $p=0,05$ ) quando comparado com o coágulo. Da mesma forma que o osso bovino, a dolomita provavelmente promove um estímulo mecânico para a neoformação óssea, com a desvantagem, em relação ao osso bovino, de não ter ação osteocondutora. Uma outra possibilidade é que adicionalmente ao estímulo mecânico, a resposta inflamatória mononuclear crônica induzida no grupo dolomita poderia contribuir com a produção de fatores de crescimento como PDGF (*platelet derivated growth factor*), FGF (*fibroblast growth factor*) e TGF $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ), que têm ação no reparo ósseo (MILLIS, 1999).

Neste trabalho foi observado que a dolomita não apresentou atividade osteocondutora, apresentando na fase aguda do reparo ósseo uma reação inflamatória menos intensa, envolvendo um processo de morte celular programada. Apesar disso, a análise radiográfica



mostrou que o emprego da dolomita, nos períodos estudados, foi favorável ao processo de reparo, quando comparado com o grupo coágulo. Entretanto, para esclarecer de forma mais evidente o destino dos grânulos de dolomita, bem como a evolução da resposta inflamatória serão necessários estudos com períodos mais longos de observação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELL, R. Regeneration of periodontium: An experimental study in dogs. *Scan J Plast Surg*, v.8 (suppl 11), p. 9-17, 1974.

BECKER, W. et al. Histologic findings after implantation and evaluation of different grafting materials and titanium micro screws into extraction sockets: case reports. *J Periodontol*, v.69, p.414-21, 1998.

BOECK, E. M. Implante de hidroxiapatita em alvéolos dentais. Estudo histopatológico em ratos. Araraquara, 1997. 105p. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria)- Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.

BOSCH, C.; MELSEN, B.; VARGERVIK, K. Importance of the critical size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J Craniofac Surg*, v.9, n.4, p.310-6, 1998.

CAMARINI, E. T. Expansão vestibulo-lingual no corpo da mandíbula com e sem utilização de hidroxiapatita natural ou vidro bioativo. Avaliação clínica e microscópica em cães. Araçatuba, 2001. 159p. Dissertação (Doutorado em Odontologia, área de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.

CAMELO, M. et al. Clinical, radiographic, and histologic evaluation of human periodontal defects treated with Bio-Oss<sup>®</sup> and Bio-Gide<sup>®</sup>. *Int J Periodontics Restorative Dent*, v.18, p.321-31, 1998.

CARNEIRO, E. Análise microscópica descritiva do efeito do tamanho das partículas de matriz de osso medular bovino desmineralizado na reparação de defeito ósseo em fêmures de coelhos. Bauru, 2003. 72p. Dissertação (Mestrado em Odontologia, área de Endodontia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.

COBB, C. M. et al. Restoration of mandibular continuity defects using combinations of hydroxylapatite and autogenous bone: microscopic observations. *J Oral Maxillofac Surg*, v.48, p.268-75, 1990.

DAHLIN, C. et al. Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrane technique. *J Neurosurg*, v.74, n.3, p. 487-91, 1991.

FRAZILI, M.; VON OVERVEST-EEDMANS, G. R.; VERNOOY, A. M.; VISSER, W. J.; VON WASS, M. A. Follow-up investigation of reconstruction of alveolar process in the atrophic mandible. *Int J Oral Surg*, v.7, n.4, p.400-4, 1978.

FURUSAWA, T. et al. Investigation of early bone formation using resorbible bioactive glass in the rat mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v.13, p.672-6, 1998.

GRANJEIRO, J. M. et al. Hidroxiapatita para o uso clínico: caracterização físico química. *RGO*, v.40, p.130-4, 1992.

GREGHI, S. L. A.; CAMPOS Jr., A. Estudo comparativo da biocompatibilidade de materiais cerâmicos diversos em tecido conjuntivo sub-cutâneo de ratos. *Rev Fac Odontol Bauru*, v.2, p.73-81, 1994.

HOLLINGER, J.O. ; KLEINSCHMIDT, J.C. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg*, v.1, n.1, p.60-8, 1990.

INDOVINA, A. Jr & BLOCK, M. S. Comparison of 3 bone substitutes in canine extraction site. *J Oral Maxillofac Surg*, v.60, n.1, p.53-8, 2002.

JENSEN, S. S. et al. Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v.11, p.55-66, 1996.

KOEMPEL, J. A. et al. The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on the integration of porous hydroxyapatite implants with bone. *J Biomed Mater Res*, v.41, p.359-63, 1998.

KUABARA, M. R.; VASCONCELOS, L. W.; CARVALHO, P. S. P. Técnicas cirúrgicas para obtenção de enxerto ósseo autógeno. *Rev da FOL*, v.12, n.1 e 2, 2000.

LEE, M. B. Bone morphogenetic proteins: background and implications for oral reconstruction. A review. *J Clin Periodont*, v.24, n.6, p.355-65, 1997.

LINDHE, J. *Tratado de periodontia clínica e implantologia oral*. 4.ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2005.

LORENZONI, M. et al. Treatment of peri-implant defects with guided bone regeneration: a comparative clinical study with various membranes and bone grafts. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v.13, p.639-46, 1998.

MARDAS, N. et al. Bone and suture regeneration in calvarial defects by e-PTFE-membranes and demineralised bone matrix and impact on calvarial growth: and experimental study in the rat. *J Craniofac Surg*, v.13, n.3, p.453-62, 2002.

MARGOLIN, M. D. et al. Maxillary sinus augmentation in the non-human primate: a comparative radiographic and histologic study between recombinant human osteogenic protein-1 and natural bone mineral. *J Periodontol*, v.69, p.911-9, 1998.

MARKS Jr, S. C. & ODGREN, P. R. *Structure and development of the skeleton*. In: Bilezikian, J. P.; Raisz, I. G.; Rodan, G. A. Principles of bone biology. 2. ed. Academic Press: San Diego, 2002, p.3-15.

MARX, R. E. Clinical application of bone biology to mandibular and maxillary reconstruction. *Clin Plast Surg*, v.21, n.3, p.377-92, 1994.

MATSUMOTO, M. A. Análise microscópica de rebordos alveolares maxilares reconstruídos com enxertos autógenos de crista ilíaca e região mentoniana. Bauru, 1999. 143p. Dissertação (Mestrado em Odontologia, área de Patologia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.

McALLISTER, B. S. et al. Eighteen-Month radiography and histologic evaluation of sinus grafting with anorganic bovine bone in the chimpanzee. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v.14, p.361-8, 1999.

MELLONIG, J. T. Human histologic evaluation of bovine-derived bone xenograft in the treatment of periodontal osseous defects. *Int J Periodontics Restorative Dent*, v.20, n.1, p.19-29, 2000.

MENDONÇA, T. A. Caracterização físico-química e análise histológica do potencial osteocondutor de diferentes implantes xenogênicos no reparo de defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de ratos (*Rattus norvegicus*). Bauru, 2005. 110p. Dissertação (Mestrado em Odontologia, área de Endodontia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.

MILLIS, R. Bone and non-bone-derived growth factors and effects on bone healing. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, v.29, p.1221-12466, 1999.

MISCH, C. E. *Edentulous alveolar ridge augmentation and restorative grafting. Contemporary implant dentistry*. St Louis, Mosby, 1993, p.422-43.

MOWLEM, R. Bone grafting. *Br J Plast Surg*, v.16, p.293, 1963.

OKLUND, S. A.; PROLO, D. J.; GUTIERREZ, R. V.; KING, S. E. Quantitative comparisons of healing in cranial fresh autografts, frozen autografts, and processed autografts and allografts in canine skull defects. *Clin Orthop*, v. 205, p.269, 1985.

PHEMISTER, D. The fate of transplanted bone and regenerative power of its various constituents. *Surg Gynecol Obstet*, v.19, p.303, 1914.

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, p. 844-57, 1997.

SCHMITZ, J.P.; HOLLINGER, J.O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop*, v.205, p.299-308, 1986.

STARK, K.; MEIER, W. *Prevenções e cura com pedras: a mais pura energia*. 2. ed. Rio de Janeiro: Robafim, 2002.

TAGA, M. L. L. Análise histológica e radiográfica do potencial osteopromotor da membrana de cortical óssea bovina no reparo de defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de cobais (*Cavia porcellus*). Bauru, 2004. 149p. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.

VASCONCELOS, L.W. et al. *O emprego de cirurgias avançadas na viabilização de implantes*. In: VANZILLOTA, P.S.; SALGADO, L.P.S. Odontologia integrada: atualização multidisciplinar para o clínico e o especialista. Rio de Janeiro, Pedro Primeiro, 1999. Cap.1, p.23-50.

ZENÓBIO, E. G. Avaliação do comportamento biológico de 2 materiais, a base de fosfato de cálcio após a implantação em alvéolos de cães, Araraquara, 1996. 85p. Dissertação (Mestrado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia. Universidade Estadual Paulista.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)