

Reação tecidual e perfil de fosfatases após o implante de matriz óssea desmineralizada xenogênica em músculo de ratos

Tissue reaction and phosphatases profile after implant of xenogenic demineralized bone matrix in rat muscle

Willian Fernando ZAMBUZZI

Marcelo Costa Marques NEVES

Graduando em Ciências Biológicas – Laboratório de Bioengenharia, Materiais e Mineralização Biológica – Faculdade de Odontologia de Bauru – USP – Bauru – SP – Brasil

Rodrigo Cardoso de OLIVEIRA

Thelma Lopes da SILVA

Doutorando – Programa de Pós-Graduação – Biologia Funcional e Molecular, Laboratório de Bioengenharia, Materiais e Mineralização Biológica IB – UNICAMP – Campinas – SP – Brasil

Tânia Mary CESTARI

Doutoranda – Programa de Pós-Graduação – Biologia Oral, Laboratório de Bioengenharia, Materiais e Mineralização Biológica – Faculdade de Odontologia de Bauru – USP – Bauru – SP – Brasil

Marília Afonso Rabelo BUZALAF

José Mauro GRANJEIRO

Professor Associado – Ciências Biológicas, Laboratório de Bioengenharia, Materiais e Mineralização Biológica – Faculdade de Odontologia de Bauru – USP – Bauru – SP – Brasil

Rumio TAGA

Eulázio Mikio TAGA

Professor Titular – Ciências Biológicas Laboratório de Bioengenharia, Materiais e Mineralização Biológica – Faculdade de Odontologia de Bauru – USP – Bauru – SP – Brasil

RESUMO

Neste estudo correlacionou-se o perfil da atividade das fosfatases ácidas com os aspectos histológicos do tecido reacional em resposta à implantação subcutânea de biomaterial de enxerto preparado com matriz óssea desmineralizada bovina. Cinquenta ratos Wistar machos foram submetidos a implantação do enxerto e sacrificados após 7, 14, 21, 30 e 67 dias. As biópsias obtidas foram fixadas em formalina 10% em tampão fosfato e cortes histológicos de 6 µm de espessura foram corados com hematoxilina e eosina. As atividades enzimáticas específicas (AE) das fosfatases ácidas foram determinadas utilizando-se o p-nitrofenilfosfato (pNFF) como substrato em tampão acetato, pH 5,0, e inibidores específicos. Para a fosfatase alcalina (FALc) foi utilizado o pNFF em tampão glicina, pH 9,2, contendo CaCl₂. A análise histológica mostrou infiltrado inflamatório crônico com predomínio de macrófagos e linfócitos e presença de células gigantes multinucleadas, reabsorção do enxerto ao longo do tempo, estando ausente aos 67 dias; não pode ser observada formação óssea heterotópica. A atividade da fosfatase ácida total foi elevada e constante entre 7 e 30 dias, cerca de 30,0 nmol min⁻¹mg⁻¹, decaindo, em seguida, para 6,9 nmol min⁻¹mg⁻¹, enquanto a atividade da fosfatase alcalina foi baixa, com valor máximo de 6,0 nmol min⁻¹mg⁻¹ aos 30 dias. As atividades PTP, FAL e TRAP corresponderam, respectivamente, a cerca de 70, 25 e 10% da FAT. Concluímos que o enxerto de matriz óssea bovina desmineralizada não induziu a osteogênese heterotópica e que as fosfatases ácida e alcalina participaram da resposta tecidual, sendo moduladas em função do tempo.

UNITERMOS

Monoéster fosfórico hidrolases, animal; tirosina, ratos; transplante ósseo; matriz óssea bovina.

INTRODUÇÃO

Um dos mecanismos mais fascinante no organismo é a alta capacidade do tecido ósseo se regenerar. No entanto, em casos de perda ou dano extenso, causado por doença periodontal, tumores, traumas, etc, a capacidade de regeneração é significativamente limitada, muitas vezes impedindo sua função original¹⁴. Assim, é necessário encontrar técnicas e materiais para auxiliar o reparo de grandes defeitos ósseos. Atualmente, como possíveis soluções utilizam-se enxertos autógenos, alógenos, aloplásticos, xenogênicos e fatores de crescimento.

No caso do enxerto autógeno, o osso é removido do próprio paciente de regiões extra-orais (crista ílica e calvária) ou intra-orais (ramo e sínfise mandibular, tuberosidade, toros), dependendo da quantidade necessária, e sua principal vantagem é a transferência de células osteoprogenitoras e matriz óssea¹¹. No entanto, por ser um enxerto avascular o risco de reabsorção é alto e pode acontecer antes mesmo de completar-se a osteogênese⁶. Outras desvantagens como necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica, volume e qualidade óssea limitada, risco de seqüelas e contaminação, morbidade e alto custo da internação estimularam o desenvolvimento de outros tipos de materiais de enxerto.

Biomateriais são compostos utilizados na clínica médico-odontológica que devem auxiliar o reparo ósseo e apresentar biocompatibilidade, previsibilidade, aplicação clínica sem riscos transoperatórios e seqüelas pós-operatórias mínimas, além de aceitação por parte do paciente. Apesar de não se ter encontrado um material que preencha todos esses requisitos, atualmente há uma grande variedade de opções para enxertos ósseos, os quais estão em constante desenvolvimento e aperfeiçoamento²⁰. Em 1965 Urist²¹ descobriu que a matriz orgânica óssea alogênica tinha capacidade de induzir a formação de osso em sítios heterotópicos. Outros estudos demonstraram o potencial osteoindutor da matriz óssea bovina⁷. Porém, pouco se conhece a respeito das bases celulares e moleculares da resposta tecidual aos biomateriais produzidos com esta matriz. O recrutamento de células, a modulação do processo inflamatório e a promoção do reparo, por cicatrização ou regeneração, são influenciados pelas suas características físicas, químicas e biológicas.

As fosfatases ácidas constituem uma ampla família de enzimas largamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em muitas espécies animais e vegetais. Embora apresentem uma característica funcional

comum, as isoenzimas das fosfatases ácidas diferem significativamente quanto à localização tecidual, origem cromossomal, massa molecular, seqüência de aminoácidos, comprimento da cadeia de aminoácidos, especificidade e sensibilidade a inibidores como tartrato e fluoreto^{1,5,9}. Em função da posição relativa em gel de poliacrilamida, cinco diferentes isoenzimas da fosfatase ácida foram indicadas: a lisossomal, a prostática, a do eritrócito, do macrófago e do osteoclasto⁵. A do eritrócito é atualmente designada de proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular (PTP), está envolvida no controle da proliferação celular^{1,9}.

As fosfatases alcalinas são um grupo de enzimas situadas na membrana celular que interferem em diferentes níveis na fisiologia tecidual¹⁹, sendo encontradas no soro diferentes isoenzimas como a óssea, hepática, intestinal, placentária, renal e leucocitária. Podem estar aumentadas em alterações como leucemia aguda, urticárias, aplasia medular, infecções, etc¹⁹. É um marcador importantíssimo da osteogênese, possivelmente envolvida na fase de mineralização da matriz extracelular³. Apesar dos conhecimentos sobre as características cinéticas destas enzimas, seus papéis fisiológicos permanecem ainda obscuros. Embora seja provável a participação de fosfatases na resposta celular a biomateriais, sua distribuição temporal e correlação com os eventos teciduais são desconhecidos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta tecidual ao implante da matriz óssea bovina desmineralizada (MOB) em tecido muscular de ratos e correlacioná-la ao perfil de fosfatases ácidas e alcalina no tecido reacional.

MATERIAL E MÉTODOS

Um total de cinquenta ratos Wistar, machos adultos (250g), provenientes do Biotério Central da Instituição, foram divididos aleatoriamente em grupos de dez animais. A pesquisa foi realizada com aprovação e segundo as normas recomendadas pela Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da Instituição, seguindo o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Procedimentos de implantação e coleta das biopsias

Os animais foram anestesiados via intramuscular com 0,5 mL/Kg de peso de Dopalen (Agribands do Brasil Ltda, Paulínia – SP) + Anasedan (Agribands do Brasil Ltda, Paulínia – Brasil) na proporção 1:1 (v:v). Realizou-se a tricotomia e assepsia (álcool iodado) da

pele na região lateral dorsal das pernas posteriores do animal. Realizou-se uma incisão reta na pele desses animais no sentido longitudinal, de aproximadamente 10mm, expondo o tecido conjuntivo subcutâneo e, em seguida, o muscular. A Matriz Óssea Orgânica Bovina (MOB), Gen-Ox[®], Baumer S.A., Mogi Mirim, SP, Brasil, registrado no Ministério da Saúde sob o nº 103.455.00001, foi hidratada em soro e, com o auxílio de porta-amálgama, inserida na cavidade cirúrgica. Seguiu-se a sutura (fio de seda nº 3.0) e assepsia com álcool iodado. Os procedimentos descritos para implantação da MOB foram realizados em ambas as pernas posteriores dos animais. No grupo controle não houve implantação da MOB. Por todo o período experimental os animais receberam dieta normal “*ad libitum*” composta de ração granulada e água, sendo mantidos em gaiolas com forragem de maravalha.

Decorridos os períodos experimentais de 7, 14, 21, 30 e 67 dias, cada animal foi anestesiado e o tecido reacional foi localizado por meio visual e através da palpção, em seguida o mesmo foi removido cuidadosamente por disseção. A peça (constituída do material implantado mais o tecido reacional adjacente) tinha aproximadamente 15mm de comprimento e 10mm de largura. O mesmo tipo de procedimento de coleta das peças foram realizados em ambas as pernas do animal. Em seguida o animal foi submetido à eutanásia por deslocamento cervical. O material recolhido da perna esquerda foi destinado ao preparo histológico, sendo imediatamente fixado em formalina a 10% tamponada, e o da perna direita congelado a -20°C para a posterior análise bioquímica.

Processamento das peças e análise histológica

As peças para estudo microscópico foram fixados em formalina a 10% tamponada por um período de 24 horas, lavadas em água corrente por 5 horas e processadas para inclusão em Histosec (parafina + resina sintética). Cortes histológicos com 6 µm de espessura foram obtidos e corados pela hematoxilina e eosina. A análise morfológica descritiva e semi-quantitativa avaliou a presença de infiltrado inflamatório, de fibroblastos e fibras colágenas, a intensidade e localização da angiogênese; a presença de tecido de granulação e a formação de trabéculas ósseas, classificados segundo os seguintes escores: ausente (zero), leve (1), moderado (2) e intenso (3).

Determinação da atividade enzimática

As biópsias destinadas à análise enzimática foram homogeneizadas em tampão acetato de sódio 0,1M,

pH 5,0 (4°C). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante constituiu o extrato límpido a ser utilizado nas dosagens das fosfatases ácidas. O precipitado foi ressuspenso em tampão Tris-HCl 0,1M/pH 7,5. Após 30 minutos sob agitação à temperatura ambiente, a solução ressuspenso foi centrifugada a 10.000 rpm durante 20 minutos e o sobrenadante foi utilizado para a quantificação da fosfatase alcalina.

A) Fosfatase Ácida Total (FAT): Em um volume final de 0,5 mL, a reação foi iniciada pela adição do extrato límpido a um meio contendo 0,1M de tampão acetato de sódio, pH 5,0, e 5mM de p-nitrofenil fosfato (pNFF). A paralisação ocorreu pela adição de 0,5 mL de NaOH 1,0 M, após incubação por 15 minutos a 37°C. Nos controles, o extrato foi adicionado após a colocação do NaOH. A formação do p-nitrofenol foi determinada espectrofotometricamente a 405nm (Espectrofotômetro Cary 50). Coeficiente de extinção molar do p-nitrofenóxido: 18.000 M⁻¹cm⁻¹ (Granjeiro et al., 1997). Uma Unidade de Atividade Enzimática (UE) é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1nmol de pNFF por minuto. A Atividade Enzimática Específica (AE) é expressa como unidade de Atividade Enzimática por miligrama de proteína (AE=EU/mg).

B) Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato (TRAP): O ensaio foi realizado como descrito para a FAT, exceto pela adição de p-hidroximercuribenzoato (pHMB) e tartarato. O pHMB inibe toda a atividade de baixo peso molecular (FABMr) e a atividade residual na presença do tartarato corresponde à TRAP.

C) Proteína Tirosina Fosfatase: O ensaio foi realizado exceto pela adição de pHMB que inibe toda a atividade das proteínas tirosinas fosfatases. A diferença entre a AE da FAT e a atividade residual na presença de pHMB é correspondente à PTP.

D) Fosfatase Ácida Lisossomal: É dada pela diferença entre a AE da Fosfatase Ácida Total, da soma das Fosfatases Ácidas Resistente ao Tartarato (TRAP) e Proteína Tirosina Fosfatase (PTP's).

E) Fosfatase Alcalina (FALc): A Atividade Enzimática (AE) foi determinada a 37°C, através da formação do p-nitrofenol (coeficiente de extinção molar de 18.000 M⁻¹cm⁻¹, em pH alcalino), utilizando-se um tampão de glicina 25mM, pH 9,4 contendo 2mM de MgCl₂ em 1mM de pNFF, em um volume final de 0,5 mL. A reação foi iniciada pela adição de 0,05mL do extrato límpido. A paralisação ocorreu pela adição de 0,5mL de NaOH 1M, após incubação por 15 minutos a 37°C.

Determinação da Concentração Protéica

A proteína foi quantificada pelo método de Bradford⁴ (1976), utilizando BSA (Albumina de Soro Bovino) como padrão. A reação foi iniciada pela adição de 0,2 mL do reagente de cor a 0,8ml da amostra. A leitura de absorbância foi realizada a 595nm, após 5 minutos de espera a temperatura ambiente.

RESULTADOS

A intensidade e qualidade do infiltrado inflamatório, o grau de fibrosamento, proliferação fibroblástica e angioblástica, obtidas na análise histológica, estão resumidos na Figura 1. Aos sete dias (Figura 2) observou-se que o implante de MOB induziu um processo inflamatório intenso caracterizado pela presença de muitos polimorfonucleares (PMNs) e macrófagos. A interação dos macrófagos com os fragmentos da matriz óssea era bastante evidente, inclusive com áreas em degradação. A proliferação fibroblástica e angioblástica era maior na região periférica. O fibrosamento e a presença de linfócitos e plasmócitos era leve. O infiltrado inflamatório crônico permaneceu intenso até o período de 14 dias,

com redução no número de macrófagos, mas aumento no de linfócitos, constituindo um colar de células ao redor das partículas de material. A proliferação fibroblástica e angioblástica havia diminuído em relação ao grupo anterior (Figura 1) e o grau de fibrosamento permaneceu leve. Aos 21 dias verificou-se uma intensa reabsorção do material e a presença de macrófagos com inúmeros vacúolos endocíticos, mas o número de macrófagos e plasmócitos tinha diminuído. A presença de linfócitos permaneceu moderada como no grupo anterior. Células Gigantes Multinucleadas Inflamatórias (CGMIs) com os núcleos polarizados foram observadas em íntimo contato com o material, mas sem evidência de borda pregueada (Figura 3). Era evidente neste período a localização de macrófagos ao redor do material circundados por linfócitos. A proliferação fibroblástica e angioblástica havia diminuído em relação ao período anterior. Após trinta dias foi observada intensa reabsorção da MOB sendo notável a presença de macrófagos repletos de vacúolos endocíticos e reduzido número de CGMIs em relação ao período de 21 dias. O fibrosamento era maior que nos outros períodos. Após 67 dias o material foi completamente absorvido (Figura 4).

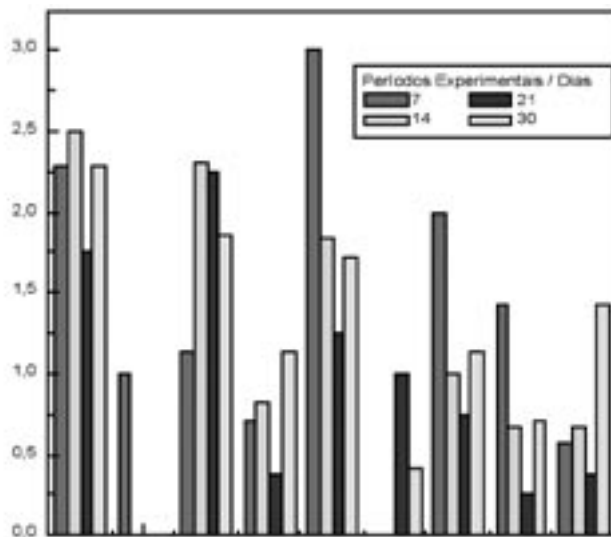


FIGURA 1 – Média dos escores obtidos na avaliação microscópica do tecido muscular de rato com implante de MOB. Distribuição média das células inflamatórias (PMNs, linfócitos, plasmócitos, macrófagos, CGMIs), grau de fibrosamento, de proliferação fibroblástica e angioblástica, e a intensidade do infiltrado inflamatório na região muscular de animais que receberam implante de Matriz Óssea Bovina, nos diferentes períodos experimentais. As características analisadas estão descritas na figura, nos respectivos períodos experimentais. Obs: O grupo de 67 dias não foi analisado por não ter sido encontrado o material devido à reabsorção

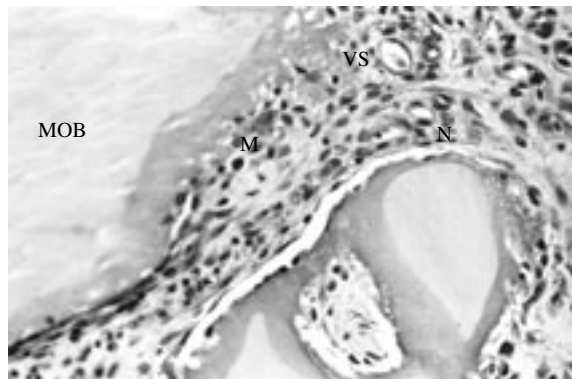


FIGURA 2 – Período de 7 dias. Reação Inflamatória Crônica, após o implante de Matriz Óssea Bovina (HE, 40x). Grande quantidade de macrófagos pode ser observada. MOB: Matriz Óssea Bovina; M: Macrófago, N: Neutrófilo, VS: Vaso Sangüíneo

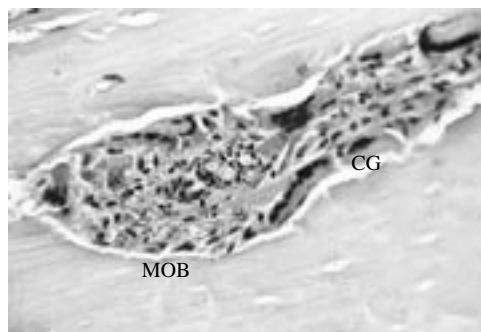


FIGURA 3 – Período de 21 dias. Presença de Células Gigantes Multinucleadas Inflamatórias (HE, 40x). MOB: Matriz Óssea Bovina; CG: CGMIs

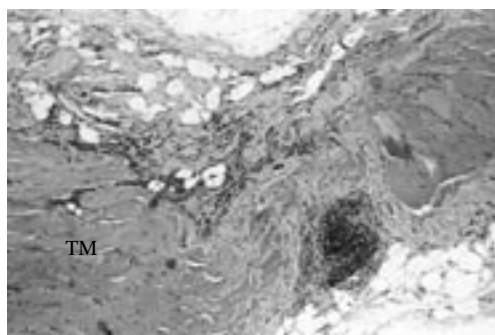


FIGURA 4 – Grupo Experimental de 67 dias. A Matriz Óssea Bovina não foi encontrada devido a sua reabsorção (HE, aumento original 10x). TM: Tecido Muscular

A atividade específica (AE) das fosfatases estudadas nos diferentes períodos experimentais estão resumidas na Figura 5. A AE da fosfatase ácida total, atividade determinada na ausência de inibidores, mostrou-se constante entre sete e trinta dias (ao redor de $23 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$), diminuindo significativamente aos 67 dias ($4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, $p < 0,01$). Cerca de 70% de toda a atividade fosfatase ácida correspondeu à PTP, que manteve-se constante até o período de trinta dias (16 nmol min^{-1}

mg^{-1}), diminuindo para $2,3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ aos 67 dias ($p < 0,01$), quando representava cerca de 45% de toda a atividade fosfatase ácida. A atividade da fosfatase ácida lisossomal permaneceu constante até o 21º dia, diminuindo significativamente até o final do estudo ($p < 0,05$). A TRAP apresentou atividade cerca de dez vezes menor que a FAT, não variando significativamente ao longo de todo o experimento. Por outro lado, a fosfatase alcalina atingiu seu pico máximo aos trinta dias ($p < 0,001$).

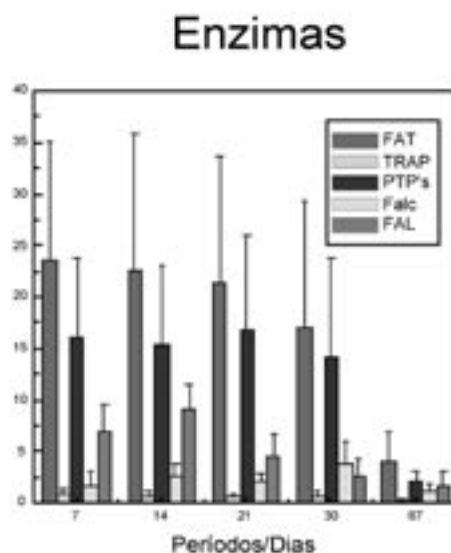


FIGURA 5 – Perfil da Atividade Específica das Fosfatases Ácidas e Alcalina. A Atividade Enzimática foi determinada nos extratos de tecido muscular, que sofreram enxerto de Matriz Óssea Bovina, e foram removidos nos períodos indicados. A AE da FAT representa a soma da PTP's, FAL e TRAP (FAT = PTP's + FAL + TRAP)

DISCUSSÃO

A proposta deste trabalho fundamentou-se na falta de informações concernentes aos aspectos moleculares envolvidos na resposta biológica a biomateriais. Apesar de vasta literatura investigando diferentes biomateriais, pouco se sabe quanto ao processo de sua degradação nos diversos sítios de implantação. A compreensão destes fenômenos poderá contribuir para a avaliação e melhoria na qualidade desses biomateriais.

As fosfatases ácidas são hidrolases envolvidas em diversos processos como: reabsorção óssea (TRAP), controle do ciclo celular (Tyr-P) e digestão intracelular (FAL)² e a fosfatase alcalina está claramente associada à osteogênese, sendo um importante marcador desse processo. No entanto, em função da complexidade das respostas celulares aos mais diferentes estímulos, muitas vezes é difícil determinar a função exata de certas enzimas nos diferentes processos fisiopatológicos. Assim, recentemente demonstrou-se que o perfil destas enzimas varia durante o reparo e em função do tipo de material implantado¹⁴.

No presente estudo verificou-se um infiltrado inflamatório, inicialmente agudo com predomínio de

neutrófilos e, em seguida, crônico com predomínio de macrófagos e CGMIs. Esse último quadro manteve-se relativamente constante durante 14 – 30 dias após a implantação. Salientamos que foi nesta mesma fase que foi verificado os níveis mais elevados da atividade das fosfatases ácidas, em particular da PTP, que correspondeu neste período a cerca de 70% da atividade da fosfatase ácida total, seguida da fosfatase ácida lisossomal. Como a PTP está relacionada ao controle negativo do ciclo celular^{10,15}, é evidente a correlação entre a manutenção do quadro inflamatório e a elevada atividade destas fosfatases. Nesse sentido, salientamos que Oliveira et al.¹⁵ (2003) demonstraram que a atividade PTP diminui significativamente com o aumento da proliferação fibroblástica e angioblástica. Nossos resultados aqui apresentados mostraram que estes últimos parâmetros permaneceram de grau moderado a leve durante praticamente todo o período experimental, paralelamente à elevada atividade PTP, sendo diferentes dos achados de Oliveira et al.¹⁵ (2003).

Estudos relataram que a matriz óssea desmineralizada atua como osteoindutora^{8,16,18,22}. Esta osteoindução é devido à presença das proteínas morfogenéticas do osso (BMPs), no seu interior. Estas proteínas tem a capacidade de induzir células mesenquimais

indiferenciadas a se diferenciarem em condroblastos e osteoblastos, estimulando a neovascularização e a osteogênese. No entanto, no atual trabalho, em nenhum dos períodos foi observada a ocorrência de ossificação heterotópica, relatada por outros pesquisadores²¹. Ao contrário foi verificado um processo inflamatório crônico no tecido muscular durante todos os períodos estudados.

Uma possível explicação para a não formação óssea poderia ser a não desmineralização completa da matriz óssea durante o processo de produção do biomaterial, com presença de fosfato de cálcio que inibiria essa capacidade indutiva. Nesse sentido, salientamos que CGMIs, ricas em ácidos orgânicos, presumivelmente para dissolução mineral no sítio de implantação da matriz mineralizada foram observadas por Reddi & Huggins¹⁸ (1972), que propuseram que a presença de matriz mineralizada, sozinha ou em combinação com matriz desmineralizada, inibiria a osteogênese ectópica. Entretanto, a natureza das CGMIs recrutadas nos enxertos subcutâneos de partículas mineralizadas, ainda é motivo de controvérsia na literatura. Kelly & Schneider¹² (1991) implantando matriz óssea desmineralizada, mineralizada e a combinação de ambas, na região subcutânea dorsal de ratos adultos jovens, verificaram nos implantes mineralizados a presença de CGMIs que não possuíam atividade fosfatase tartarato resistente (TRAP), nem morfologia similar à dos osteoclastos e nos implantes de matriz desmineralizada, demonstraram na maioria das CGMIs uma expressão significativa da TRAP e morfologia similar à de osteoclastos. A implantação combinada dos materiais proporcionou a presença desses dois tipos de CGMIs. Como nos nossos resultados a atividade da TRAP foi extremamente baixa, isto reforça a hipótese de que traços de mineral estavam presentes no material de enxerto utilizado em nosso estudo. Chamamos a atenção que a ausência de formação heterotópica de

osso é corroborada pela baixa atividade da fosfatase alcalina, a despeito do pico de atividade no período de trinta dias.

Killey et al.¹³ (1970) analisaram a resposta celular ao osso bovino misto, isto é, contendo tanto a porção mineral como a orgânica, denominado de Kiel bone (B. Braun, Melsungem, Germany) implantado na calvária de coelhos. Observaram que o aparecimento de células gigantes e a absorção do material estavam associados ao infiltrado de linfócitos e plasmócitos, sugerindo reação antígeno-anticorpo, a qual é dependente da espécie receptora do implante e o sítio de implantação. A presença de infiltrado inflamatório crônico linfo-plasmocitário ao redor do enxerto xenogênico aqui testado sugere que seria mais um fator atuando na inibição da osteoindução.

CONCLUSÃO

Concluimos que a mensuração da atividade de fosfatases é uma ferramenta interessante para a compreensão dos fenômenos envolvidos na resposta celular a implantes de materiais ósseos em tecido conjuntivo e que as suas atividades específicas aqui avaliadas refletem variações celulares nas diferentes fases do reparo tecidual, eficientes em demonstrar a manutenção do processo inflamatório em detrimento da proliferação celular e ausência de formação óssea. Em particular, a reabsorção do material ocorreu com a presença de baixa atividade TRAP, sugerindo que outras enzimas, como as metaloproteinases de matriz sejam mais relevantes para esse processo. A matriz óssea bovina aqui pesquisada não mostrou potencial de osteoindução, como relatado na literatura, possivelmente pela desmineralização incompleta do material durante a sua produção que preservou fatores inibitórios, como sais de cálcio e alguns radicais antigênicos.

ABSTRACT

In this study, the acid phosphatase specific activities (SA) were analyzed in relation to histological events during the reactional tissue to subcutaneous implantation of demineralized bovine bone matrix. The graft was implanted in subcutaneous site of fifty Wistar rats which were sacrificed after 7, 14, 21, 30 and 67 days. The biopsies were fixed in 10% buffered formalin. The histological cuts, 6 µm thickness, were stained with haematoxylin and eosin. The acid phosphatase SA was determined using p-nitrophenylphosphate as substrate in acetate buffer, pH 5.0, and specific inhibitors. p-Nitrophenylphosphate was used for alkaline phosphatase with glycine buffer, pH 9.2, containing CaCl₂. The histological analysis showed chronic inflammatory cells with giant cells, mainly plasma cell and macrophages. The graft resorption was observed throughout the experimental periods but was not observed after 67 days. Heterotopic bone formation was neither observed. Acid phosphatase activity was highest and constant between 7 and 30 days, about 30 nmol min⁻¹ mg⁻¹, decreasing to 6.9 nmol min⁻¹ mg⁻¹, while alkaline phosphatase activity was low, with maximum value of 6.0 nmol min⁻¹ mg⁻¹ on day 30. The activities of PTP, FAL e TRAP were equivalent to 70, 25 and 10 per cent of total acid phosphatase activity. We conclude that demineralized bovine bone matrix induced did not induced heterotopic osteogenesis and the acid and alkaline phosphatase have played role in tissue response being modulated by time.

UNITERMS

Phosphoric monoeste hydroloses; animal; rats; bone transplantations; tyrosine; bovine bone matrix.

AGRADECIMENTOS: Os autores agradecem aos servidores Ovídio dos Santos Sobrinho, Daniele Santi Ceolin, Luiz Carlos da Silva e Erasmo Gonçalves da Silva pelo trabalho técnico e a CNPq, PIBIC, PRP-USP, pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- Aoyama H, Silva TMA, Miranda MA, Ferreira CV. Proteínas tirosina fosfatases: propriedades e funções biológicas. *Quim Nova*. 2003, 26 (6): 896-900.
- Bassetto AP, Neves FTA, Toledo SF, Silva TL, Buzalaf MAR, Faria FAC, et al. Effect of cigarette smoke on sublingual salivary gland and liver phosphotyrosine protein phosphatase and acid phosphatase activities. *Rev Fac Odontol Bauru*. 2001, 9 (1-2): 49-54.
- Bolger JT. Heterotopic bone formation and alkaline phosphatase. *Arch Phys Med Rehabil*. 1975, 56 (1): 36-9.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May; 7 (72): 248-54.
- Bull H, Murray PG, Thomas D, Fraser AM, Nelson PN. Acid phosphatases. *Mol Pathol*. 2002 Apr; 55 (2): 65-72.
- Burg KJ, Porter S, Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2000 Dec; 21 (23): 2347-59.
- Concannon MJ, Boschert MT, Puckett CL. Bone induction using demineralized bone in the rabbit femur: a long-term study. *Plast Reconstr Surg* 1997 Jun; 99 (7): 1983-8.
- Damien CJ, Parsons JR., Prewett AB, Huisman F, Shors EC, Holmes RE. Effect of demineralized bone matrix on bone growth within a porous HA material: a histologic and histometric study. *J Biomater Appl*. 1995 Jan; 9 (3): 275-88.
- Granjeiro JM, Taga EM, Aoyama H. Purification and characterization of a low-molecular-weight bovine kidney acid phosphatase. *An Acad Bras Cienc*. 1997; 69 (4): 451-60.
- Granjeiro JM, Ferreira CV, Granjeiro PA, Silva CC, Taga EM, Volpe PL, et al. Inhibition of bovine kidney low molecular mass phosphotyrosine protein phosphatase by uric acid. *J Enz. Inhib Med Chem*. 2002 Oct; 17 (5): 345-50.
- Hunt DR, Jovanovic SA. Autogenous bone harvesting: a chin graft technique for particulate and monocortical bone blocks. *Int J Period Restor Dent*. 1999 Apr; 19 (2): 165-73.
- Kelly JD, Schneider GB. Morphological and histochemical comparison of cells elicited by ectopic bone implants and tibial osteoclasts. *Am J Anat*. 1991 Sept; 192 (1): 45-54.
- Killey HC, Kramer IR, Wright HC. The response of the rabbit to implants of processed bovine bone (Kiel bone) and the effects of varying the relationship between implant and host bone. *Archs Oral Biol*. 1970 Jan; 15 (1): 33-45.
- Lutolf MP, Weber FE, Schmoekel HG, Schense JC, Kohler T, Muller R, et al. Repair of bone defects using synthetic mimetics of collagenous extracellular matrices. *Nat Biotechnol*. 2003 May; 21 (5): 513-8.
- Oliveira RC, Sicca CM, Silva TL, Cestari TM, Kina JR, Oliveira, D.T., et al. Avaliação histológica e bioquímica da resposta celular ao enxerto de osso cortical bovino previamente submetido a altas temperaturas. Efeito da temperatura no preparo de enxerto xenógeno. *Rev Bras Ortop*. 2003 set; 38 (9): 551-60.

16. Pettis GY, Kaban LB, Glowacki J. Tissue response to composite ceramic hydroxyapatite/demineralized bone implants. *J Oral Maxillofac Surg.* 1990 Oct; 48 (10): 1068-74.
17. Ramponi G, Stefani M. Structure and function of the low Mr phosphotyrosine protein phosphatases. *Biochim Biophys Acta.* 1997 Sep; 1341(2):137-56.
18. Reddi AH, Huggins C. Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1972 June; 69 (6):1601-5.
19. Sanchez Rodriguez J, Soriano Suarez E, Girona Bastus R, Perez Munoz P, Vinets Gelada C. Why do alkaline phosphatases increase? *Aten Primaria.* 2002 Mar; 29 (4): 241-5.
20. Taga, E. M. Biomateriais para uso em clínica médico – odontológica. *Rev Bras Cir Implant.* 1996; 3 (1): 59-69.
21. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science.* 1965 Nov; 150 (698):893-9.
22. Urist MR, Strates ES. Bone formation in implants of partially and wholly demineralized bone matrix. Including observations on acetone-fixed intra and extracellular proteins. *Clin Orthop Rel Res.* 1970; 71: 271-8.

Recebido em: 23/11/04

Aprovado em: 02/05/05

Prof. Dr. José Mauro Granjeiro
Depto de Ciências Biológicas
Faculdade de Odontologia
Av. Octávio P Brisolla, 9-75

Aeroporto-

CEP: 17.012-901 – Bauru-SP.

jmgranjeiro@vm.uff.br

Fone(14) 3235-8246/ FAX(14) 3226-2076