

Análise histomorfométrica de tecido ósseo mantido em solução fisiológica

Histomorphometric analysis of bone graft storage in phyjological solution

Camilla Christian Gomes MOURA

Walter BETONI-JUNIOR

Mestrandos – Programa –q Pós-Graduação emq Odontologia – Faculdade de Odontologia – Universidade Federal de Uberlândia – UFU

Paula DECHICHI

Professora Doutora – Disciplina de Histologia e Embriologia – Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade Federal de Uberlândia – UFU

RESUMO

O sucesso dos enxertos ósseos autógenos está relacionado à viabilidade das células transportadas para a área receptora. Durante o procedimento cirúrgico, entre a retirada do bloco ósseo da área doadora e sua colocação na área receptora, é comum que o fragmento fique algum tempo em solução fisiológica. O objetivo desse estudo foi realizar avaliação histomorfométrica da preservação de osteócitos em fragmentos de tibia, mantidos em solução salina por diferentes períodos. Vinte e quatro fragmentos ósseos foram removidos e divididos em quatro grupos iguais. O grupo controle foi fixado em formol 10%, imediatamente após a remoção. Os demais grupos foram mantidos em solução salina por 5, 15 ou 30 minutos, antes da fixação. Em seguida, os espécimes foram descalcificados em EDTA e processados para inclusão em glicol metacrilato. Os cortes com cerca de 3µm de espessura foram corados em azul de toluidina 1%. A análise histológica foi realizada segundo critério que considerou os osteócitos como normais, alterados e lacunas (vazias). Segundo análise estatística (teste de Tuckey) houve redução significativa na quantidade de osteócitos normais em todos os períodos experimentais. O número de lacunas e osteócitos alterados aumentou significativamente em todos os períodos experimentais, exceto em 5 minutos. Segundo os resultados, ocorre redução progressiva da quantidade de osteócitos em fragmentos ósseos de tibia de coelhos mantidos em solução salina.

UNITERMOS

Regeneração óssea; transplante ósseo; análise, histomorfométrica; osteócitos

INTRODUÇÃO

A reabilitação de pacientes parcialmente ou totalmente desdentados é complicada devido à perda óssea decorrente de fatores fisiológicos ou traumáticos. O desenvolvimento de técnicas de engenharia tecidual, utilizando enxertos, tem favorecido a reabilitação desses indivíduos^{4,19}. Os enxertos ósseos autógenos são o de melhor previsibilidade e atualmente mais utilizados^{2,4,9} sendo possível obtê-los de áreas doadoras intra ou extra orais. Os sítios doadores extra orais mais comumente utilizados são a calvária¹⁸, tibia^{5,8}, costela¹⁸ e crista ilíaca^{14,18}.

Durante a intervenção cirúrgica, entre a retirada do bloco ósseo da área doadora e sua colocação na área receptora, é comum que os fragmentos ósseos permaneçam armazenados em soro fisiológico, enquanto o leito receptor é preparado. O tempo em que os fragmentos ósseos ficam em solução fisiológica é variável, não estando estabelecido por quanto tempo as células ósseas permanecem viáveis, possibilitando que o enxerto exerça as funções de osteocondução e osteoindução². O objetivo desse estudo foi realizar avaliação histomorfométrica de fragmentos ósseos de tibia de coelho, mantidos em solução salina por 5, 15 e 30 minutos.

MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo foram utilizados seis coelhos albinos machos, adultos jovens, da raça Nova Zelândia. Os animais foram anestesiados por via intramuscular, administrando a associação Quetamina (10mg/kg de peso), Xilazina 2% (4mg/kg de peso), Acepromazina 0,2% (0,15mg/kg de peso)¹¹ e Midazolam (0,2mg/kg)¹³, seguindo as determinações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal-COBEA. Foi realizada tricotomia na superfície anterior da tíbia e a pele e tecidos subcutâneos foram incisados. O periósteo que recobre a região anterior da tíbia foi incisado, elevado e rebatido lateralmente. Os blocos ósseos foram obtidos da região usando uma broca trefina com 5mm de diâmetro, montada em peça reta, sob baixa rotação. As osteotomias foram realizadas sob irrigação constante com soro fisiológico, evitando o superaquecimento. Dois fragmentos foram removidos de cada tíbia (4 fragmentos de cada coelho). Os 24 fragmentos foram divididos em 4 grupos iguais: controle, 5, 15 e 30 minutos. O grupo controle foi fixado em formol 10%, imediatamente após a remoção. Os demais grupos foram mantidos em solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9% (solução salina) por 5, 15 e 30 minutos, antes da fixação. Em seguida, os fragmentos foram descalcificados em EDTA 10% por 45 dias e processados para inclusão em glicol metacrilato (Leica-Historesin). Os cortes com cerca de 3 micrômetros de espessura foram corados em azul de toluidina 1% e analisados ao microscópio de luz. A análise histomorfométrica foi realizada segundo critério que considerou os osteócitos como normais, alterados e lacunas vazias. Os

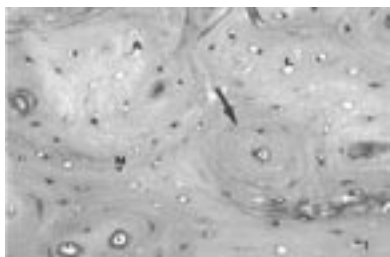


FIGURA 1 – Fotomicrografia de tecido ósseo mantido em solução fisiológica (NaCl, 0,9%) por 30 minutos, evidenciando osteon completo (seta), osteócitos normais (N), osteócitos alterados (A) e lacunas (L). Corado em azul de toluidina 1%. Aumento original 40X.

osteócitos foram classificados como normais quando ocupavam 50% ou mais do interior de sua lacuna, alterados quando ocupavam menos de 50% do interior de sua lacuna, e lacunas vazias (sem osteócitos). Seguindo esse critério foi realizada uma contagem diferencial dos osteócitos nos campos microscópios, tendo sido analisado apenas o centro das corticais ósseas. Utilizando objetiva de 40X foram contados vinte campos microscópios por período analisado, em um estudo cego. Os valores médios por período para cada parâmetro foram obtidos e tratados estatisticamente. Os dados obtidos foram submetidos a teste de normalidade, onde comprovada a distribuição normal, foram submetidos a teste estatístico paramétrico. Primeiramente foi realizada Análise de Variância, que permitiu comprovar a existência de diferença entre os grupos e foi aplicado o teste de Tuckey para analisar os dados separadamente. A média e o desvio padrão para cada parâmetro (osteócito normal, alterado e lacuna vazia) foram calculados para os quatro grupos (controle, 5, 15 e 30 minutos). As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes se $p < 0,05$.

RESULTADOS

O tecido ósseo apresentou aspecto histológico normal em todos os grupos experimentais (Figura 1).

Ao longo dos períodos experimentais, os osteócitos apresentaram-se progressivamente alterados. Os osteócitos classificados como alterados no grupo 30 minutos (Figuras 1 e 2D) estavam mais contraídos em suas lacunas se comparados aos alterados dos outros grupos (Figura 2).

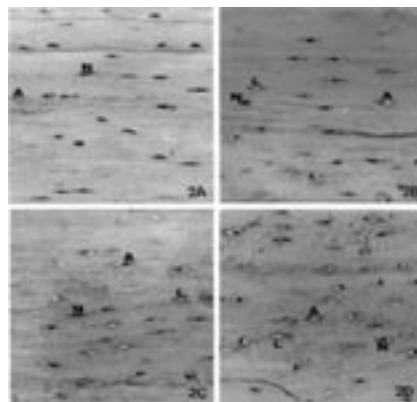


FIGURA 2 – Fotomicrografia de tecido ósseo mantido em solução fisiológica (NaCl, 0,9%), evidenciando osteócitos normais (N), osteócitos alterados (A) e lacunas (L). 2A – grupo controle, 2B – grupo 5 minutos, 2C – grupo 15 minutos, 2D – grupo 30 minutos. Corado em azul de toluidina 1%. Aumento original 40X.

Segundo análise estatística houve redução significativa do número de osteócitos normais nos períodos experimentais 5, 15 e 30 minutos, quando comparados ao grupo controle. A quantidade de osteócitos alterados aumentou progressivamente em todos os tempos experimentais, sendo significativa a diferença entre os grupos 15 e 30 minutos, quando cada um

deles foi comparado ao grupo controle. O mesmo foi observado quando o teste estatístico foi aplicado a lacunas vazias. A quantidade de osteócitos alterados e lacunas vazias entre os grupos 15 e 30 minutos, e entre o grupo controle e 5 minutos não foi estatisticamente significativa. Estes resultados estão apresentados na Tabela 1 e no Figura 1.

Tabela 1 – Valores médios da contagem dos elementos no tecido ósseo em diferentes períodos experimentais. Resultados expressos em média (μ) e desvio padrão (SD)*.

Minutos	Osteócitos normais		Osteócitos alterados		Lacunas	
	μ	SD	μ	SD	μ	SD
0	30,80	± 4,64 ^a	8,65	± 2,34 ^e	9,90	± 2,04 ⁱ
5	25,08	± 6,99 ^b	9,25	± 2,31 ^f	10,70	± 3,21 ^j
15	20,50	± 4,89 ^c	15,70	± 3,59 ^g	14,55	± 3,84 ^k
30	16,20	± 2,74 ^d	17,15	± 2,51 ^h	17,00	± 3,90 ^l

* Diferenças estatisticamente significativas foram obtidas com as seguintes comparações: ^aversus^b (p< 0,01); ^aversus^c (p< 0,01); ^aversus^d (p< 0,01); ^bversus^c (p< 0,05); ^cversus^d (p< 0,01); ^eversus^f (p< 0,01); ^eversus^g (p< 0,01); ^eversus^h (p< 0,01); ^fversus^g (p< 0,01); ^fversus^h (p< 0,01); ^gversus^h (p< 0,01); ⁱversus^j (p< 0,01); ⁱversus^k (p< 0,01); ^jversus^k (p< 0,01); ^jversus^l (p< 0,01).

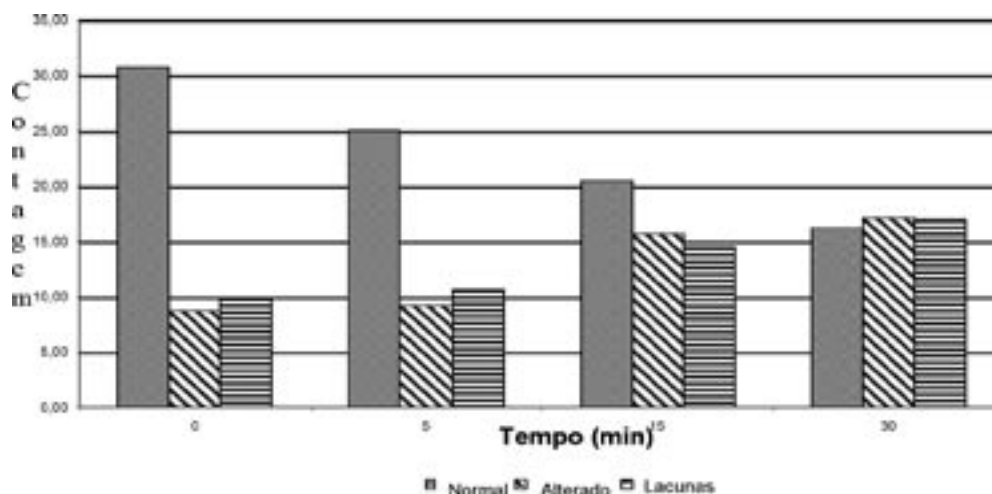


FIGURA 3 – Média da contagem de osteócitos normais, osteócitos alterados e lacunas vazias nos diferentes tempos experimentais.

DISCUSSÃO

Neste estudo, o coelho foi escolhido como modelo experimental devido às semelhanças fisiológicas e metabólicas entre o tecido ósseo desse animal e o de humanos⁶.

Durante a preparação histológica, o tecido ósseo sofre alterações relacionadas à técnica de processamento. A fixação do material em formol causa um espaço perilacunar, resultante da contração do osteócito. Segundo Marotti et al.¹² (1998), a fixação do tecido ósseo não interfere substancialmente na preservação dos osteócitos. O processo de desmineralização também causa retração das células ósseas. Este fenômeno pode ser minimizado pelo uso de descalcificadores menos agressivos. Nesse estudo foi utilizado EDTA, um quelante de íons cálcio que promove descalcificação lenta e o material foi incluído em glicol metacrilato com objetivo de reduzir artefatos⁷. Apesar de todos os possíveis artefatos técnicos é importante considerar que o grupo controle foi submetido às mesmas condições que os grupos experimentais, sendo este estudo comparativo. Os cortes histológicos obtidos foram perpendiculares ao longo eixo da tíbia, selecionando para contagem regiões de lamelas paralelas e osteons completos, evitando área intersticial e lacunas em corte superficial. A contagem celular foi feita na região central da cortical óssea excluindo a periferia, que geralmente apresentava tecido alterado, produzido pela utilização da trefina durante a remoção dos fragmentos ósseos.

Em enxertos ósseos autógenos, quanto maior o número de células sobreviventes mais rápido ocorrerá a cicatrização e revascularização óssea^{1,10,16-7}. O tecido ósseo deve permanecer o menor tempo possível em condições completamente isquêmicas, como por exemplo em solução fisiológica, pois a possibilidade dos osteócitos sobreviverem nessas condições é limitada.

Nesse estudo ocorreu uma redução significativa de osteócitos normais em todos os períodos experimentais, e um aumento de osteócitos morfologicamente alterados e lacunas vazias nos fragmentos ósseos que permaneceram 15 ou 30 minutos em solução salina (NaCl 0,9%). Os osteócitos classificados como alterados no tempo experimental de 30 minutos mostraram-se mais contraídos no interior de suas lacunas quando comparados aos osteócitos alterados dos outros grupos experimentais. Os dados sugerem que esses osteócitos apresentavam-se mais avançados no processo de degeneração. Mendico, et al.¹⁵ (1996), reportaram que o tempo máximo recomendado para manutenção de fragmentos ósseos em condições extra orais encontra-se entre 20 minutos e 3 horas. Entretanto, Berggren et al.³ (1982), demonstraram que osteócitos e osteoblastos podem sobreviver por até 25 horas em condições completamente isquêmicas. Os resultados apresentados por esses autores referem-se apenas à possibilidade de sobrevivência das células ósseas nessas condições, mas não à quantidade de células sobreviventes. Os resultados encontrados no presente estudo indicam que o tecido ósseo deve permanecer o menor tempo possível armazenados em solução salina enquanto aguarda seu posicionamento no leito receptor. Torna-se necessário investigar a capacidade de outras soluções terapêuticas em preservar osteócitos em enxertos ósseos autógenos, bem como estudos, combinando técnicas histológicas e histoquímicas, para avaliar a viabilidade das células ósseas remanescentes.

CONCLUSÃO

A quantidade de osteócitos, em fragmentos de tíbia de coelho, diminui ao longo do tempo quando o fragmento ósseo é mantido solução salina (NaCl 0,9%).

ABSTRACT

The success of autogenous bone grafts are related to the viability of the cells transferred to receptor site. At surgical intervention, during the transference of bone grafts from donor site to receptor site, is common that grafts stay in saline physiological solution for sometime. The aim of this study was to analyze histologically the rabbit's tibia bone grafts kept for several times in saline solution. Twenty four bone grafts were removed and separated in four groups. The control group was fixed in 10% formaldehyde. The other groups stayed in saline solution for 5, 15 and 30 minutes, and immersed in the same fixative. All groups were decalcified in 10% EDTA, and embedded in glycol methacrylate (Leica Historessin). The sections were cut at 3 µm and stained with 1% tolluidine blue. The osteocytes were analyzed. They were classified like normal, abnormal (morphologically changed) and empty lacunae (without osteocyte). According to statistical test (Tuckey's Test) there was a significant decrease between the number of normal osteocytes to all groups. The number of abnormal osteocytes and empty lacunae increased as time passed by. From this study it was possible to conclude that a number of osteocytes decreased in rabbit's tibia bone grafts maintained in saline solution as time went by.

UNITERMS

Bone regeneration; bone transplatotion; analysis, histomorphometric analysis; osteocytes

Referências

- Albrektsson T. Repair of bone grafts. A vital microscopic and histological investigation in the rabbit. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1980; 14 (1): 1-12.
- Becker W, Schenk RK, Higuchi K, Lekholm U, Becker BE. Variations in bone regeneration adjacent to implants augmented with barrier membranes alone or with demineralized freeze-dried bone for autologous grafts: a study in dogs. *Int Jq Oral Maxillofac Implants* 1995 Mar/Apr; 10 (2): 143-54.
- Berggren A, Weiland AJ, Dorfman H. The effect of prolonged ischemia time on osteocyte and osteoblast survival in composite bone grafts revascularized by microvascular anastomoses. *Plast Reconstr Surg* 1982 Feb; 69 (2): 290-8.
- Boyne PJ. Bone grafts and bone substitutes. In: Habal MB, Reddi AH (eds) *Maxillofacial surgery*. Philadelphia;q WB Saunders: 1992. p.291-8.
- Catone G, Reimer B, Mcneir D, Ray R. Tibial autogenous cancellous bone as an alternative donor site in maxillofacial surgery: a preliminary report. *J Oral Maxillofac Surg* 1992 Dec; 50 (12): 1258-63.q
- Frame JW. A convenient animal model for testing bone substitute materials. *J Oral Surg* 1980 Mar; 38 (3): 176-80.
- Gomes-Filho JE, Gomes BPPA, Zaia AA, Novaes PD, Souza-Filho FJ. Glycol Methacrylate: an alternative method for embedding subcutaneous implant. *J Endod* 2001 Apr; 27 (4): 266-8.
- Jakse N, Sibert FJ, Lorenzoni M, Eskici C. A modified technique of harvesting tibial cancellous bone and its use for sinus grafting. *Clin Oral Implants Res* 2001 Oct; 12 (5): 488-94.
- Kainulainen V, Oikarinen K. Comparison of four bone collectors designed for oral and maxillofacial surgery- an in vitro study. *Clin Oral Implants Res* 1998 Oct; 9 (5): 327-32.
- Kamijou T, Nakajima T, Ozawa H. Effects of osteocytes on osteoinduction in the autogenous rib graft in the rat mandible. *Bone* 1994 Nov/Dec; 15 (6): 629-37.
- Lipman W S, Marini, P R, Erdman S E. A comparison of Ketamine/ Xylazine and Ketamine/ Xilazine/ Acepromazine anesthesia in the rabbit. *Lab Amin Sei* 1980; 40: 395-8.
- Marotti G, Farneti D, Remaggi F, Tartari F. Morphometric investigation on osteocytes in human auditory ossicles. *Anat Anz* 1998 Oct; 180 (5): 449-53.
- Massone F. *Anestesia veterinária*. 3ed. Rio de Janeiro Guanabara Koogan; 1999.
- Matsumoto MA, Filho HN, Francischone E, Consolaro A. Microscopic analysis of reconstructed maxillary alveolar ridges using autogenous bone grafts from the chin and iliac crest. *Int Jq Oralq Maxillofac Implants* 2002 July/Aug; 17(4): 507-16.
- Mendicino RW, Leonhard E, Shromoff P. Techniques for harvesting autogenous bone grafts of the lower extremity. *J Foot Ankle Surg* 1996 Sept/Oct; 35 (5): 428-35.
- Muramatsu K, Bishop AT. Cell repopulation in vascularized bone grafts. *J Orthop Res* 2002 July; 20 (4): 772-8.
- Noble BS, Reeve J. Osteocyte function, osteocyte death and bone fracture resistance. *Mol Cell Endocrinol* 2000 Jan; 159 (1-2): 7-13.
- Raghoobar MG, Batenburg HKR, Vissink A, Reintsema H. Augmentation of localized defects of the anterior maxillary ridge with autogenous bone before insertion of implants. *J Oral Maxillofac Surg* 1996 Oct; 54 (10): 1180-5.
- Taga R, Cestary T M, Taga E M, Tavano O, Granjeiro, J M. Evolução de enxertos ósseos autógenos e alógenos colocados em defeitos ósseos de tamanho crítico em calvária de cobaias. *B C I* 2000 abr/jun; 7(26): 37-44.

Recebido em: 16/09/04

Aprovado em: 12/04/05

Paula Dechichi

Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Ciências Biomédicas –q Área de Morfologia

Cep: 38405-320 – Avenida Pará, 1720 –q Uberlândia – MG

Fone/Fax : (34)32329871

pauladechichi@umarama.uf.br