

Histologia da associação de membranas biológicas de origem bovina implantadas no tecido subcutâneo de ratos

Microscopic evaluation of biologic membrane association from bovine origin implanted subcutaneously in rats

Ricardo Seiti Yamatogi¹ Sheila Canevese Rahal² José Mauro Granjeiro³
Rumio Taga⁴ Tânia Mary Cestari⁵ Alfredo Feio da Maia Lima⁶

RESUMO

O trabalho teve por objetivo avaliar a capacidade de barreira da membrana de cortical óssea desmineralizada liofilizada bovina, testando sua permeabilidade e integridade, em associação com a membrana de pericárdio bovino liofilizado. Em 15 ratos Wistar, machos, adultos, implantou-se no subcutâneo da região cervico-torácica dorsal a combinação de duas membranas de cortical óssea desmineralizada tendo no interior a membrana de pericárdio bovino. Os animais (cinco ratos/grupo) foram submetidos à eutanásia aos 15, 30 e 60 dias de pós-operatório. A avaliação microscópica mostrou que, aos 15 dias de pós-cirúrgico, as membranas estavam íntegras, com exceção de pequenas áreas de reabsorção da membrana de cortical óssea junto aos locais referentes aos antigos canais nutritivos. Aos 30 dias, havia apenas restos da membrana de cortical óssea e, aos 60 dias, a sua total ausência. Baseados nos resultados aqui obtidos, é possível concluir que a membrana de cortical óssea bovina é rapidamente absorvida e não confere proteção à membrana de pericárdio bovino liofilizado.

Palavras-chave: cortical óssea, pericárdio, colágeno, absorvível.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the barrier capacity of the bovine demineralized lyophilized bone cortical membrane, testing its permeability and its integrity in association with lyophilized bovine pericardium membrane. Fifteen male

adult Wistar rats were used. The combination of two bone cortical membranes with bovine pericardium membrane inside was implanted subcutaneously in the cervical-thoracic area. The animals (five rats per group) were submitted to euthanasia at 15, 30 and 60 days postoperatively. On day 15 postoperative, the microscopic evaluation showed integrity of the membranes, except the absorption of small areas of the bone cortical membrane in the sites of nutritive channels. On day 30, there was a remnant of bone cortical membrane, and on day 60 bone cortical membrane was completely absent. It was possible to conclude that bovine demineralized lyophilized bone cortical membrane is quickly absorbed and does not preserve the lyophilized bovine pericardium membrane.

Key words: bone cortical, pericardium, collagen, absorbable.

INTRODUÇÃO

Membranas biocompatíveis são muito empregadas na área de odontologia com intuito de estimular a regeneração óssea em defeitos ósseos perenes na cavidade bucal (LEKOVIC et al., 2001; TAKEISHI et al., 2001). Utiliza-se o mesmo conceito na área de traumatologia e ortopedia no tratamento de falhas ósseas segmentares (DAHLIN et al., 1994; ZELLIN & LINDE, 1997). O princípio biológico desse

¹Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PIBIC/CNPq), Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Unesp Botucatu, SP, Brasil.

²Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp Botucatu. Rubião Júnior s/n, 18618000, Botucatu, SP, Brasil. Email: sheilacr@fmvz.unesp.br. Autor para correspondência.

³Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, SP, Brasil.

⁴Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, SP, Brasil.

⁵Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, SP, Brasil.

⁶Curso de Pós-graduação (doutorado) da FMVZ, Unesp Botucatu, SP, Brasil.

tipo de tratamento é o da regeneração óssea guiada (DAHLIN et al., 1994; KELLOMÄKI et al., 2000). A aplicação de uma barreira em forma de membrana em defeitos ósseos atua através da osteopromoção, isto é, além de manter a concentração dos fatores estimulantes da osteogênese, protegeria fisicamente a área do defeito contra a invasão por tecidos moles circundantes altamente proliferantes, prevenindo a inibição celular heterotópica, e delimitaria a osteogênese no contorno ósseo desejado (ZELLIN & LINDE, 1997; LINDE et al., 1993a). As membranas podem ser absorvíveis ou não, e fatores como sua constituição, morfologia, textura da superfície, tamanho das porosidades e duração da integridade funcional podem influenciar no êxito da sua utilização para a regeneração óssea (ZELLIN & LINDE, 1997; TAKATA et al., 2001; LINDE et al., 1993).

A membrana não absorvível de politetrafluoretileno (ZELLIN & LINDE, 1996; LINDE et al., 1993) é ainda a mais usada em virtude das suas excelentes propriedades mecânicas, biocompatibilidade, facilidade de manejo e oclusividade celular. No entanto, faz-se necessária uma segunda cirurgia para removê-la, o que pode induzir a recessão gengival em casos de cirurgias periodontais (WANG & MACNEIL, 1998). Além do que, seu custo é ainda bastante elevado. Assim, no sentido de eliminar a cirurgia de reentrada, membranas absorvíveis foram desenvolvidas, como as de polilácticos, de poliglicólicos e de colágeno bovino (KELLOMÄKI et al., 2000; LEE et al., 2001). De acordo com LEE et al. (2001), o colágeno apresenta baixa antigenicidade e biocompatibilidade superior a outros polímeros naturais. Para retardar a absorção precoce das barreiras de colágeno *in vivo*, são empregados agentes de ligações cruzadas, tais como glutaraldeído, formaldeído e compostos poliepoxi, ou tratamento físico com irradiação por raios gama, irradiação por ultravioleta ou tratamento deidrotérmico.

O pericárdio é outro material biológico que há anos é usado com sucesso para diversos tipos de cirurgias, tais como enxerto dural (ANSON & MARCHAND, 1996), tratamento de hérnias (JAMES et al., 1991) e para o revestimento de implantes orbitais após a enucleação (GAYRE et al., 2001). Segundo ANSON & MARCHAND (1996), o pericárdio bovino após tratamento para remoção de restos celulares, proteínas degradáveis e lipídeos, consiste de uma malha de fibras colágenas. O material tem baixo custo, é fácil de suturar e apresenta baixa antigenicidade e toxicidade, boa força, mínima elasticidade, e ausência de irritações com outros materiais.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a capacidade de barreira da membrana de cortical óssea desmineralizada liofilizada bovina, testando sua permeabilidade e integridade em associação com a membrana de pericárdio bovino liofilizado.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 15 ratos, linhagem Wistar, machos, adultos, com peso médio entre 300 e 350 gramas, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual Paulista - Campus de Botucatu e alocados em caixa de polietileno 40x60x18, com água e ração *ad libitum*.

Após jejum de 12 horas, os ratos foram pré-medicados com sulfato de atropina (0,044mg 100g⁻¹ por via subcutânea) e anestesiados com uma mistura de cloridrato de xilazina 2% e hidrocloreidrato de quetamina 5% na proporção de 1:1 (0,2ml da mistura para cada 100g de peso, por via intramuscular). Com os animais posicionados em decúbito ventral efetuou-se tricotomia na região cervico-torácica dorsal e antiseptia da área cirúrgica com álcool iodado. Realizou-se incisão de pele na linha média dorsal da região cervico-torácica e divulsão do tecido subcutâneo para aplicação da combinação de duas membranas de cortical óssea desmineralizada liofilizada bovina (1,5 x 1,5 cm)^a, tendo no seu interior membrana biológica de pericárdio bovino liofilizado (0,5 x 0,5cm) processada no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru - USP (Figura 1). As bordas das membranas de cortical óssea bovina foram fixadas com cola de metil-2-cianoacrilato^b. Após colocação das membranas, o tecido subcutâneo foi aproximado com sutura simples contínua e a pele com pontos simples separados, ambos com fio náilon monofilamento nº 4-0. A analgesia pós-operatória foi realizada com uma aplicação de buprenorfina na dose 0,1mg/kg, por via intramuscular.

Os animais foram submetidos à eutanásia com halotano, aos 15, 30 e 60 dias de pós-operatório (5 ratos/grupo). O conjunto membranas e tecidos circundantes foi coletado por excisão retangular ampla e fixado em formalina a 10% em tampão fosfato por uma semana. Todos os materiais foram processados no Laboratório de Histologia do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru - USP com lavagem em água corrente por 24 horas, desidratação em etanol, clarificação em xilol e embebição em Histosec (parafina + resina sintética). Cortes semi-seriados de 5µm de espessura foram obtidos em um micrótomo Jung Leica e corados pela técnica da hematoxilina-eosina (LUNA, 1968).

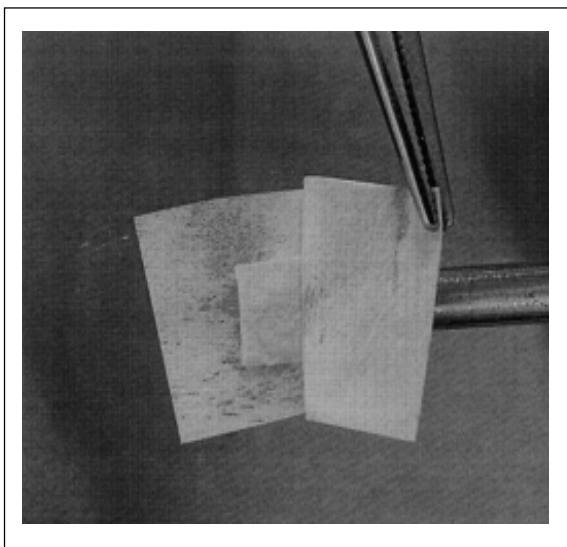


Figura 1 - Combinação de duas membranas de cortical óssea desmineralizada liofilizada bovina (1,5 x 1,5cm), tendo no seu interior membrana biológica de pericárdio bovino (0,5 x 0,5cm).

RESULTADOS

Um rato apresentou deiscência de dois pontos um dia após o procedimento cirúrgico. Como não havia exposição das membranas, a ferida foi tratada com pomada de nitrofurazona até a cicatrização, detectada sete dias após. Dois ratos apresentaram aumento de volume de consistência mole na região cérvico-torácica com dois dias de pós-operatório. Em um animal, ocorreu regressão do processo com cinco dias de pós-cirúrgico e, no outro, a lesão persistiu até o momento da eutanásia, realizada com 15 dias.

Na avaliação microscópica, aos 15 dias de pós-cirúrgico, ocorreu variação do quadro histológico. Em dois animais, a membrana de cortical óssea apresentou-se íntegra, com pequenas áreas de reabsorção por células mononucleadas nas áreas referentes aos antigos canais nutritivos (Figuras 2a e 2b). Na superfície externa, uma densa cápsula fibrosa envolvia todo o implante. A membrana interna de pericárdio bovino estava presente e envolta por restos de coágulo sanguíneo e polimorfonucleares provenientes de aberturas laterais que apareceram entre as duas membranas de cortical (Figuras 2c e 2d). Nos demais ratos, a cápsula mostrou-se mais celularizada e com inúmeras células gigantes multinucleadas e polimorfonucleares. O espaço intermembranas estava preenchido por inúmeras células inflamatórias

que ocupavam os espaços mais externos da membrana de pericárdio.

Com 30 dias de pós-operatório, apenas um animal apresentou fragmentos da membrana de cortical óssea em reabsorção por células mononucleadas, sem a presença de quadro inflamatório crônico (Figuras 3a e 3b). Nos demais ratos, as membranas estavam ausentes e, no local, persistia quadro inflamatório crônico com inúmeras células gigantes multinucleadas (células Langerhans) e, raras áreas, exibindo estágio mais avançado de reparação com a substituição por tecido característico da área (Figuras 3c e 3d). Aos 60 dias pós-cirúrgico, observou-se em todos os ratos ausência de material implantado e reorganização tecidual.

DISCUSSÃO

Na presente pesquisa, optou-se pela fixação das bordas das membranas de cortical óssea bovina com cola de metil-2-cianoacrilato com o intuito de obtenção de melhor selamento para evitar a passagem de células, já que esse tipo de membrana rompe-se facilmente durante a aplicação da sutura. Contudo, salienta-se que essa cola mostrou-se inadequada, visto que, na avaliação histológica no grupos de 15 dias de pós-operatório, observou-se, em dois ratos, a presença de abertura lateral no local de selamento entre as membranas, indicando rápida degradação do produto. Além disso, apesar da polimerização da cola ter ocorrido em ambiente externo, eliminando a toxicidade tecidual associada ao aquecimento (WOODWARD et al., 1965), a presença de células inflamatórias no espaço entre as membranas pode ser indicativo da irritação induzida pelos produtos de sua degradação (CAMERON et al., 1965; WOODWARD et al., 1965).

A membrana de cortical óssea utilizada no experimento é constituída basicamente de colágeno tipo I e traços de fatores de crescimento e, por ser absorvível, não requer posterior remoção. Isto se constitui em uma vantagem, particularmente nas áreas da implantodontia, periodontia e cirurgias odontológicas, já que membranas não absorvíveis, como as de politetrafluoretileno, necessitam de uma segunda intervenção cirúrgica para sua retirada, podendo apresentar complicações pós-operatórias, além de desconforto ao paciente (WANG & MACNEIL, 1998).

Um fato relevante é que a membrana deve permanecer estruturalmente e funcionalmente íntegra, para permitir a migração de células de origem óssea e promover a regeneração do tecido original perdido. Para

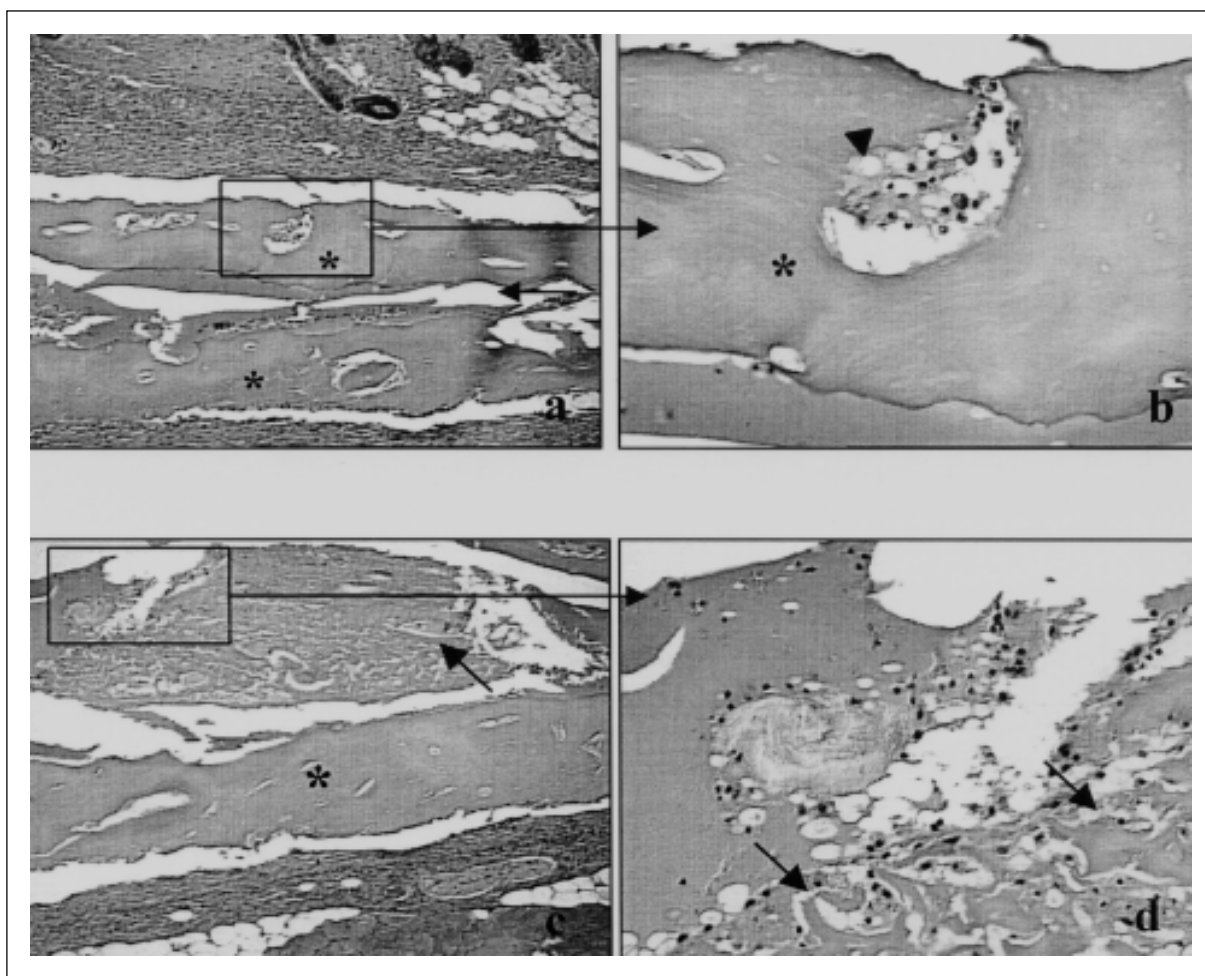


Figura 2 – Aspecto histológico aos 15 dias de pós-operatório de membranas absorvíveis implantadas no tecido subcutâneo de ratos: (a) Aspecto geral mostrando a membrana de cortical óssea (asterisco). HE, 25X; (b) detalhe da superfície da membrana de cortical óssea (asterisco) superior exibindo invasão e reabsorção por células mononucleadas nos espaços referentes aos antigos canais nutritivos (cabeças de seta). HE, 250X; (c,d) aspecto da membrana de pericárdio (seta) entre as membranas de cortical (asterisco) com espaços preenchidos por restos de coágulo sanguíneo. HE, 25X, 250X.

GREENSTEIN & CATON (1993), as primeiras quatro semanas são críticas para o processo regenerativo, e, em relação às pesquisas com membranas de colágeno, CRIGGER et al. (1996) e MOONEY et al. (1996) enfatizam que membranas com tempo de reabsorção muito rápido, isto é, menos de três semanas, devem ser evitadas. Além disso, quando utilizada como barreira, a dissolução da membrana reabsorvível deve ocorrer em tempo previsível e compatível com a regeneração óssea (AABOE et al., 1993).

Pelos resultados histológicos aqui observados, tanto a membrana externa de cortical óssea como a membrana interna de pericárdio apresentaram um tempo de absorção relativamente rápido, já que, após 30 dias, apenas um rato ainda apresentava fragmentos da membrana cortical óssea,

com completa reabsorção nos demais. De forma similar, HERCULIANI et al. (2000) ao empregarem a membrana de cortical óssea bovina, associada ou não a enxerto ósseo bovino desmineralizado, em defeitos criados na calota craniana de cobaias observaram que, com um mês pós-implantação, a membrana mostrou-se em sua maior parte reabsorvida por células mononucleares.

Como citado por LINDE et al. (1993), a composição química de uma membrana biodegradável determinará não somente a longevidade, mas também a resposta inflamatória e imune. A presença de um quadro de inflamação crônica com inúmeras células gigantes multinucleadas (células Langerhans) verificado aos 30 dias de pós-operatório, junto a fragmentos da

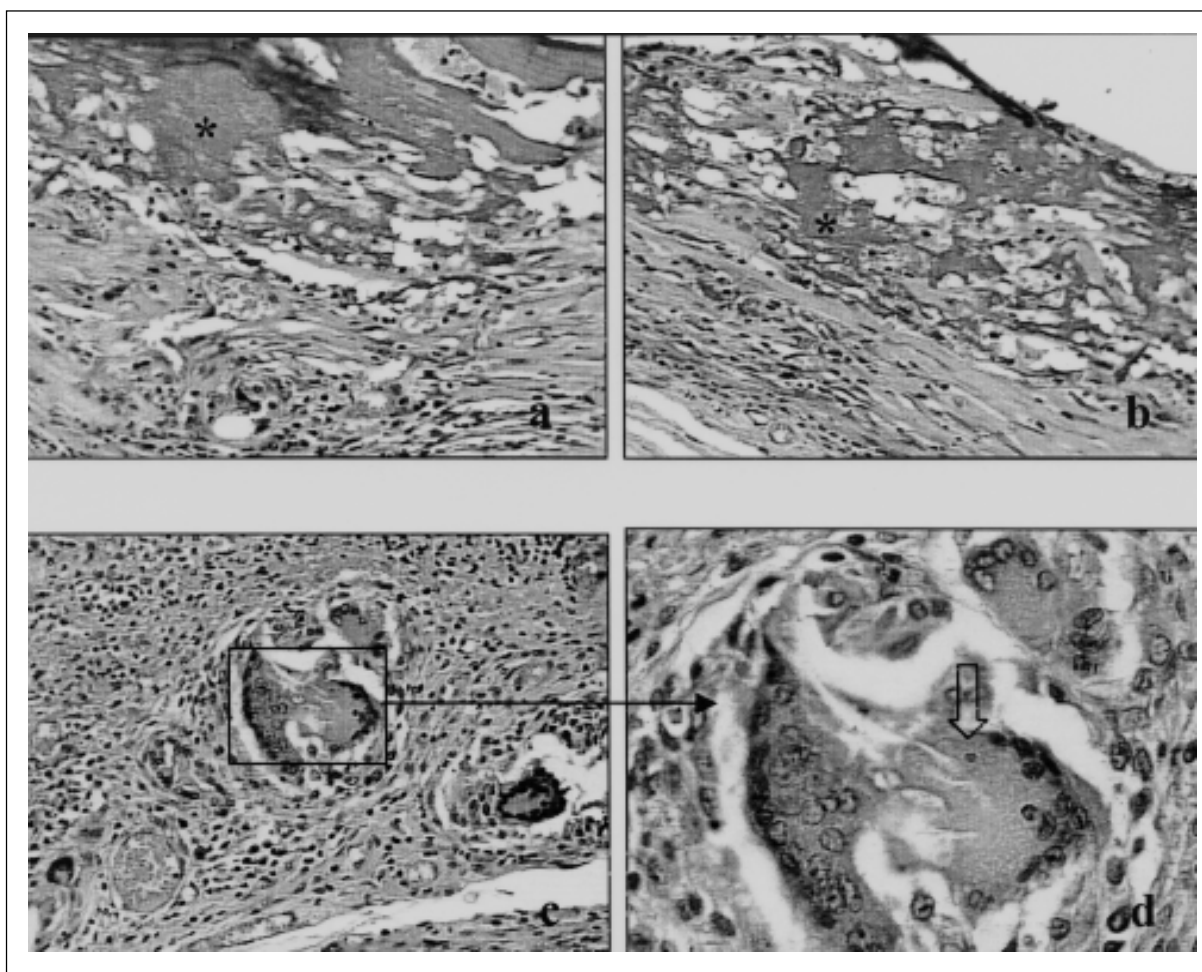


Figura 3 – Aspecto histológico aos 30 dias de pós-operatório de membranas absorvíveis implantadas no tecido subcutâneo de ratos: (a e b) restos da membrana de cortical óssea bovina (asterisco) em reabsorção por células mononucleadas. HE., 250X; (c, d) aspecto geral da maioria das amostras mostrando inflamação crônica com presença de células gigantes multinucleadas – células de Langerhans (setas). HE, 250X, 400X.

membrana de cortical óssea, pode ser indicativo da não total desmineralização da matriz óssea bovina durante a produção da membrana. Isso pode ter induzido a reação tipo corpo estranho, que favoreceu a rápida reabsorção da membrana.

Outro fator que pode influenciar a regeneração óssea é o grau de permeabilidade da membrana, especialmente quando se utiliza biomateriais osteoindutores no preenchimento de um defeito ósseo, porque ele auxiliará na determinação do tempo de performance do material no tecido e taxa inicial de formação óssea (ZELLIN & LINDE, 1997; LEKOVIC, 2001; TAKEISHI et al., 2001). Com 15 dias de pós-operatório, observou-se que havia pequenas áreas de absorção da membrana nos locais referentes aos antigos canais nutritivos, sugerindo que esses locais podem apresentar grande influência na

permeabilidade da membrana. Por ser originária da matriz orgânica de osso cortical bovino, a localização e número desses canais em cada membrana provavelmente apresentam variações, o que poderia representar uma desvantagem do material, porque haveria uma variação no tempo de absorção da membrana de acordo com o lote.

Com relação à reabsorção da membrana de pericárdio, vale considerar que houve rápida exposição ao ambiente celular, já que a membrana de cortical óssea não promoveu suficiente proteção. Entretanto, por se tratar de membrana não tratada por agentes de ligação cruzada ou tratamento físico, que aumentam a sua durabilidade e resistência (JAMES et al., 1991; ANSON & MARCHAND, 1996; BRUNEL et al., 1996; LEE et al., 2001), o seu tempo de reabsorção, em geral, é mais rápido.

CONCLUSÃO

Foi possível concluir que a membrana de cortical óssea desmineralizada liofilizada bovina é rapidamente absorvida e não confere proteção a membrana de pericárdio bovino liofilizado.

FONTES DE AQUISIÇÃO

^aGen-derm – Baumer – Av. Prof. Antonio Tavares Leite, 181 – Mogi Mirim, SP.

^bSuper Bond – Henkel Loctite Adesivos Ltda. - Av. Prof. Vernon Keieble, 91- Itapevi - SP.

AGRADECIMENTOS

À Baumer pelo fornecimento das membranas.

A comissão de ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp Botucatu aprovou o desenvolvimento desse trabalho.

REFERÊNCIAS

- AABOE et al. Guided tissue regeneration using degradable and nondegradable membranes in rabbits. **Clin Oral Implant Res**, n.4, p.172-176, 1993.
- ANSON, J.A.; MARCHAND, E.P. Bovine pericardium for dural grafts: clinical results in 35 patients. **Neurosurgery**, v.39, n.4, p.764-768, 1996.
- BRUNEL, G. et al. Regeneration of rat calvarial defects using a bioabsorbable membrane technique: influence of collagen cross-linking. **J Periodontol**, v.67, n.12, p.1342-1348, 1996.
- CAMERON, J.L. et al. The degradation of cyanoacrylate tissue adhesive. **Surg**, v.58, n.2, p.424-430, 1965.
- CRIGGER, M. et al. Repair following treatment of circumferential periodontal defects in dogs with collagen and expanded polytetrafluoroethylene barrier membranes. **J Periodontol**, v.67, n.4, p.403-413, 1996.
- DAHLIN, C. et al. A. Restoration of mandibular nonunion bone defects. An experimental study in rats using an osteopromotive membrane method. **Int J Periodontics & Restorative Dent**, v.23, n.4, p.237-42, 1994.
- GAYRE, G.S. et al. Bovine pericardium as a wrapping for orbital implants. **Ophthalmic Plast Reconstr Surg**, v.17, n.5, p.381-387, 2001.
- GREENSTEIN, G.; CATON, J.G. Biodegradable barriers and guided tissue regeneration. **Periodontology** 2000, n.1, p.36-45, 1993.
- HERCULIANI et al. Treatment of the guinea pig critical size cranial defect using membrane of lyophilized bovine cortical bone associated or not to a demineralized bovine bone graft. **Rev Bras Implantologia**, v.1, p.7-14, 2000.
- JAMES, N.L. et al. Comparative evaluation of treated bovine pericardium as a xenograft for hernia repair. **Biomaterials**, v.12, n.9, p.801-809, 1991.
- KELLOMÄKI, M. et al. Bioabsorbable scaffolds for guided bone regeneration and generation. **Biomaterials**, v.21, p.2495-2505, 2000.
- LEE, C.H. et al. Biomedical applications of collagen. **Int J Pharm**, v.221, p.1-22, 2001.
- LEKOVIC, V. et al. Combination use of bovine porous bone mineral, enamel matrix proteins, and a bioabsorbable membrane in intrabony periodontal defects in humans. **J Periodontol**, v.72, n.5, p.583-589, 2001.
- LINDE, A. et al. Osteopromotion: a soft-tissue exclusion principle using a membrane for bone healing and bone neogenesis. **J Periodontol**, v.64, n.11, 1116-128, 1993.
- LUNA, L.G. **Manual of histological staining methods of the armed force institute of pathology**. 3.ed. New York: Mc Graw-Hill, 1968. 258p.
- MOONEY et al. The effects of guided tissue regeneration and fixation technique on osseous wound healing in rabbit zygomatic arch osteotomies. **J Craniofacial Surg**, v.7, n.1, p.46-53, 1996.
- TAKATA, T. et al. Migration of osteoblastic cells on various guided bone regeneration membranes. **Clin Oral Implant Res**, v.12, n.4, p.332-338, 2001.
- TAKEISHI et al. Molded bone augmentation by a combination of barrier membrane and recombinant human bone morphogenetic protein-2. **Oral Dis**, v.7, p.281-286, 2001.
- WANG, H.L.; MACNEIL, R.L. Guided tissue regeneration. Absorbable barriers. **Dent Clin North Am**, v.42, n.3, p.505-22, 1998.
- WOODWARD, S.C. et al. Histotoxicity of cyanoacrylate tissue adhesive in the rat. **Annals Surg**, v.162, p.113-122, 1965.
- ZELLIN, G.; LINDE, A. Effects of different osteopromotive membrane porosities on experimental bone neogenesis in rats. **Biomaterials**, v.17, n.7, p.695-702, 1996.
- ZELLIN, G.; LINDE, A. Treatment of segmental defects in long bones using osteopromotive membranes and recombinant human bone morphogenetic protein-2. **Scand J Plast Reconstr Hand Surg**, v.31, p.97-104, 1997.