

## Estudo comparativo da substituição óssea frente a enxerto de osso autógeno e proteína morfogenética óssea ao lado de implantes de titânio

Julio Katuhide **UEDA\***, Carlos Eduardo **FRANCISCHONE\*\***,  
Lizete Toledo de Oliveira **RAMALHO\*\*\***, José Scarso **FILHO\*\*\*\***

### Palavras-chave

Biomaterial. Proteína morfogenética óssea. Osso autógeno. Implante de titânio. Reparação óssea.

### Resumo

A finalidade deste estudo foi verificar a capacidade de osseointegração do complexo BMP, em 6 coelhos brancos (*New Zealand*) que foram divididos em 2 grupos: grupo de enxerto de osso autógeno e grupo de BMP. Foram utilizados um total de 12 implantes de titânio puro, 2 em cada metáfise proximal da tíbia esquerda. Foram confeccionados defeitos ósseos de 2,5 x 4mm expondo as roscas dos implantes, que foram preenchidos com os 2 tipos de materiais estudados (osso autógeno e BMP). Os animais foram sacrificados 42 dias após a implantação e os espécimes foram processados para análise histológica. A substituição do material de enxerto e a neoformação óssea foram observadas em ambos os grupos. Concluiu-se que tanto o enxerto ósseo autógeno como o complexo BMP apresentam muito bom comportamento biológico, induzindo a neoformação óssea ao redor do implante.

\* Professor Assistente do curso de Odontologia da UNIOESTE - (Cascavel/PR).

\*\* Professor Titular do Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Dentários – FOB/USP (Bauru/SP).

\*\*\* Professora Assistente Doutora do Departamento de Morfologia – FOAr/UNESP (Araraquara/SP).

\*\*\*\* Professor Assistente Doutor do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia - FOAr/UNESP (Araraquara/SP).

## INTRODUÇÃO

Na tentativa de recuperar osso em quantidade suficiente para receber um implante, várias técnicas cirúrgicas e regeneração óssea guiada<sup>1</sup> têm sido usadas para preencher defeitos entre um leito alveolar e um implante, ou gerar osso ao redor da superfície de um implante, e também uma variedade de materiais de enxerto. Estes materiais podem ser combinados e/ou associados com a técnica da regeneração óssea guiada (GBR), usando barreiras de membrana<sup>1,2,5</sup>.

O tratamento de escolha para a maioria das deficiências ósseas é o auto-enxerto. Este provém de proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e um substrato satisfatório sobre o qual células formadoras de osso podem se prender. Se preparado e manipulado cuidadosamente, o auto-enxerto também pode ser uma boa fonte destas células formadoras de osso. Os benefícios do auto-enxerto, porém, nem sempre escapam dos riscos de um procedimento operatório adicional. Em algumas situações podem ser usados materiais de enxertos alternativos<sup>3,8</sup>.

Nos últimos anos, um considerável número de pesquisas enfocou a melhoria da regeneração óssea através do uso de proteína morfogenética óssea (BMP), estimulada pela capacidade osseointegrativa desta proteína<sup>16</sup>.

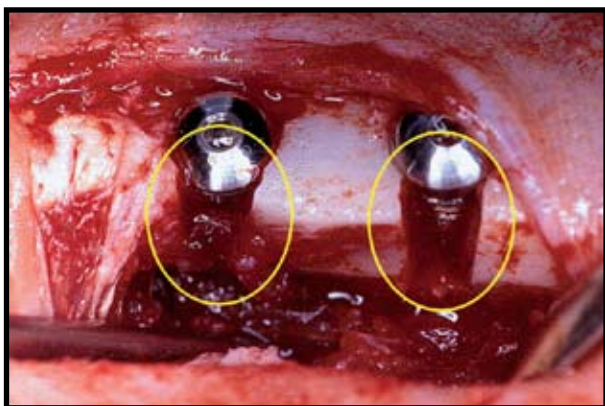
Assim, nesta contínua procura por um material de enxerto ideal, este estudo procurou comparar a formação óssea após colocação de osso autógeno ou BMP em defeitos ósseos, ao lado de implantes de titânio inse-

ridos em tíbias de coelhos (Para avaliação da formação dentro dos defeitos, espécimes histológicos foram preparados após 42 dias da cirurgia. A formação óssea também foi avaliada nas adjacências do implante de titânio). Com isto, procurou-se contribuir para o estudo e compreensão dos eventos relativos aos defeitos ósseos, frente à inserção de implantes de titânio e preenchimento com osso autógeno ou BMP.

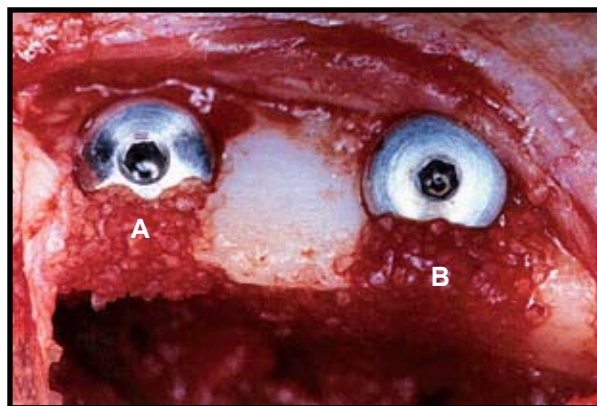
## MATERIAL E MÉTODOS

Foram empregados 6 coelhos brancos (*New Zealand*), machos, com peso aproximado de 3,5kg, idade entre 9 e 12 meses. Os animais alimentaram-se durante o período experimental com ração sólida e água, receberam dose única de penicilina benzatina (Pentabiótico Veterinário, Lab. Wyeth Ltda, São Bernardo do Campo/SP) na proporção de 16.000 UI por via intraperitoneal, logo após a cirurgia. Para os procedimentos experimentais, os animais foram submetidos à anestesia com pré-anestésico cloridrato de xilasina (Rompum, Bayer, São Paulo/SP) a uma dose de 0,1ml/kg de peso corporal, seguido de cloridrato de cetamina (Ketalar, Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A., Guarulhos/SP) a uma dose de 0,5ml/kg de peso corporal, produzindo uma anestesia dissociativa e cataléptica, associada ao anestésico local, cloridrato de lidocaína (Xilocaína, Merrell Lepetit Farmacêutica e Industrial Ltda, Guarulhos/SP) para fins de isquemia.

Após a realização da tricotomia na porção interna da perna, abrangendo a região da me-



**Figura 1** - Aspecto dos defeitos ósseos confeccionados através de broca tronco cônica 703.



**Figura 2** - Implante de titânio posicionado e enxertos colocados. **A)** Enxerto de osso autógeno. **B)** Enxerto de BMP/HA.

táfise tibial, procedeu-se a antissepsia da pele com álcool iodado 3%, isolamento da área com campos estéreis e incisão linear com 5cm, envolvendo o periósteo da porção proximal da tibia esquerda destes animais. Após rebatimento do retalho, com a exposição da cortical óssea, realizou-se as perfurações até próximo à cortical interna, com auxílio de micromotor DEC 500 (Nobel Biocare, Gothenburg, Sweden) com brocas do sistema Branemark, preparando as cavidades sob abundante irrigação salina. Foi confeccionado, em seguida, um defeito ósseo com auxílio de uma broca tronco cônica 703, montada em micromotor convencional, resultado da remoção da cortical externa, promovendo uma fenestração de aproximadamente 4mm de altura e 2,5mm de largura. Assim, foram confeccionadas duas cavidades cirúrgicas na tibia esquerda, ambas preparadas para receber um implante e um enxerto (Fig. 1).

Nessa etapa, os animais foram divididos em dois grupos:

- Grupo enxerto de osso autógeno: leito que recebeu o implante de titânio AST (Titanium Fix - São José dos Campos/SP) e o enxerto de osso autógeno, colocado no defeito ósseo, colhido das osteotomias durante a fase do preparo ósseo (Fig. 2A). O implante utilizado era de titânio comercialmente puro, superfície maquinada, grau II, cilíndrico, com rosca externa, diâmetro de 3,75mm e comprimento de 7mm.

- Grupo enxerto de BMP: leito que recebeu o implante de titânio e o enxerto de proteína morfogenética óssea (BMP) bovino, colocado no defeito ósseo, tendo como veículo a hidroxiapatita (HA) (Fig. 2B). A BMP utilizada foi sintetizada pelo Departamento de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru, FOB/USP. Esta BMP foi derivada do osso bovino e

associada à hidroxiapatita microgranular (tamanho das partículas de 50µm), reabsorvível e cristalina, numa proporção de 0,2mg de BMP para 20mg de HA, em forma de pó.

Os animais foram sacrificados aos 42 dias pós-operatório, com uma overdose intravenosa de barbitúricos diluídos em solução salina. A tibia esquerda foi separada cuidadosamente dos tecidos adjacentes e cortada. As peças obtidas foram reduzidas, fixadas em formol neutro tamponado a 10%, durante 96 horas. Na seqüência, foram descalcificadas em solução de Morse<sup>9</sup>, por um período de 4 meses, com troca da solução a cada 24 horas.

Após a completa descalcificação, os implantes foram removidos, as peças desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina, sendo orientadas de forma a permitir cortes longitudinais envolvendo osso cortical, medular, enxerto e implante em uma mesma lâmina. Os cortes semi-seriados, com 6µm de espessura, foram corados pelo Tricrômico de Mallory e pela Hematoxilina e Eosina para análise histomorfológica, sob fotomicroscópio óptico (Fotomicroscópio Zeiss, modelo Jenaval).

## RESULTADOS

### Análise descritiva

#### 42 dias

O grupo de osso autógeno mostrou osso neoformado reproduzindo perfeitamente a topografia do implante. A matriz óssea neoformada era homogênea, com uma grande concentração de células (osteócitos) no seu

interior. Observou-se também lamelas de fibras colágenas concêntricas ao canal de Havers (Fig. 3).

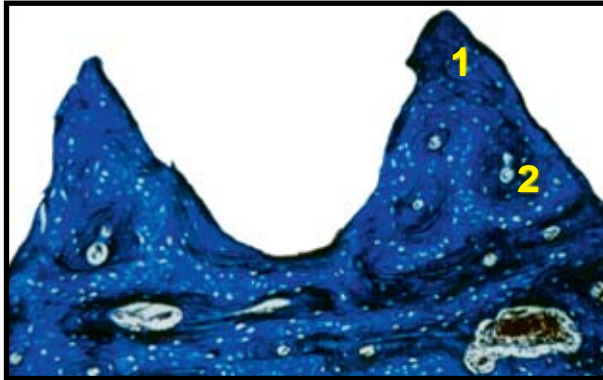
O osso recém formado era do tipo embrionário alamelar, rico em células (osteócitos), rodeadas por fibras colágenas dispostas paralelamente umas às outras. Os espaços medulares apresentaram-se com superfície recoberta por osteoclastos e osteoblastos e preenchidos com tecido conjuntivo frouxo (Fig. 4).

Na porção apical, junto à base do implante, observou-se linha reversa separando osso novo formado e o leito ósseo receptor (Fig. 4).

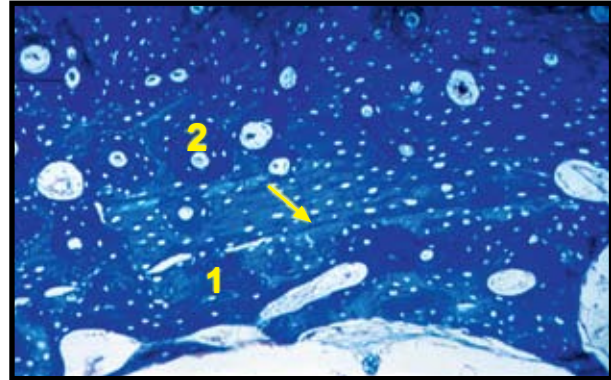
No grupo de BMP ocorreu também a neoformação óssea, sem remanescentes de cristais de hidroxiapatita. Sistemas haversianos foram vistos regularmente nos processos ósseos que preencheram as rosca do parafuso. Nenhum tecido fibroso ou células foram encontrados na interface. Osso novo que tinha se formado dentro da interface estava em processo de maturação, com osteócitos, amplos canais medulares e nichos cartilagosos (Fig. 5).

Para este tempo de acompanhamento foi observada, em alguns pontos, a permanência de tecido conjuntivo na ponta da rosca da interface BMP/implante, que posteriormente será substituído por osso (Fig. 6). Nos espaços medulares, foi observada presença de osteoclastos ativos na superfície óssea interna.

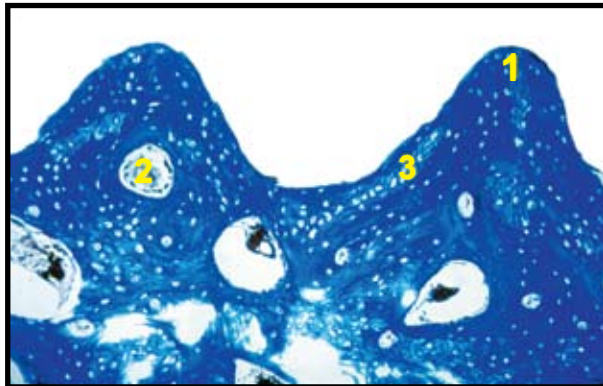
A BMP induziu a formação óssea de maneira eficiente, permitindo a formação do leito de tecido conjuntivo denso para posterior neoformação óssea após os 42 dias. O osso recém-



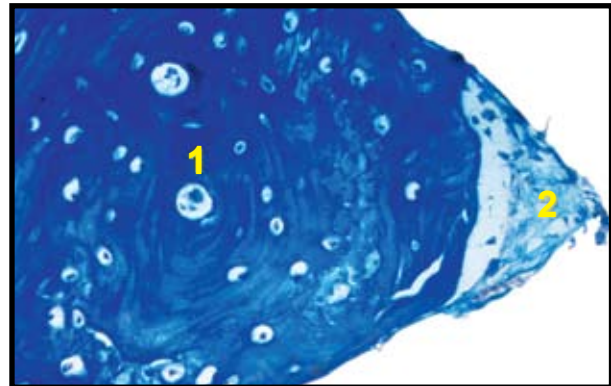
**Figura 3** - Osso autógeno. Interface osso/metal revestida por matriz óssea homogênea, com grande concentração de células (osteócitos) (1). Lamelas de fibras colágenas concêntricas ao canal de Havers (2). 42 dias. Tricrômico de Mallory. 200X.



**Figura 4** - Osso autógeno. Substituição de matriz de tecido conjuntivo por osso embrionário. Presença da linha reversa (seta). Osso alamelar (1). Osso lamelar (2). 42 dias. Tricrômico de Mallory. 200X.



**Figura 5** - BMP. Osso neoformado em processo de maturação, com osteócitos (1), amplos canais medulares (2) e nichos cartilaginosos (3). 42 dias. Tricrômico de Mallory. 200X.



**Figura 6** - BMP. Osso recém-formado com disposição lamelar, com amplo canal de Havers rodeado por osteoclasto (1). Tecido conjuntivo na ponta da rosca (2). 42 dias. Tricrômico de Mallory. 400X.

formado apresentou-se rico em osteócitos, com uma disposição constituindo lamelas, amplo canal de Havers rodeado por osteoblastos, no interior de uma rosca (Fig. 6). Em outros locais observou-se uma lamela totalmente neoformada rodeada por cartilagem hialina, e pequenos nichos cartilagosos com núcleos celulares vazios e hipertróficos de maneira empilhada (Fig. 5).

O osso neoformado apresentou-se imaturo, em processo de diferenciação.

## DISCUSSÃO

Osso autógeno é considerado o "padrão de ouro" dos materiais de enxerto há muito tempo<sup>1</sup>, sendo o tratamento de escolha em procedimentos de aumento ósseo executados em implantes dentários<sup>7</sup>. Atualmente é o único material osteogênico disponível. O enxerto de osso autógeno age na cicatrização óssea durante os processos de osteogênese, osseoindução e osseocondução. Em relatório de uma conferência, Jensen et al.<sup>6</sup> reafirmaram que o auto-enxerto pode ser considerado o material de escolha para muitos defeitos esqueléticos, incluindo o soalho do seio maxilar, considerando a sua capacidade de osseoindução e de não depender da migração de células osteogênicas indiferenciadas.

Atualmente, o fenômeno farmacocinético da osseoindução é atribuído às concentrações diretamente proporcionais de BMP presente no material de enxerto<sup>6,17,18</sup>. Esta proteína capaz de induzir neoformação óssea em locais subcutâneos foi purificada de osso cortical inicialmente por Urist et al.<sup>14</sup>, ao implantarem os compo-

mentos insolúveis após descalcificação do osso com ácido clorídrico no subcutâneo de ratos, observando formação de tecido ósseo.

BMPs são compostos osseoindutores que induzem neoformação óssea no local da implantação<sup>11,13,17,18</sup>. O mecanismo exato da ação de BMPs não é entendido completamente, mas acredita-se que estimulem a diferenciação de células mesenquimais em condrócitos e osteoblastos, com subsequente formação do tecido ósseo<sup>2,4,8,10,11,13,15,16,17,18</sup>.

Osso induzido pelas BMPs apresenta todas as características de osso normal, inclusive formação de cartilagem seguida por ossificação endocondral<sup>2,4,8,10,11,13,15,16,17,18</sup>.

Em nossa pesquisa, o procedimento foi avaliado após 42 dias, para a comprovação da reparação, já que em coelhos este período é suficiente para que o osso imaturo seja substituído por osso lamelar secundário com resistência adequada para suportar a pressão<sup>12</sup>.

No presente estudo, foi verificado para ambos os grupos que, em 42 dias, ocorreu a total neoformação óssea com presença de grande concentração de células (osteócitos), lamelas de fibras colágenas concêntricas ao canal de Havers, cartilagem hialina, estando o osso em processo de maturação, ou seja, incapaz de resistir às pressões, para ambos os grupos.

Resultados similares com a utilização da proteína morfogenética óssea foram observados por Ono et al.<sup>11</sup>, que notaram formação óssea já em 3 semanas ao redor de discos compostos por um complexo HA/BMP/colágeno, sob o periosteio do crânio de coelhos.

Xiang et al.<sup>16,17</sup> e Yan et al.<sup>18</sup>, utilizando BMP bovino associado ao colágeno bovino, demonstraram justaposição direta de osso, após 4 semanas, apresentando osso compacto e sistemas haversianos, grande quantidade de osso neoformado em meio à rica concentração de osteócitos, em estudo realizado em cães. Após 8 semanas, observou-se osso lamelar em arranjo paralelo aos sistemas haversianos, firmemente aderido, sem cápsula fibrosa ou células, mostrando osseointegração. Após 12 semanas, o osso tornou-se maduro.

Rutherford et al.<sup>13</sup>, usando BMP bovino associado à matriz de colágeno de macaco, revelaram o osso neoformado em justaposição íntima à superfície do implante de titânio, dentro de 3 semanas. No grupo tratado somente com colágeno, nenhuma aposição íntima foi vista.

De um modo geral, observou-se neste trabalho que a neoformação óssea ocorreu tanto no grupo de BMP como no grupo de enxerto de osso autógeno. Essencialmente, com o passar do tempo, defeitos tratados com os enxertos foram invadidos por canais vasculares e uma

população de osteoblastos, seguidos por neoformação óssea.

O osso neoformado em nosso estudo parece ser qualitativamente semelhante àquele encontrado quando o implante é inserido em osso residual e satisfatório para osseointegração, conforme relatado por Hanisch et al.<sup>4</sup>

Além disso, o osso neoformado apresentou-se imaturo, após os 42 dias, em ambos os grupos, estando em processo de diferenciação e maturação.

## CONCLUSÕES

a) O osso neoformado pareceu ser qualitativamente semelhante e satisfatório para osseointegração, para ambos os grupos (BMP e osso autógeno), após 42 dias.

b) A BMP apresentou evidências de induzir a formação óssea de maneira eficiente, permitindo a neoformação do leito conjuntivo e subsequente neoformação óssea após 42 dias.

c) A implantação cirúrgica de BMP parece ter utilidade clínica e pode constituir-se numa alternativa para enxertos ósseos autógenos em procedimentos de ganho ósseo, nas condições estudadas.

## Comparative study between autogenous bone and bone morphogenetic protein grafted in bony sites together with titanium implants

### ABSTRACT

The aim of this study was to verify the capacity of osseointegration of the 6 white rabbits BMP complex (*New Zealand*) that were divided in 2 groups: group graft of autogenous bone and group of BMP. It was used a total of 12 implants of pure titanium, 2 in each proximal metaphysis of the left tibia. It was confectioned bone defects of 2.5 x 4mm exposing the threads of the implants, which were filled with the two types of the materials studied (autogenous bone and BMP). The animals were sacrificed after 42 days of the implantation, and the specimens were processed to histologic analysis. After 42 days substitution of the grafted material and bone neoformation were observed in both groups. It was concluded that both autogenous bone graft and BMP complex present a very good biological behavior, inducing bone neoformation around the implants.

**KEY WORDS:** Biomaterial. Bone morphogenetic protein. Autogenous bone. Titanium implants. Bone repair.

### REFERÊNCIAS

1. BECKER, W. et al. Variations in bone regeneration adjacent to implants augmented with barrier membranes alone or with demineralized freeze-dried bone or autologous grafts: a study in dogs. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Lombard, v. 10, no. 2, p. 143-154, Mar. 1995.
2. COCHRAN, D. L. et al. Radiographic analysis of regenerated bone around endosseous implants in the canine using recombinant human bone morphogenetic protein-2. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Lombard, v. 12, no. 6, p. 739-748, Nov./ Dec. 1997.
3. GROSS, J. S. Bone grafting materials for dental applications: a practical guide. **Compend Contin Educ Dent**, Jamesburg, v. 18, no. 10, p. 1013-36, Oct. 1997.
4. HANISCH, O. et al. Bone formation and osseointegration stimulated by rhBMP-2 following subantral augmentation procedures in nonhuman primates. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Lombard, v. 12, no. 6, p. 785-792, 1997.
5. HENRY, P. J. et al. Tissue regeneration in bony defects adjacent to immediately loaded titanium implants placed into extraction sockets: a study in dogs. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Lombard, v. 12, no. 6, p. 758-766, 1997.
6. JENSEN, O. T. et al. Report of the Sinus Consensus Conference of 1996. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Lombard, v. 13 p. 11-45, 1998. Supplement.
7. MALEKZADEH, R. et al. Isolation of human osteoblast-like cells and in vitro amplification for tissue engineering. **J Periodont**, Chicago, v. 69, no. 11, p. 1256-1262, Nov. 1998.
8. MARDEN, L. J. et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 is superior to demineralized bone matrix in repairing craniotomy in rats. **J Biomed Mater Res**, Hoboken, v. 28, no. 10, p. 1127-1138, Oct. 1994.
9. MORSE, A. Formic-acid-sodium citrate decalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bones for sectioning paraffin. **J Dent Res**, Chicago, v. 24, p. 143-153, 1945.

10. ONG, J. L. et al. Surface roughness of titanium on bone morphogenetic protein-2 treated osteoblast cells in vitro. **Implant Dent**, Baltimore, v. 6, no. 1, p. 19-24, Spring 1997.
11. ONO, I. et al. A study on bone induction in hydroxyapatite combined with bone morphogenetic protein. **Plastic Reconstr Surg**, Baltimore, v. 90, no. 5, p. 870-879, Nov. 1992.
12. ROBERTS, R. W. et al. Osseous adaptation to continuous loading of rigid endosseous implants. **Am J Orthod**, St. Louis, v. 86, no. 2, p. 95-111, Aug. 1984.
13. RUTHERFORD, R. B. et al. Use of bovine osteogenic protein to promote rapid osseointegration of endosseous dental implants. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Lombard, v. 7, no. 3, p. 297-301, 1992.
14. URIST, M. R.; STRATES, B. S. Bone Morphogenetic Protein. **J Dent Res**, Chicago, v. 50, no. 6, p. 1392-1406, Nov./Dec. 1971.
15. WOZNEY, J. M. The potential role of bone morphogenetic proteins in periodontal reconstruction. **J Periodont**, Chicago, v. 66, no. 6, p. 506-510, June 1995.
16. XIANG, W. et al. Tissue reactions to titanium implants containing bovine bone morphogenetic protein: a scanning electron microscopic investigation. **Int J Oral Maxillofac Surg**, Munksgaard, v. 23, p. 115-119, 1994.
17. XIANG, W. et al. The effect of bone morphogenetic protein on osseointegration of titanium implants. **J Oral Maxillofac Surg**, Philadelphia, v. 51, p. 647-451, 1993.
18. YAN, J. et al. Early histologic response to titanium implants complexed with bovine bone morphogenetic protein. **J Prosth Dent**, Mosby, v. 71, no. 3, p. 289-294, Mar. 1994.

#### Endereço para correspondência

**Julio Katuhide Ueda**  
Rua Presidente Bernardes, 2.557 apto. 103 - Centro  
CEP: 85.810-130 - Cascavel/PR  
E-mail: jkueda@unioeste.br