Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

JÉSSICA SUZUKI YAMANAKA

**Aplicação da membrana de colágeno proveniente de pericárdio
bovino na regeneração óssea guiada de tíbias de ratos**

RIBEIRÃO PRETO

2020

JÉSSICA SUZUKI YAMANAKA

**Aplicação da membrana de colágeno proveniente de pericárdio
bovino na regeneração óssea guiada de tíbias de ratos**

Versão corrigida

A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP

Tese apresentada a Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutora em Ciências.
Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Shimano
Coorientador: Prof. Dr. Vitor Manuel Correlo

RIBEIRÃO PRETO

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Yamanaka, Jéssica Suzuki

Aplicação da membrana de colágeno proveniente de pericárdio bovino na regeneração óssea guiada de tíbias de ratos.

122 p.: il.

Tese de Doutorado – Programa de Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Orientador Antonio Carlos Shimano, 2020.

Versão corrigida

1. Osso. 2. Regeneração óssea. 3. Colágeno. 4. Pericárdio. 5. Biomaterial.

Nome: YAMANAKA, Jéssica Suzuki

Título: Aplicação da membrana de colágeno proveniente de pericárdio bovino na regeneração óssea guiada de tíbias de ratos

Tese apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Dedicatória

*A todos pesquisadores que colaboraram
para minha formação!*

*“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre
ombros de gigantes” - Isaac Newton*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. José Batista Volpon por permitir acesso ao Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP).

Ao Prof. Dr. Rui Reis por permitir o acesso ao Laboratório do Grupo de Pesquisa 3B's (Biomateriais, Biodegradáveis e Biomiméticos) do Departamento de Polímeros da Universidade do Minho – Portugal.

Ao Laboratório de Pesquisa em Reabilitação Oral do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP) da USP e a responsável Prof^a Dra. Cláudia Helena Lovato da Silva.

Ao Laboratório de Metrologia e ao Laboratório de Pesquisa em Fundição Odontológica do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da FORP/USP e a responsável Prof^a Dra. Valéria Oliveira Pagnano de Souza.

Ao Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da FORP/USP e ao responsável Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa.

Ao Laboratório de Biologia Molecular e de Cultura de Células do Departamento de Clínica Infantil da FORP/USP e a responsável Prof^a. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato.

Ao Laboratório de Proteínas e Histologia do Departamento de Biologia Básica e Oral da FORP/USP e a responsável Prof^a. Dra. Raquel Fernanda Gerlach.

Ao Laboratório de Pesquisa Morfológica do Departamento de Biologia Básica e Oral da FORP/USP e ao responsável Prof. Dr. João Paulo Mardegan Issa.

Ao Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP/USP e ao Prof. Dr. Luís Fernando Tirapelli.

Ao Auxílio Regular da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo nº 2017/20051-0.

Ao Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

O presente trabalho foi realizado com apoio da CAPES – Brasil - Código de Financiamento 001.

Agradecimentos especiais

Ao meu orientador Prof. Dr. Antonio Carlos Shimano, por nos orientar, além da vida acadêmica, nos mais diversos aspectos da vida e ser exemplo de profissional e de pessoa.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Vitor M. Correlo, pela colaboração e todos os ensinamentos.

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação Prof. Dr. Marcello Henrique Nogueira-Barbosa e a secretária da Pós-Graduação Rita de Cássia Stela Cossalter pela cordialidade e competência.

Aos funcionários do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Francisco Carlos Mazzocato, Maria Teresinha de Moraes e Ismar Ribeiro por toda colaboração e pelo convívio agradável.

As técnicas de Laboratório da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto Nilza Letícia Magalhães e Viviane de Cássia Oliveira e as especialistas de laboratório Junia Ramos e Fabíola Singaretti de Oliveira pelo profissionalismo e assistência, e pela imensa contribuição com todos os ensinamentos.

A Dra. Ana Paula Macedo, pela qual tenho enorme carinho, pela amizade e amparo no progresso da pesquisa.

As amigas Ana Clara de Oliveira e Bruna Leonel Carlos por toda colaboração, pela amizade e pela partilha de inúmeras risadas, por tornar as dificuldades ocasionais menos pesadas.

Aos colegas da pós-graduação Aline de Azevedo, Carla Teresa Barbosa de Oliveira, Leonardo Rigobello Battaglion, Marcela Britto de Paiva e Roberta Carminati Shimano pela colaboração e por todos os momentos que compartilhamos.

Aos colegas Amanda Soler Elias, Beatriz Kawano de Oliveira, Caroline Figueiredo Pettarelli, Larissa Rosa de Oliveira e Márcio Koiti Saito por contribuírem para o meu crescimento acadêmico, pela confiança e laços de amizade.

Ao Prof. Dr. Álvaro César de Oliveira Penoni por ter me incentivado e colaborado para que eu iniciasse meu percurso acadêmico.

Aos colegas Ana Raquel Bastos, Pedro Babo, Raphael Canadas e Emanuel Fernandes por me acolherem e auxiliarem durante o Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior.

Aos amigos Débora Alves Amorim, Fander Oliveira, Izabela Alves e Michaelle Renata Moraes de Santana pelo companheirismo e apoio durante o período longe de casa, pelos momentos de diversão e inesquecíveis aventuras.

As amigas Fernanda Gonçalves Mistrin, Indiara Vieira Santana e Kelly Astolpho por serem minhas companheiras durante todo meu percurso.

Aos meus familiares, minha mãe Eunice Raimunda da Silva, meu pai Nelson Hidechi Yamanaka, minhas irmãs Karina Suzuki Yamanaka e Soraya Suzuki Yamanaka, e minha afilhada Ana Lívia Costa por serem alicerces da minha formação, pelo apoio, por todo amor e tudo que representam em minha vida.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

*“Viver é como andar de bicicleta:
É preciso estar em constante
movimento para manter o equilíbrio”*

Albert Einstein

RESUMO

YAMANAKA, J. S. Aplicação da membrana de colágeno proveniente de pericárdio bovino na regeneração óssea guiada de tíbias de ratos. 2020. 122 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

O tratamento de falhas no processo de regeneração óssea vem sendo constantemente aprimorado com estudo de técnicas como a regeneração óssea guiada. O Techgraft® é uma membrana a base de colágeno proveniente de pericárdio bovino produzido pela empresa Baumer® SA. Essa membrana tem comprovada biocompatibilidade e funcionalidade no reparo tecidual, no entanto, ainda não foi avaliada para uso na prática ortopédica. Portanto, a proposta do presente estudo foi caracterizar a membrana de colágeno proveniente de pericárdio bovino e avaliar os efeitos do seu uso na regeneração de defeito ósseo em tíbia de rato. Foram realizados microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica, teste de perda de peso e absorção de água, e ensaio mecânico para caracterização das membranas. Para o estudo experimental foram utilizados oitenta ratos *Sprague Dawley*. Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para criação do defeito ósseo bilateral na região proximal da tíbia. Os animais foram então distribuídos em 4 grupos (n=20) de acordo com o tratamento proposto: grupo defeito ósseo tratado com enxerto autólogo (EA), grupo defeito ósseo tratado com membrana de colágeno (TG), grupo defeito ósseo tratado com membrana de colágeno e enxerto autólogo (TG+EA), grupo defeito ósseo sem tratamento (CONT). Os grupos foram subdivididos em dois subgrupos (n=10) de acordo com o tempo experimental (21 e 42 dias). As tíbias foram avaliadas por densitometria, micro-ct, ensaio mecânico, histologia e qPCR. As membranas apresentaram preservação das características do colágeno natural, boa resistência mecânica, alta absorção de água e hidrofiliidade, com dissolução quase completa até 30 dias. Os ossos do grupo tratado com membrana apresentaram maior volume de osso neoformado do que o grupo controle aos 21 dias, mas teve menor densidade mineral óssea (DMO), volume ósseo e rigidez do que os demais grupos tratados. No entanto tiveram alta expressão de OC, OPG, RANKL e MMP-9. Quando

associada ao enxerto o uso da membrana foi mais promissor com maior volume ósseo em comparação ao grupo CONT em 21 e 42 dias, maior DMO e maior deslocamento e absorção de energia comparado ao grupo controle aos 42 dias. As análises histológicas não apresentaram diferença significativa, mas foi possível observar características de um osso mais imaturo no grupo CONT comparado aos grupos tratados. Com os resultados concluímos que a membrana apresentou características favoráveis para o uso em regeneração óssea guiada. Ainda, o tratamento de defeitos com membrana foi mais promissor quando associada ao enxerto. A associação com outros tipos de enxerto deve ser avaliada, além do mais a aplicação da membrana restrita ao local do defeito e em proximidade ao orifício pode surtir melhores efeitos.

Palavras-chave: Osso; regeneração óssea; colágeno; pericárdio; biomaterial.

ABSTRACT

YAMANAKA, J. S. *Application of collagen membrane from bovine pericardium in guided bone regeneration on rat tibiae*. 2020. 122 p. Thesis (PhD degree) – Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 2020.

The treatment of failures in the process of bone regeneration has been constantly improved with study of techniques such as guided bone regeneration. Techgraft® is a membrane of collagen derived from bovine pericardium produced by Baumer® SA. It has evidence of its biocompatibility and functionality in tissue repair. However, it has not yet been evaluated for use in orthopedic practice. Therefore, the purpose of this study was to characterize the membranes of collagen derived from bovine pericardium and to evaluate its effects in regeneration of bone defect in rat tibia. Scanning microscopy electronic, atomic force microscopy, weight lost and water uptake test and mechanical test were performed to membrane characterization. For experimental study eighty male Sprague Dawley rats were used. The animals were submitted to surgical procedure to create a bone defect in proximal region of tibia bilaterally. Thus, animals were assigned into four groups: bone defect treated with autograft (EA), bone defect treated with collagen membrane (TG), bone defect treated with collagen membrane and autograft (TG+EA) and bone defect without intervention (CONT). Groups were subdivided in two subgroups (n=10) according experimental time (21 and 42 days). Tibiae were evaluated by densitometry, micro-ct, mechanical test, histology and qPCR. The membranes preserving natural collagen characteristics and presented great strength, high water absorption and hydrophilicity, with almost complete dissolution until 30 days. Bone from groups treated with membrane showed high bone volume than control group at 21 days, but had lower bone mineral density (BMD), bone volume and stiffness than other treated groups. However high expression of OC, OPG, RANKL and MMP-9 were found. The results of the use with membrane in association with autograft were better, presenting higher bone volume at micro-ct in comparison to control group at 21 and 42 days, higher BMD and higher dislocation and energy absorption than control group at 42 days. The histologic results showed no significative difference, but was observed more immature bone in control group than other treated

groups. With these results we concluded which the membrane had favorable characteristics for guided bone regeneration. Moreover, the treatment of defects with membrane was more effective when associated to autograft. The association with other grafts types need to be evaluated. Furthermore, membrane application restricted on bone defect local and in proximity to orifice could has better effects.

Keywords: *Bone; bone regeneration; collagen; pericardium; biomaterial.*

Lista de figuras

Figura 1: Membrana de colágeno Techgraft® nas dimensões de 10x10 mm.	49
Figura 2: Desenho esquemático da membrana de colágeno fixada no suporte plástico para a realização do ensaio mecânico.	52
Figura 3: A) Membrana de colágeno posicionada na máquina de ensaios. B) Membrana sendo submetida ao teste de tração.	52
Figura 4: A) Local a ser feita a incisão na pele e musculatura, aproximadamente 1 cm abaixo da articulação do joelho. B) Exposição da face medial da tíbia com auxílio de 2 afastadores para perfuração com a broca trefina sob irrigação de solução fisiológica. C) Defeito ósseo de 2,9 mm de diâmetro realizado na região proximal da tíbia.	54
Figura 5: A) Fragmento retirado do defeito ósseo. B) Fragmento triturado.	55
Figura 6: Membrana de colágeno Techgraft® nas dimensões de 5x10 mm.	55
Figura 7: Imagem radiográfica destacando o comprimento da tíbia (C1) e a posição do defeito (P1). E ao lado direito, imagem da tíbia no densitômetro destacando o comprimento da tíbia (c2) e a posição do defeito (p2), na qual foi posicionada o ROI de acordo com o cálculo.	58
Figura 8: A) Alinhamento da tíbia no programa Data Viewer no plano transversal e sagital. B) Delimitação do volume de interesse no programa CTAn. C) Posicionamento da ROI sobre o defeito; em vermelho ROI total e em azul claro ROI interno.	59
Figura 9: Posicionamento da tíbia para realização do ensaio mecânico.	60
Figura 10: Análise histomorfométrica da região do defeito. A) Delimitação da ROI, correspondente a área total do defeito. B) Identificação das áreas correspondente a osso apresentadas em coloração azul. C) Quantificação da área demarcada, excluindo-se a área externa ao ROI. (Tricrômio de masson, aumento de 50 X).	61
Figura 11: Análise de densitometria óptica das fibras de colágeno no defeito. A) Delimitação da ROI, correspondente a área total do defeito. B) Demarcação das áreas correspondentes a colágeno tipo 1, coloridas de vermelho e amarelo. C) Demarcação das áreas correspondentes a colágeno tipo 3, coloridas em verde. (Picrosirius, aumento de 50 X).	62
Figura 12: Imagem exemplificando os cortes na tíbia para isolamento da região do defeito. A) Dois cortes transversais. B) Um corte longitudinal.	63

Figura 13 Fotomicrografias da superfície da membrana de colágeno em condição seca (A); após 1 dia de imersão em líquido (B); 3 dias (C); 7 dias (D); 14 dias (E) e 30 dias (F). Aumento de 1000 X.	69
Figura 14: Topografia da membrana de colágeno em uma vista plana (A) e tridimensional (B).	70
Figura 15: Fotos das membranas ao final dos testes de absorção de água e de perda de peso nos tempos de 1, 3, 7, 14 e 30 dias.	71
Figura 16: Gráficos da absorção de água das membranas nas primeiras 8 horas e a partir do final do primeiro dia ao trigésimo. Gráfico da perda de peso das membranas ao longo dos 30 dias. Gráfico do pH do líquido residual ao longo dos 30 dias.	72
Figura 17: Fotomicrografias da seção transversal da membrana após ruptura em 100 e 1000 X, com sinais de grande deformação das fibras.	73
Figura 18: Aspecto do defeito ósseo a olho nu e na imagem radiográfica nos tempos de 21 e 42 dias.	74
Figura 19: Gráficos do peso e comprimento das tíbias dos grupos no período de 21 e 42 dias. O círculo preto (•) representa um outlier.	74
Figura 20: Gráficos do conteúdo mineral ósseo (CMO) e da densidade mineral óssea (DMO) das tíbias dos grupos nos períodos de 21 dias e 42 dias. • outlier.	75
Figura 21: Cortes transversais das tíbias exibindo o progresso de reparo do defeito ósseo dos grupos nos tempos de 21 e 42 dias. No canto direito a exemplificação das regiões avaliadas.	76
Figura 22: Região isolada do defeito ósseo mostrando o aspecto do osso formado nos grupos nos tempos de 21 e 42 dias.	77
Figura 23: Gráfico da razão de volume ósseo em relação ao volume total (BV/TV) dos defeitos dos grupos no período de 21 e 42 dias.	79
Figura 24: Gráficos da espessura trabecular (Tb.th), do número de trabéculas (Tb.N) e da separação trabecular (Tb.sp) dos grupos nos períodos de 21 e 42 dias.	80
Figura 25: Gráficos das propriedades mecânicas de força máxima, rigidez, deslocamento e energia das tíbias dos diferentes grupos nos tempos de 21 e 42 dias. • outlier.	81
Figura 26: Gráfico de dispersão da correlação da DMO com a força máxima e com a rigidez relativa.	82
Figura 27: Fotomicrografias do defeito ósseo das tíbias dos grupos experimentais nos tempos de 21 dias e 42 dias. A região em azul representa a área de osso. Ob:	

osteoblastos; Oc osteócitos; Tb trabéculas; Seta vermelha Ob sendo englobado pela matriz; Seta laranja matriz de coloração irregular. Masson, aumento de 100 X (figuras lado esquerdo) e 400 X (figuras do lado direito).	83
Figura 28: Gráfico da área de osso em relação a área total do defeito (B.Ar/T.Ar) nos grupos nos períodos de 21 e 42 dias.	84
Figura 29: Gráfico do número de osteócitos na borda e no centro do defeito dos diferentes grupos nos períodos de 21 e 42 dias.	84
Figura 30: Fotomicrografias do colágeno sob luz polarizada na região do defeito ósseo das tíbias dos grupos experimentais com 21 dias e 42 dias. A região em amarelo, vermelho e verde representa as fibras colágenas. Picrosirius red, aumento de 100 X.	85
Figura 31: Gráfico do percentual da área de colágeno em relação a área total do defeito (Col.Ar/Tt.Ar).	86
Figura 32: Gráficos da curva de eficiência dos iniciadores correspondentes aos genes osteocalcina (OC), metaloproteinase 9 (MMP-9), osteoprotegerina (OPG) e receptor ativador do fator nuclear ligante (RANKL) e gliceraldeído-3-fosfato deidrogenase (GAPDH).	87
Figura 33: A figura apresenta o gel de agarose com RNA das amostras.	87
Figura 34: Teste de integridade do RNA para as amostras obtidas dos defeitos das tíbias dos grupos experimentais nos tempos de 21 dias e 42 dias.	88
Figura 35: Gráficos da integridade do RNA e da expressão relativa dos genes osteocalcina (OC), metaloproteinase 9 (MMP-9), osteoprotegerina (OPG), receptor ativador do fator nuclear ligante (RANKL) e razão OPG/RANKL dos grupos no período de 21 dias.	89
Figura 36: Gráficos da integridade do RNA e da expressão relativa dos genes osteocalcina (OC), metaloproteinase 9 (MMP-9), osteoprotegerina (OPG), receptor ativador do fator nuclear ligante (RANKL) e razão OPG/RANKL dos grupos no período de 42 dias.	90

Lista de tabelas

Tabela 1: Propriedades mecânicas das membranas ao teste de tração, apresentados em média (desvio padrão).....	73
Tabela 2: Comparação intragrupo do conteúdo mineral ósseo (CMO) e da densidade mineral óssea (DMO) entre os tempos 21 e 42 dias nos grupos apresentados em média (desvio padrão).	76

Lista de Quadros

Quadro 1: Sequência dos pares de iniciadores utilizados no experimento.	65
---	----

Lista de Equações

(Equação 1)	50
(Equação 2)	51
(Equação 3)	57

Lista de siglas

3B's	Biodegradáveis, Bioabsorvíveis e Biomiméticos
AFM	Microscopia de força atômica
ALP	Fosfatase alcalina
B.Ar/Tt.Ar	Razão da área de osso pela área total do defeito
BV/TV	Razão de volume de osso pelo volume total
C1	Comprimento da tíbia na imagem radiográfica
c2	Posição do defeito na imagem escaneada pelo densitômetro
Ca	Cálcio
CMO	Conteúdo mineral ósseo
Col.Ar/Tt.Ar	Razão da área de colágeno pela área total do defeito
CONT	Grupo controle
Ct	Threshold cycle
DMO	Densidade mineral óssea
DEPC	Dietil pirocarbonatolivre
EA	Grupo tratado com enxerto autólogo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FORP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato deidrogenase
IGF-1	Fator de crescimento de insulina-1
IL-1	Interleucina-1
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
micro-ct	Microtomografia computadorizada
MMP	Metaloproteinase da matriz
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
Na	Sódio
OC	Osteocalcina
OPG	Osteoprotegerina
P1	Posição do defeito na imagem radiográfica
p2	Posição do defeito na imagem escaneada pelo densitômetro

PBS	Solução de tampão de fosfato salina
pf	Peso final
pH	Potencial hidrogeniônico
pi	Peso inicial
PTFE	Politetrafluoretileno
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
RANK	Receptor ativador do fator nuclear kappa-beta
RANKL	Receptor ativador do fator nuclear kappa-beta ligante
RMS	Raiz quadrada média
RNA	Ácido ribonucleico
ROG	Regeneração óssea guiada
ROI	Região de interesse do objeto
Tb.N	Número de trabéculas
Tb.Sp	Separação trabecular
Tb.Th	Espessura trabecular
TG	Grupo tratado com membrana de colágeno
TG+EA	Grupo tratado com membrana de colágeno e enxerto autólogo
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UM	Universidade do Minho
USP	Universidade de São Paulo
WI	Perda de peso (<i>weight loss</i>)
Wu	Absorção de água (<i>water uptake</i>)

Lista de símbolos

%	porcentagem
<	menor
=	igual
>	maior
cm	centímetro
cm ²	centímetro quadrado
d	dias
g	gramas
GPa	gigapascal
h	horas
k	quilo
kcal	quilocaloria
kg	quilograma
kN	quiloNewton
kV	quilovolt
m	metro
M	massa molar
mA	miliampere
mg	miligrama
MPa	megapascal
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mm ²	milímetro quadrado
N	Newton
ng	nanograma
nm	nanômetro
rpm	rotações por minuto
s	segundo
nº	número

°C	grau Celsius
α	alfa
Δ	delta
μg	micrograma
μL	microlitro
μm	micrometro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	35
1.1. Regeneração óssea.....	35
1.2. Regeneração óssea guiada	37
1.2.1. Biomateriais	38
1.2.2. Membrana de colágeno aniônico	39
1.3. Enxerto.....	40
1.4. Métodos investigativos.....	41
2. OBJETIVOS.....	45
2.1. Objetivo geral	45
2.2. Objetivos específicos.....	45
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
3.1. Caracterização da membrana.....	49
3.1.1. Membrana de colágeno	49
3.1.2. Microscopia de Força Atômica	49
3.1.3. Microscopia eletrônica de varredura	50
3.1.4. Testes de absorção de água.....	50
3.1.5. Teste de perda de peso	51
3.1.6. Ensaio mecânico.....	51
3.2. Estudo experimental	53
3.2.1. Defeito ósseo	53
3.2.2. Tratamentos.....	55
3.2.3. Grupos experimentais	56
3.2.4. Eutanásia e preparo dos materiais para análises.....	56
3.2.5. Análise macroscópica dos ossos	56
3.2.6. Radiografia	57
3.2.7. Densitometria.....	57
3.2.8. Microtomografia computadorizada	58

3.2.9. Ensaio mecânico	59
3.2.10. Histologia	60
3.2.11. qPCR	63
3.3. Análise estatística	66
4. RESULTADOS	69
4.1. Caracterização da membrana	69
4.1.1. Microscopia eletrônica de varredura.....	69
4.1.2. Microscopia de força atômica	70
4.1.3. Absorção de água e perda de peso das membranas	70
4.1.4. Resistência mecânica	72
4.2. Análise experimental	73
4.2.1. Análise macroscópica dos ossos.....	74
4.2.2. Densitometria	75
4.2.3. Microtomografia computadorizada	76
4.2.4. Ensaio mecânico	80
4.2.5. Histologia	82
4.2.6. qPCR	86
5. DISCUSSÃO	93
6. CONCLUSÕES.....	109
REFERÊNCIAS	113

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O osso é o único tipo especializado de tecido conjuntivo capaz de se regenerar perfeitamente em sua forma original, sem a formação de uma cicatriz, após uma lesão (MCKIBBIN, 1978). No entanto, há casos em que o processo regenerativo é comprometido. O retardo da regeneração óssea pode desencadear deficiências, incapacidades e problemas socioeconômicos (HAK et al., 2014). Portanto, estratégias de normalizar e acelerar o processo de regeneração óssea são amplamente investigados, a fim da garantia de uma boa restauração funcional e estrutural do osso, melhorando assim a qualidade de vida dos indivíduos afetados e reduzindo o custo com os tratamentos de saúde.

1.1. Regeneração óssea

A regeneração óssea é um processo que visa restabelecer a integridade biomecânica do osso após a ocorrência de uma lesão. É um processo complexo que apresenta uma sequência de eventos, que abrangem o processo inflamatório, proliferação de células osteoprogenitoras, formação de tecido cartilaginoso, mineralização e remodelação (GHIASI et al., 2017; LEI et al., 2015).

O processo natural de reparo de ossos longos envolve ossificação intramembranosa e ossificação endocondral. Logo após a ocorrência da lesão inicia-se o processo inflamatório. Nessa fase são recrutadas células inflamatórias e osteoprogenitoras no local da lesão e ocorre a formação de um hematoma. No foco da fratura é formado tecido cartilaginoso, estruturando um calo mole que confere estabilidade relativa aos fragmentos. Em seguida, os condrócitos se hipertrofiam e sofrem apoptose, deixando uma matriz extracelular mineralizada. Há grande proliferação de vasos novos e osso novo é depositado em substituição aos condrócitos. Finalmente, o osso é remodelado adquirindo sua forma inicial (EINHORN; GERSTENFELD, 2015).

O processo de regeneração óssea depende da congruência de diversos fatores. As moléculas sinalizadoras, os fatores de crescimento, as células osteoprogenitoras e a matriz extracelular são indispensáveis para o desfecho da

regeneração óssea. Agregados a esses fatores ainda estão a vascularização, a estabilidade mecânica e fatores individuais do paciente, tais como, idade, nutrição e doenças associadas (CALORI; GIANNOUDIS, 2011).

Em todo esse processo a matriz extracelular funciona não somente como um arcabouço, mas também como estímulo biofísico e bioquímico, sinalização molecular e organização espacial (ABOU NEEL et al., 2013). Enquanto que o estímulo mecânico adequado tem alta influência na restauração do osso controlando a estabilidade, fluxo de fluidos e remodelação (ELLIOTT et al., 2016).

A angiogênese é outro fator marcante no reparo da fratura. Por meio dos novos vasos permeiam fatores de crescimento, células e nutrientes indispensáveis para o sucesso da consolidação (LOI et al., 2016). A angiogênese e a degradação da matriz são mecanismos correlacionados na fase final da ossificação endocondral. Isso porque, a degradação da matriz, fortemente influenciada pelos mecanismos moleculares, como por exemplo a atividade das metaloproteinases (MMPs), é seguida pela permeação de vasos no tecido (GHANBARI; VAKILI-GHARTAVOL, 2016; GHIASI et al., 2017).

As MMPs são classificadas de acordo com sua localização, estrutura e solubilidade, sendo divididas em 6 grupos: collagenases, gelatinases, estromelinas, matrilisinas, metaloproteinases tipo membrana e outras. A MMP-9 é uma gelatinase que degrada colágeno desnaturado, sua deficiência causa má formação e mau desenvolvimento de ossos longos (PAIVA; GRANJEIRO, 2014).

Nos diferentes períodos da remodelação há a atuação de moléculas sinalizadoras. Na fase inicial é marcante a presença de proteínas relacionadas ao processo inflamatório, como a interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que são importantes para o recrutamento e ativação de células como os fibroblastos, células tronco mesenquimais e células osteoprogenitoras (LOI et al., 2016). As células inflamatórias tem seu pico de expressão após 24 horas da lesão, mas voltam a aparecer na fase final com função de estimular proteases na degradação do tecido e ativação de osteoclastos, além de participar da apoptose dos condrócitos (GHANBARI; VAKILI-GHARTAVOL, 2016).

Os osteoblastos são células originadas de células mesenquimais, responsáveis por depositar matriz óssea que posteriormente é mineralizada. A mineralização ocorre com a deposição de cálcio e fósforo na matriz orgânica. A

osteocalcina (OC) é uma citocina expressa em osteoblastos em diferentes fases, mas principalmente durante a maturação, também está relacionada a regulação da mineralização da matriz óssea. Os osteoclastos são células originadas de células hematopoiéticas, cuja principal função é a reabsorção óssea, que visa a renovação do tecido ósseo ao longo da vida, bem como a formação de tecido em reparo. A atividade dos osteoclastos depende do receptor ativador do fator nuclear kappa-B (RANK), um receptor para o RANK ligante (RANKL), presente na superfície de células precursoras de osteoclastos. Quando RANK e RANKL se ligam ocorre a indução da diferenciação e ativação de osteoclastos por meio do desencadeamento de uma sequência de eventos intracelulares (STEEVE et al., 2004). A osteoprotegerina (OPG) por sua vez é uma citocina conhecida por inibir a ação dos osteoclastos. A OPG também tem afinidade pelo receptor RANK e liga-se a ele inibindo os efeitos do RANKL (LOI et al., 2016). Portanto, a relação RANKL/OPG é um indicador de reabsorção no osso.

1.2. Regeneração óssea guiada

A regeneração óssea guiada (ROG) é um procedimento cirúrgico que consiste na aplicação de uma membrana oclusiva sobre a superfície óssea lesionada, atuando como barreira física contra a invasão local de tecidos não osteogênicos, com o propósito de otimizar o reparo ósseo (GRUBER; STADLINGER; TERHEYDEN, 2016). Diversas membranas absorvíveis e não-absorvíveis tem sido avaliadas no contexto de ROG para obtenção de um material biocompatível e eficaz (NASSER et al., 2005). Nesse contexto, diversas membranas vêm sendo estudadas na busca pelas melhores propriedades que possam beneficiar o reparo ósseo de maneira eficaz e acessível.

As membranas de politetrafluoretileno expandido (e-PTFE) são uma das mais utilizadas na ROG. É um material biocompatível, quimicamente estável e mecanicamente resistente, contudo, não é absorvível, sendo necessário uma cirurgia para remoção (RETZEPI; DONOS, 2010). Diversos outros polímeros vêm sendo estudados, como o poli (ácido láctico) e o poli (ácido glicólico), mas a resposta inflamatória e imunológica incerta são ainda desvantagens (STAVROPOULOS; NALE; RUSKIN, 2002). Ainda há os componentes inorgânicos como a hidroxiapatita e beta-trifosfato de cálcio (β -TCP) que também são matérias primas eleitas para a confecção de membranas. No entanto têm propriedades como: a rápida absorção,

baixa resistência mecânica e a resposta inflamatória que sua degradação desencadeia. Com isso, ainda são constantes as buscas por uma membrana ideal (STAVROPOULOS; NALE; RUSKIN, 2002).

Embora haja o desenvolvimento de novos biomateriais, o colágeno ainda reserva grande atenção como matéria prima para a confecção de biomateriais, por ter funções no suporte estrutural e na matriz base para a neoformação óssea. As membranas de colágeno de origem bovina, porcina e mesmo humana vem sendo preparadas de diferentes maneiras a fim de alcançar sua melhor composição, visando diminuir suas principais deficiências quanto membrana, que são a baixa resistência mecânica e rápida reabsorção, sem perder sua fácil moldabilidade (ELGALI et al., 2017).

A engenharia de tecido é uma área que explora biomateriais que atendam aos critérios de osteogênese, osteocondutividade, osteoindutividade e osteopromoção. O número de biomateriais propostos para o tratamento de defeitos ósseos cresce continuamente. Dessa forma, evidenciar o biomaterial ideal, seguro, eficaz e de ação previsível é importante.

1.2.1. Biomateriais

É crescente a disponibilidade de biomateriais para aplicação em regeneração tecidual. No entanto, a escolha do biomaterial que corresponda as características do tecido hospedeiro torna incessante a busca pelo biomaterial ideal para cada aplicação. Diversos biomateriais são ofertados atualmente e os fatores que envolvem sua eficácia são a sua origem, estrutura, composição e a função *in vivo*. Dadas as diversas fontes de matéria prima para a confecção, devem ser consideradas as características de cada tecido de origem e os fatores preditores de eficácia. Além de sua composição devem ser consideradas a apresentação estrutural do material, como topografia de superfície, propriedades mecânicas e hidrofiliabilidade (ELGALI et al., 2017).

Os biomateriais sintéticos são geralmente provenientes de polímeros. Embora bastante eficazes ainda apresentam algumas limitações relacionadas a biocompatibilidade ou processo de manufatura (ABOU NEEL et al., 2013). Já os derivados de produto biológico geralmente têm o potencial de serem biocompatíveis, ter estrutura semelhante ao tecido hospedeiro e exercerem a função natural no tecido. Os biomateriais de origem natural geralmente são ricos em proteínas. O colágeno é

uma matéria prima muito explorada pois é um constituinte natural da matriz extracelular e mais abundante proteína do corpo. O colágeno fibrilar é composto por cadeias polipeptídicas contendo sempre um aminoácido glicina, conhecidas como cadeias α . Essas cadeias por sua vez se organizam em tripla hélice, formando o tropocolágeno. As moléculas de tropocolágeno se agregam para formar as fibrilas, que por sua vez se agrupam em fibras. Essa organização estrutural do colágeno fibrilar confere a ele boas propriedades mecânicas (ABOU NEEL et al., 2013).

Uma outra barreira na confecção de biomateriais é o processo de produção dos mesmos. A extração do material segue à descélularização, desinfecção e esterilização de forma que o procedimento cause a menor alteração possível na estrutura e resposta mecânica do material (ABOU NEEL et al., 2013).

As limitações dos enxertos e biomateriais disponíveis são um estímulo para a persistente busca de aperfeiçoamento dos materiais existentes, bem como o desenvolvimento de novos materiais. Assim, com a oferta do biomaterial ideal busca-se a excelência da terapia e melhora da qualidade de vida do paciente com rápida reabilitação, fazendo-se necessário o estudo de novos produtos.

1.2.2. Membrana de colágeno aniônico

O colágeno é comumente utilizado na produção de biomateriais. Por ser um constituinte natural do corpo, suportar crescimento celular e possuir baixa resposta imunológica torna-se alvo de interesse para a promoção da regeneração tecidual. Goissis, Plepis e Rocha (1994) descreveram a técnica de hidrólise alcalina seletiva por meio da qual foi possível a obtenção de biomateriais a base de colágeno provenientes de tecidos de origem animal. Logo, com base nesses estudos foi desenvolvido a caracterização físico química e estrutural de biomateriais de colágeno aniônico de pericárdio bovino (BET; GOISSIS; LACERDA, 2001; LACERDA; PLEPIS; GOISSIS, 1998).

O biomaterial de colágeno aniônico possui biocompatibilidade e funcionalidade adequados para uso na reconstrução de válvulas cardíacas (COSTA et al., 2005). Seu uso como matriz acelular para regeneração óssea apresentou resultados favoráveis, promovendo neoformação óssea em calvárias de ratos (CUNHA; SANTOS JR.; GENARI, 2005; MIGUEL et al., 2013a; ROCHA, 2005; ROSA et al., 2003). Também apresentou comprovada eficácia na reparação de tecidos

periodontais (OLIVEIRA, 2005). Dessa forma, as matrizes de colágeno aniônico são recomendáveis para o tratamento odontológico, pela eficácia de promover a regeneração óssea e pela diminuição do tempo de reparo (ROCHA, 2005).

Além do efeito de barreira mecânica, as membranas de colágeno parecem ter efeito ativo no processo de reparo, funcionando como matriz para células. Células estas que expressam e secretam proteínas fundamentais para o processo de reparo como fosfatase alcalina (ALP), osteopontina e OC (ELGALI et al., 2017).

Sendo assim, as membranas de pericárdio bovino demonstraram ser biomateriais com ação osteogênica e poderiam ter potencial função também na prática ortopédica. O uso da membrana em regeneração tecidual guiada para reparo de calvárias foi estudado, no entanto a regeneração de ossos longos dá-se de forma distinta e precisa ser avaliada. Para aplicação na prática clínica, prever a interação e os eventos biológicos de forma minuciosa é fundamental. Portanto, o presente estudo propõe ampla análise dos efeitos do uso da membrana de colágeno proveniente de pericárdio bovino na regeneração óssea de defeito em tíbias de ratos.

1.3. Enxerto

Para o tratamento de grandes defeitos ósseos a enxertia é uma técnica utilizada há muito tempo. Embora os enxertos tenham potencial consagrado no reparo de grandes falhas ósseas, podem requerer procedimentos cirúrgicos adicionais, infecções, dificuldade na obtenção, entre outras desvantagens (DIMITRIOU et al., 2011).

As propriedades fundamentais para a enxertia são a osteocondução, processo em que o implante permite passivamente o crescimento de capilares do hospedeiro, tecido perivascular e células mesenquimais; osteoindução, o processo no qual os fatores externos promovem a diferenciação de células mesenquimais do próprio hospedeiro em condroblastos e osteoblastos para formar osso por meio de ossificação endocondral; e osteogênese, síntese de osso novo a partir de células advindas do doador ou do hospedeiro (ROBERTS; ROSENBAUM, 2012). O enxerto ósseo autólogo é a melhor opção de enxertia considerando que possui todas as três características. Entretanto, suas limitações são relacionadas a dor referida pelo paciente, grande perda de sangue, cirurgia prolongada e potencial risco de infecção no local (ROBERTS; ROSENBAUM, 2012). Conciliar os benefícios do enxerto com as

membranas de colágeno pode ser uma alternativa promissora para reduzir as intercorrências com o uso de enxertos e garantir o sucesso do reparo ósseo.

1.4. Métodos investigativos

O mecanismo de reparo ósseo é investigado por diversos métodos. A criação de defeitos ósseos em animais experimentais é um método muito utilizado. O modelo animal permite o estudo do reparo ósseo em um microambiente com presença de condições fisiológicas, como o transporte de nutrientes e gases, presença de fatores de crescimento, além de ser passível de angiogênese e estímulo mecânico (HORNER et al., 2010).

Nos estudos envolvendo a ROG os fatores mais importantes são as propriedades da membrana e as respostas biológicas (ELGALI et al., 2017). Embora a descrição da composição da membrana de colágeno esteja bem descrita é necessário evidenciar suas propriedades de absorção, degradação e resistência mecânica. Em conjunto, a busca incessante por alternativas para o reparo ósseo nos traz a necessidade de entender de forma clara os eventos biológicos frente ao tratamento.

A pesquisa experimental é uma das etapas primordiais para se conhecer os eventos biológicos com análises que não seriam factíveis em humanos. O processo de regeneração óssea é composto por uma cascata de eventos e diferentes alterações ao longo desse processo podem influenciar o desfecho da regeneração óssea. Embora seja grande o avanço nos estudos *in vitro* ainda não é possível replicar os eventos celulares e a influência do microambiente, e de outros tecidos. Portanto, a associação de análises morfométricas, densitométricas, biomecânicas, histológicas e moleculares nos permitem avaliar o tecido em diferentes escalas e compreender a possível influência da membrana de colágeno na regeneração de defeitos em ossos longos.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos do uso da membrana de colágeno proveniente de pericárdio bovino na regeneração de defeito ósseo em tibia de rato.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar a membrana de colágeno proveniente de pericárdio bovino Techgraft®.
- Comparar os efeitos do uso da membrana de colágeno com e sem enxerto autólogo.
- Avaliar os padrões morfométricos, biomecânicos, histológicos e moleculares da evolução da regeneração óssea nos períodos de 21 e 42 dias.

Materiais E Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Caracterização da membrana

3.1.1. Membrana de colágeno

As membranas de colágeno provenientes de pericárdio bovino foram fornecidas pela empresa Baumer® SA, nomeadas pela mesma de Techgraft®. As matrizes foram preparadas a partir de pericárdio bovino, de acordo com o protocolo descrito pelo Prof. Dr. Gilberto Goissis do Departamento de Química e Física Molecular do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (USP) (GOISS et al., 1994). As amostras de pericárdio foram tratadas com uma solução alcalina (3 mL/g) contendo dimetil-sulfóxido 6%, sais (cloreto 3,0 M e sulfato 0,9 M) de metais alcalinos (K^+ 1,2 M e Na^+ 2,0 M) e alcalino terrosos (Ca^{++} 0,91 M). O material resultante foi equilibrado em uma solução (6 mL/g) contendo sais (cloreto 0,13 M e sulfato 0,17 M) de metais alcalinos (K^+ 0,13 M e Na^+ 0,7 M) e alcalino terrosos (Ca^{++} 0,7 M). Os sais presentes nos materiais resultantes foram removidos através de lavagens sucessivas em ácido bórico 3%, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,3% pH11 e água deionizada.

As membranas foram liofilizadas e fornecidas em embalagens assépticas, individualmente. Foram adquiridas amostras com dimensões de aproximadamente 60x40 mm e outras de 10x10 mm (Figura 1).

Figura 1: Membrana de colágeno Techgraft® nas dimensões de 10x10 mm.

3.1.2. Microscopia de Força Atômica

As membranas foram caracterizadas quanto a topografia por um microscópio de força atômica (Dimension Icon, Bruker™) pertencente ao Laboratório do Grupo de

Pesquisa 3B's – Biodegradáveis, Bioabsorvíveis e Biomiméticos da Universidade do Minho (UM), Portugal. As membranas foram avaliadas em áreas de 1x1 µm em 3 diferentes pontos da superfície. A rugosidade foi quantitativamente avaliada por meio da raiz quadrada média (RMS).

3.1.3. Microscopia eletrônica de varredura

Para avaliar a morfologia de superfície das membranas foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura (JSM-6010 LV, JEOL™, Japan) pertencente ao Laboratório 3B's da UM. As membranas foram avaliadas em seu estado natural e em todos os tempos do teste de perda de peso (1, 3, 7, 14 e 30 dias). As membranas em seu estado natural (n=2) e ao final de cada tempo do teste (n=1 para cada tempo) foram posicionadas em *stubs* metálicos com fita de carbono e pulverizadas com ouro. As imagens foram adquiridas em aumento de 1000 X e usadas para comparar a aparência da membrana em seu estado natural quanto as fibras de colágeno e as modificações ao longo do tempo.

3.1.4. Testes de absorção de água

As membranas (n=6 para cada tempo) foram cortadas em dimensões de 10x10 mm e imersas em 1 mL de solução tampão de fosfato salina (PBS) cada, mantidas em estufa a 37 °C durante 1, 3, 7, 14 e 30 dias. As membranas foram primeiramente pesadas em balança de precisão de 0,001 g (Denver™) e ao final de cada tempo as membranas foram passadas rapidamente no filtro de papel, para remover o excesso de água da superfície, e imediatamente pesadas. No primeiro dia as membranas foram pesadas nas primeiras 2, 4, 6 e 8 h, para observar se haveria um pico de absorção de água nas primeiras horas. A razão de absorção de água (Wu) foi calculada a partir da diferença do peso da amostra seca e após o tempo experimental, dada pela fórmula:

$$Wu (\%) = (pf - pi) \div pi \times 100$$

(Equação 1)

Onde, pf é o peso final
pi é o peso inicial.

O PBS foi trocado a cada 2 dias durante o tempo experimental. Ao final de cada tempo experimental, o potencial hidrogeniônico (pH) do líquido residual foi mensurado com um pHmetro.

3.1.5. Teste de perda de peso

As membranas (10x10 mm) foram imersas em 1 mL de solução PBS durante 1, 3, 7, 14 e 30 dias (n=6), mantidas a 37°C. Ao final de cada tempo as amostras foram passadas em filtro de papel, para remover todo o excesso de água, e deixadas secando em temperatura ambiente durante 6 horas. Em seguida, foram pesadas em balança de precisão de 0,001 g (Denver). A razão de perda de peso (WI) foi calculada pela seguinte fórmula:

$$WI (\%) = (pf - pi) \div pi \times 100$$

(Equação 2)

Onde, pf é o peso final
pi é a peso inicial.

3.1.6. Ensaio mecânico

Para o ensaio mecânico das membranas foram confeccionados suportes plásticos de dimensões de 30 x 15 mm com uma abertura interna de 6 x 10 mm (Figura 2). As membranas foram cortadas em dimensões de 30 x 5 mm e fixadas com fita adesiva dupla face nos suportes. A espessura da região central da membrana foi mensurada para definir a área da seção transversal da mesma. O comprimento de teste da membrana (10 mm) foi correspondente ao comprimento da área vazia interna do suporte.

A amostra preparada foi então posicionada no equipamento, a fixação ocorreu nas duas extremidades da membrana protegidas pelo suporte, de forma a não agredir o material e causar possível distorção nos resultados. Antes do início do teste as tiras laterais do suporte foram seccionadas a fim de tracionar somente a membrana. O ensaio mecânico de tração foi realizado na máquina de ensaios Instron™ 5543, com uma célula de carga de 5 kN, pertencentes ao Laboratório 3B's da UM. Os ensaios foram realizados até a ruptura do material obtendo-se as propriedades de força máxima e módulo de Young.

Figura 2: Desenho esquemático da membrana de colágeno fixada no suporte plástico para a realização do ensaio mecânico.

Os testes foram realizados com o material em diferentes condições: natural, seco e úmido nos tempos de 1, 3, 7, 14 e 30 dias ($n=5$ para cada condição e tempo). Primeiramente as membranas foram submetidas ao ensaio mecânico em condição natural, previamente cortadas e fixadas no suporte plástico (Figura 3). Para os ensaios em condição seco e úmido o material foi previamente montado no suporte e mantido em PBS a 37°C durante os tempos propostos. Ao final de cada tempo o material foi submetido ao teste de tração na condição úmido, no qual após retirado do líquido as amostras foram apenas passadas rapidamente em filtro de papel, e na condição seco, no qual as amostras ficaram secando por 6 h em temperatura ambiente.

Figura 3: A) Membrana de colágeno posicionada na máquina de ensaios. B) Membrana sendo submetida ao teste de tração.

3.2. Estudo experimental

Este trabalho seguiu as normas descritas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal e do *International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals* (CIOMS; ICLAS, 2012). O projeto de pesquisa foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da USP, protocolo nº 188/2017 (Anexo A).

Foi proposto o uso de 80 ratos, machos, da linhagem Sprague Dawley, com 9 semanas de idade. Os animais foram adquiridos do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da USP e alojados no Biotério do Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP. Os animais permaneceram em ambiente com temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade de $55 \pm 5\%$ e controle de luminosidade 12 horas claro e 12 horas escuro, sem restrição de ração ou água.

As caudas foram enumeradas com algarismos arábicos, por caneta de tinta permanente, para identificação dos animais. Os animais foram mantidos em caixas coletivas de polipropileno forradas com maravalha, com 2 ou 3 animais em cada. Permaneceram durante 7 dias sem intervenção para adaptação ao novo ambiente.

3.2.1. Defeito ósseo

Após o período de adaptação, os animais de todos os grupos experimentais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para realização do defeito ósseo bilateral.

Os animais foram anestesiados com xilazina (10 mg/kg) e ketamina (70-80 mg/kg), associado a tramadol (10 mg/kg) via intramuscular. Depois de instalado o efeito do anestésico foi realizada a tricotomia e assepsia do membro pélvico esquerdo e direito. Gases embebidas em solução fisiológica estéril (0,9%) foram colocadas sobre os olhos dos ratos para evitar ressecamento das córneas.

Os animais foram posicionados em decúbito dorsal, fixando o membro pélvico direito em rotação externa e tríplice flexão. Aproximadamente 1 cm abaixo da articulação do joelho foi realizada uma incisão na pele e na musculatura com lâmina de bisturi número 10. A pele e os músculos foram afastados e posicionados com auxílio de dois afastadores. Com auxílio de uma escala, a posição do defeito foi padronizada em 10 mm abaixo da articulação do joelho na face medial da tíbia. O

defeito ósseo foi realizado por uma broca trefina (WF Cirúrgicos®, Barueri, Brasil) de 2,9 mm de diâmetro externo e 2,7 mm de diâmetro interno acoplada a um motor de baixa rotação (Micro Motor 210/105L, Strong®, Coreia), sob irrigação de solução fisiológica estéril (Figura 4).

Figura 4: A) Local a ser feita a incisão na pele e musculatura, aproximadamente 1 cm abaixo da articulação do joelho. B) Exposição da face medial da tíbia com auxílio de 2 afastadores para perfuração com a broca trefina sob irrigação de solução fisiológica. C) Defeito ósseo de 2,9 mm de diâmetro realizado na região proximal da tíbia.

Os animais dos grupos TG, EA e TG+EA tiveram o defeito ósseo coberto com as membranas e/ou preenchidos com o enxerto autólogo conforme o tratamento de cada grupo experimental (item 3.2.2). Em seguida, a musculatura foi suturada com fio absorvível de vicryl 4 e a pele com fio não absorvível de nylon 4. O procedimento foi repetido no membro pélvico esquerdo.

Para fins de analgesia, foi administrado dipirona no volume de 0,2 mL para cada animal, via subcutânea, com frequência de duas vezes ao dia durante os três primeiros dias pós-operatórios. Foi realizada a análise clínica dos animais no período pós-operatório, avaliando a presença ou não de edema e estresse, verificando o aspecto geral do animal, movimentação espontânea, aspecto da região periorbitária e focinho, condições da pelagem e massa corporal.

3.2.2. Tratamentos

3.2.2.1. Enxerto ósseo autólogo

O enxerto ósseo autólogo foi adquirido a partir do próprio defeito criado na tíbia dos animais durante o procedimento cirúrgico. O fragmento ósseo retirado da tíbia foi triturado com um osteótomo (Figura 5) e depositado no interior do defeito ósseo até preenchê-lo.

Figura 5: A) Fragmento retirado do defeito ósseo. B) Fragmento triturado.

3.2.2.2. Membrana de colágeno

Antes do procedimento de implantação nos defeitos ósseos as membranas de colágeno Techgraft® foram cortadas, em ambiente estéril, em fitas de 5x10 mm (Figura 6) e reidratadas em solução salina fisiológica estéril. As membranas foram posicionadas sobre o defeito e as bordas remanescentes fixadas abaixo da musculatura, seguido da sutura, de forma a manter a membrana em contato com o osso.

Figura 6: Membrana de colágeno Techgraft® nas dimensões de 5x10 mm.

3.2.3. Grupos experimentais

Os animais foram então distribuídos em 4 grupos de acordo com os tratamentos (n=20), sendo:

-Grupo enxerto autólogo (EA): defeito ósseo tratado com enxerto ósseo autólogo;

-Grupo membrana de colágeno (TG): defeito ósseo tratado com a membrana de colágeno;

-Grupo membrana e enxerto ósseo autólogo (TG+EA): defeito ósseo tratado com a membrana de colágeno e enxerto ósseo autólogo;

-Grupo controle (CONT): defeito ósseo sem tratamento.

Todos os grupos foram subdivididos (n=10) em dois tempos de duração do experimento (21 e 42 dias), para avaliação do reparo ósseo mediano e final.

3.2.4. Eutanásia e preparo dos materiais para análises

Após os períodos de 21 e 42 dias os animais foram submetidos a eutanásia, com dose excessiva de anestésico, sendo dissecadas as tíbias direitas e esquerdas dos animais. Os ossos foram identificados e armazenados obedecendo ao protocolo de cada análise a ser realizada, para cada grupo, conforme segue:

- Dez tíbias direitas: armazenadas em álcool 70%, destinadas a análise macroscópica, densitometria, microtomografia computadorizada (micro-ct) e ensaio mecânico.
- Cinco tíbias esquerdas: armazenadas inicialmente em formol 10%, destinadas a histologia.
- Cinco tíbias esquerdas: armazenadas em freezer -80°C, destinadas a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).

3.2.5. Análise macroscópica dos ossos

Os ossos foram pesados em balança com precisão de 0,01 g (Marte®, modelo AM220, Brasil) e o comprimento foi medido, com os ossos sempre na mesma posição, com paquímetro digital com precisão de 0,01 mm (Mitutoyo®, Brasil), pertencentes ao Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP.

3.2.6. Radiografia

As radiografias dos ossos foram feitas ao final do período experimental para identificar a posição do defeito. As tíbias foram posicionadas lado a lado em um cassete digital (Kodak®-View, Brasil) de 25x30 cm, posicionadas com o defeito ósseo voltado para cima com auxílio de fita adesiva na extremidade distal. A técnica radiográfica foi: distância de 115 cm entre o foco e o cassete, parâmetros de 5 mA e 44 kV em aparelho portátil de radiografias (Siemens®-Unimax 2B, Rio de Janeiro, Brasil) pertencente ao Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP. As imagens foram digitalizadas no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto.

3.2.7. Densitometria

A densitometria foi realizada em um densitômetro de dupla emissão de raios-X (Lunar®, modelo DPX-IQ, USA) pertencente ao Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP. Foi utilizado o programa para exames em pequenos animais em modo de alta resolução. As tíbias foram posicionadas com o defeito ósseo para cima e imersas sob profundidade de 2 cm de álcool 70% em um recipiente plástico. Para estabilizar o posicionamento durante o exame, as tíbias foram fixadas com cera ortodôntica em sua extremidade distal. Dessa forma, a incidência de raios-X foi no sentido médio-lateral.

Com auxílio do mesmo programa computacional utilizado na aquisição das imagens, foi realizada a análise dos exames. Usando a ferramenta de seleção manual, os ossos foram demarcados na região de interesse do objeto (ROI) com área de 8,6 mm², colhendo as informações de conteúdo mineral ósseo (CMO) e densidade mineral óssea (DMO). Para posicionamento do ROI sobre o defeito foi adotado o protocolo no qual o local do defeito foi mensurado com auxílio de um paquímetro, utilizando a imagem radiográfica do osso (Figura 7). Por meio dessa medida foi feita uma transposição da escala para a imagem escaneada no programa do densitômetro, seguindo o seguinte cálculo:

$$p2 = \frac{P1 \times C1}{c2}$$

(Equação 3)

Onde: C1 é o comprimento da tíbia na imagem radiográfica
 P1 é a posição do defeito na imagem radiográfica
 c2 é a posição do defeito na imagem escaneada pelo densitômetro
 p2 é a posição do defeito na imagem escaneada pelo densitômetro.

Figura 7: Imagem radiográfica destacando o comprimento da tíbia (C1) e a posição do defeito (P1). E ao lado direito, imagem da tíbia no densitômetro destacando o comprimento da tíbia (c2) e a posição do defeito (p2), na qual foi posicionada o ROI de acordo com o cálculo.

3.2.8. Microtomografia computadorizada

A micro-ct foi realizada no Laboratório 3B's da UM.

Os ossos foram mantidos em microtubos de 5 mL contendo álcool 70% e escaneados em um microtomógrafo de alta resolução SkyScan™ 1272 (Bruker™, Bélgica) com fonte de raios-X de 60 kV, corrente de 166 μ A e filtro de alumínio de 0,25 mm de espessura. Foi utilizado pixel de 15 μ m e um passo de rotação de 0,4° ao longo de 360°. As imagens foram reconstruídas utilizando o programa NRecon™ (Bruker™) e em seguida alinhadas usando o programa DataViewer™. No programa de análise da tomografia computadorizada (CTAn) A região total do defeito ósseo foi selecionada demarcando uma área circunferencial de 3 mm de diâmetro e uma demarcação referente a região central do defeito de 1,65 mm de diâmetro, utilizando sempre o mesmo volume de interesse (Figura 8). Os parâmetros analisados foram: fração de volume de osso pelo volume total (BV/TV - %), espessura trabecular (Tb.Th - mm), número de trabéculas (Tb.N - 1/ mm) e separação trabecular (Tb.Sp - mm). As medidas morfométricas ósseas e a nomenclatura seguiram as recomendações da *American Society of Bone and Mineral Research*.

Figura 8: A) Alinhamento da tíbia no programa Data Viewer no plano transversal e sagital. B) Delimitação do volume de interesse no programa CTAn. C) Posicionamento da ROI sobre o defeito; em vermelho ROI total e em azul claro ROI interno.

3.2.9. Ensaio mecânico

O ensaio mecânico das tíbias foi realizado na Máquina Universal de Ensaios (EMIC®, Modelo DL10.000, Brasil) pertencente ao Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP, utilizando uma célula de carga com capacidade de 500 N. Um programa Tesc® (versão 13.0, EMIC®, Brasil) foi utilizado para gerar um gráfico de carga *versus* deslocamento para cada ensaio e obter as propriedades mecânicas de força máxima (N), rigidez relativa (N/mm), deslocamento (mm) e energia (N·mm).

Para realização dos ensaios as 10 tíbias direitas de cada grupo experimental foram reidratadas em solução fisiológica estéril por 6 horas. Foi feita a inclusão da extremidade distal das tíbias em resina acrílica polimetilmetacrilato, utilizando pó polímero metil etil metacrilato (AutoCril®, Brasil) e líquido monômero metil metacrilato autopolimerizante (Jet®, Brasil). Essa inclusão serviu como suporte e apoio para facilitar a fixação na morsa de bancada, presa na Máquina Universal de Ensaios.

Os ensaios das tíbias foram de flexão. Para isso, as distâncias de contato foram padronizadas de acordo com a menor tíbia. As tíbias foram fixadas pela

extremidade distal na morsa e a aplicação da força foi realizada na extremidade proximal, distante 8 mm do centro do defeito. O ponto de apoio foi posicionado na região central do defeito, do lado oposto, de modo que o defeito ficasse voltado para cima (Figura 9). A aplicação da força foi realizada na extremidade proximal da tíbia, no sentido médio-lateral, com velocidade de 5 mm/min, fazendo com que a face externa do defeito fosse submetida a um carregamento de tração. O tempo de acomodação foi de 30 s com pré-carga de 10 N.

Figura 9: Posicionamento da tíbia para realização do ensaio mecânico.
A) Acessório de aplicação da força. B) Suporte de apoio. C) Fixação na morsa.

3.2.10. Histologia

Cinco das tíbias esquerdas de cada grupo experimental foram processadas segundo o protocolo histológico. A fixação dos ossos ocorreu com imersão em aproximadamente 70 mL de formol 10% por 24 horas. As tíbias foram então identificadas em saquinhos individuais de filó e descalcificadas em frascos de vidro contendo 500 mL de EDTA 10%, para cada 10 espécimes, durante aproximadamente 30 dias, trocando-se as soluções 2 vezes por semana. Após o período de descalcificação as tíbias foram lavadas em água corrente durante 2 horas. Em seguida, em um histotécnico pertencente ao Laboratório de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP) da USP, os ossos foram desidratados em série crescente de álcool de 70% a 100%, permanecendo 1 hora em cada concentração, diafanizados em xilol, com 3 trocas a cada 1 hora e imersos em três sequências de parafina a 55 °C, com intervalo de 1 hora cada. A extremidade distal das tíbias foi desprezada com auxílio de uma navalha de alta performance e a

confecção dos blocos foi feita, utilizando suportes metálicos, de modo que o defeito ficasse exposto na superfície de corte.

Os blocos foram seccionados em cortes longitudinais de 5 µm de espessura utilizando um micrótomo Leica® RM 2165 (Leica®, USA). Em cada tibia foram realizados cerca de 72 cortes seriados, até percorrer toda a profundidade do defeito. Os cortes foram capturados em lâminas de vidro silanizadas (Starfrost®), sendo posicionados 4 cortes em cada lâmina. Das 18 lâminas obtidas 9 foram coradas pela técnica de tricrômico de Masson (lâminas ímpares) e 3 pela técnica de *picrosirius red* (lâminas 4, 10 e 16).

3.2.10.1. Histomorfometria do osso

Por meio das lâminas coradas com tricrômio de Masson foi avaliada a área de osso neoformado no local do defeito. As fotomicrografias foram obtidas, na objetiva de 5 X, em um microscópio óptico Axio Imager® Z2 acoplado a uma câmera digital (Zeiss®, Alemanha) pertencente ao Laboratório de Ciências Morfológicas da FORP/USP. Utilizando o programa NIS Elements® (3.2, Brasil), pertencente ao Laboratório de Pesquisa em Fundição Odontológica da FORP/USP, foi delimitada a ROI, correspondente a área do defeito. Dentro dessa região foi realizada a análise de densitometria óptica, captando as áreas demarcadas pelos tons de azul, correspondente a osso. A somatória das áreas demarcadas foi quantificada, sendo excluídas as regiões que não representavam osso (Figura 10). A quantidade de osso foi expressa pela razão da área de osso pela área total do defeito ($B.Ar/Tt.Ar - \%$).

Figura 10: Análise histomorfométrica da região do defeito. A) Delimitação da ROI, correspondente a área total do defeito. B) Identificação das áreas correspondente a osso apresentadas em coloração azul. C) Quantificação da área demarcada, excluindo-se a área externa ao ROI. (Tricrômio de masson, aumento de 50 X).

3.2.10.2. Quantificação dos osteócitos

Nas lâminas coradas de masson foi possível identificar os osteócitos. Foram utilizados os cortes da região central do defeito, um de cada tíbia. No mesmo corte foram fotografadas a região da borda do defeito e a região do centro, no aumento de 400 X. Utilizando o programa AxioVision® (Zeiss®, Alemanha) pertencente ao Departamento de Cirurgia e Anatomia na Disciplina de Anatomia Humana da FMRP/USP, os osteócitos foram identificados e quantificados quanto ao número de osteócitos no local.

3.2.10.3. Histomorfometria do colágeno

A avaliação da área de colágeno foi realizada por meio das lâminas coradas com *picrosirius red*. As fotomicrografias foram obtidas no microscópio (Zeiss®, Alemanha) com luz polarizada, na objetiva de 5 X, pertencente ao Laboratório de Proteínas e Histologia do Departamento de Biologia Básica e Oral da FORP/USP. Utilizando o programa NIS Elements® (3.2, Brasil), a área total do defeito foi delimitada e foram determinados dois *Thresholdings*: um para os tons de vermelho e amarelo, e o outro para os tons de verde. Foi realizada a análise de densitometria óptica das fibras colágenas, que captou as diferentes tonalidades e quantificou a somatória das áreas (Figura 11). A área foi expressa pela razão da área de colágeno pela área total do defeito (Col.Ar/Tt.Ar - %).

Figura 11: Análise de densitometria óptica das fibras de colágeno no defeito. A) Delimitação da ROI, correspondente a área total do defeito. B) Demarcação das áreas correspondentes a colágeno tipo 1, coloridas de vermelho e amarelo. C) Demarcação das áreas correspondentes a colágeno tipo 3, coloridas em verde. (*Picrosirius*, aumento de 50 X).

3.2.11. qPCR

As 5 tíbias esquerdas de cada grupo imediatamente após dissecadas, foram cortadas, em ambiente estéril, utilizando disco de carborundum acoplado a um motor de baixa rotação (Micro Motor 210/105L, Strong®, Coreia). Foram realizados 2 cortes transversais e um corte longitudinal ao osso para isolar a região do defeito ósseo (Figura 12). Em seguida os fragmentos foram armazenados em microtubos contendo solução inativadora de RNase (RNAlater®, Sigma Aldrich®), colocados imediatamente em gelo seco e posteriormente armazenados em freezer -80°C até o processamento das amostras. As amostras foram então trituradas em nitrogênio líquido utilizando gral e pistilo. Posteriormente, as amostras trituradas foram colocadas em microtubos contendo 500 µL de Trizol (Life Technologies®, USA) e novamente armazenadas no freezer -80°.

Figura 12: Imagem exemplificando os cortes na tíbia para isolamento da região do defeito. A) Dois cortes transversais. B) Um corte longitudinal.

3.2.11.1. Extração de RNA

Após triturada e homogeneizada com Trizol (500 µL por amostra), foi feita adição de clorofórmio (100 µL). A amostra foi homogeneizada em agitador por 15 s, deixada em temperatura ambiente por 15 min, e centrifugada a 4°C com rotação de 12000 g por 15 min. A amostra então apresentou a separação em fases, da qual o RNA foi isolado. Em seguida foram adicionados 250 µL de isopropanol mantidos a temperatura ambiente por 10 min e centrifugados a 4°C 12000 g por 10 min. O líquido sobrenadante foi desprezado, seguido por 3 lavagens com etanol 75% (500 µL). Foram mantidos em ar ambiente para secar por 10 min e então o *pellet* de RNA foi diluído em 25 µL de água ultra-pura tratada com dietil pirocarbonatolivre (DEPC).

O RNA total foi quantificado por espectrofotometria de absorção (230, 260 e 280 nm) utilizando o aparelho Multiskan GO® (Thermo Scientific®, USA), pertencente ao Laboratório de Pesquisa em Reabilitação Oral da FORP/USP. O RNA foi submetido a tratamento com DNase I, de acordo com as instruções do fabricante. Cada 1 µg de RNA foi submetido ao tratamento com 1 U de DNase I (Sigma®, USA) por 30 min a 37°C. Para a inativação da DNase I foi adicionado 1 µL de EDTA 0,5 M. E por fim, a quantificação do RNA foi novamente realizada.

3.2.11.2. Integridade do RNA

Após a extração do RNA foi realizada a eletroforese em gel de agarose. Foi preparado gel de agarose a 0,8% dissolvido em tampão TAE 1X (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0). A mistura foi aquecida em forno micro-ondas para solubilização e depositada na cuba de eletroforese horizontal. Após seco, o gel foi recoberto com tampão TAE e as amostras foram aplicadas (2 µL) juntamente com *loading buffer* (azul de bromofenol e xileno cianol) (2 µL) e gel *red* diluído 1:500 (2 µL). A eletroforese foi realizada com diferença de potencial (80 V a 150 V) por 40 min. A visualização foi realizada em um aparelho transiluminador ultravioleta e o gel foi fotodocumentado.

Devido a imprecisão do resultado do gel de agarose foi realizada a eletroforese microfluídica, utilizando RNA 6000 Nano chips (Agilent Technologies®, USA) e o equipamento Bioanalyzer® 2100 (Agilent Technologies®, USA), pertencente ao Laboratório de Biologia Molecular da FORP/USP.

Para isso foram preparadas amostras com 200 ng de RNA, que foram posteriormente desnaturadas por 2 min a 70°C. Foi utilizado o *kit* LabChip® (Agilent Technologies®, USA). Primeiramente o gel foi preparado, para isso foram pipetados 550 µL de RNA 600 Nano Dye, agitado por 10 s e centrifugado por 10 min a 3000 g. Em seguida, foi preparado o nano chip, colocando 9 µL da mistura gel/dye e feita a aplicação de pressão. Após 30 s foram colocados 5 µL do marcador, 1 µL de padrão de tamanho e 1 µL de cada amostra em cada poço apropriado. O *chip* foi agitado por 1 min a 2200 rpm. Os cálculos foram feitos utilizando o programa Agilent 2100 Expert® atribuindo um valor de integridade de RNA de 0 a 10.

3.2.11.3. Síntese do cDNA

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir do RNA total usando kit de transcrição reversa de alta capacidade (Applied Biosystems®, USA). O cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg da amostra, adicionando 5,8 µL do kit de transcrição (2 µL de *RT buffer*, 0,8 µL de *DNTP mix*, 2,0 µL de *RT Random Primer*, 1,0 µL de *Multi Scribe Reverse Transcription*) e água DEPC para totalizar 20 µL de reação. Em um termociclador as amostras foram submetidas a 25°C por 10 min, 37°C por 120 min e 85°C por 5 min. As amostras foram então armazenadas em freezer -20°C.

3.2.11.4. qPCR

A reação de qPCR foi feita utilizando o kit SYBR® Green FAST (Applied Biosystems®, USA) contendo cada par de iniciador OPG, OC, RANKL, MMP9 e como controle endógeno o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (Sigma-Aldrich®, Brasil) na reação. A eficiência dos iniciadores foi previamente testada e a sequência dos iniciadores está apresentada no Quadro 1. As amostras foram incubadas durante 2 min a 50°C, seguidas de 20 s a 95°C e depois submetidas a 40 ciclos: 95°C por 3 s e 60°C por 30 s) no equipamento StepOne Plus® (Applied Biosystems®, USA). A curva de dissociação foi crescente de 60°C a 95°C com aumento 0,5°C/ min. A expressão relativa do gene-alvo foi calculada baseando-se no *threshold cycle* (Ct). Os resultados foram analisados de acordo com o método $\Delta\Delta C_t$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Quadro 1: Sequência dos pares de iniciadores utilizados no experimento.

Gene	<i>Foward</i>	<i>Reverse</i>
OC	CATGAGGACCCTCTCTCTGC	ATAGATGCGCTTGTAGGCGT
MMP-9	AGCCGGGAACGTATCTGGA	TGGAAACTCACACGCCAGAAG
OPG	GTTCTTGACACAGCTTCACCA	AAACAGCCCAGTGACCATTC
RANKL	CCACGAACCTTCCATCATAG	TGCAGGAGAATGAAACAAGC
GAPDH	TGATGGGTGTGAACCACGAG	CCCTTCCACGATGCCAAAGT

3.3. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o programa SPSS® (Versão 20.0) e adotando o nível de significância de 5%. As comparações entre os grupos foram realizadas com o teste de variância de uma via (ANOVA) e pós-teste de *Tukey*. Para avaliar as comparações intragrupo entre os diferentes tempos foi utilizado o teste *T Student*. E para a correlação dos dados foi utilizado o coeficiente de correlação de *Pearson*.

Para formatação dos gráficos foi utilizado o programa GraphPad Prism5®.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização da membrana

4.1.1. Microscopia eletrônica de varredura

Uma superfície com poucas ondulações e um aspecto fibroso foi observado na membrana em condição natural. As fibras colágenas aparecem entrelaçadas e sobrepostas. As fibras após imersas em líquido apresentaram um aspecto mais volumoso após 1 dia. Em 3 dias as fibras já tinham uma aparência mais desorganizada. A desnaturação do colágeno acarreta essa aparência logo após poucos dias de imersão em líquido. Aos 7 dias as fibras estavam com aspecto fino, dispersas, quase não eram visíveis. Aos 14 e 30 dias um aspecto amorfo foi observado na superfície. As fotomicrografias da membrana estão apresentadas na Figura 13.

Figura 13 Fotomicrografias da superfície da membrana de colágeno em condição seca (A); após 1 dia de imersão em líquido (B); 3 dias (C); 7 dias (D); 14 dias (E) e 30 dias (F). Aumento de 1000 X.

4.1.2. Microscopia de força atômica

As fibras de colágeno mantiveram sua estrutura natural após o processo de produção. As moléculas de colágeno aparecem organizadas em longas fibrilas, este é um aspecto inerente do colágeno fibrilar. As moléculas de colágeno têm uma sequência de ácidos amino e formam as triplas hélices, agregadas em estruturas: fibrilas, fibras e feixes. Essa organização característica é observada na imagem.

Na Figura 14 são observadas fibrilas de colágeno de 103,31 nm de diâmetro organizadas em grupos paralelamente. É possível observar a aparência estriada das fibrilas de colágeno.

A rugosidade média das membranas foi de 8,12 nm. A rugosidade é um importante aspecto para promover adesão celular.

Figura 14: Topografia da membrana de colágeno em uma vista plana (A) e tridimensional (B).

4.1.3. Absorção de água e perda de peso das membranas

As membranas apresentaram absorção de água aparente, com aumento de sua espessura, e após secagem perdiam o volume extra. Aos 14 dias, embora algumas já se apresentavam mais frágeis, houve um nível acentuado de absorção de água, notado pelo aumento da espessura das membranas, e após secas tendiam a deformar. Aos 30 dias as membranas tinham aparência estável no meio líquido, mas ao serem retiradas ficavam desformes (Figura 15).

Figura 15: Fotos das membranas ao final dos testes de absorção de água e de perda de peso nos tempos de 1, 3, 7, 14 e 30 dias.

As membranas mostraram alta taxa de absorção de água na primeira hora, mantendo equilíbrio até o 14º dia. Na primeira hora de imersão as membranas apresentaram uma absorção de 386%, progredindo para 422% após 8 horas. A absorção progrediu de 458% no primeiro dia para 486% no sétimo dia. Aos 14 dias as membranas apresentaram uma queda na porcentagem de absorção de água, observada graficamente, o que pode estar associada a perda de peso significativa nesse período, e não necessariamente retratar baixa capacidade absorviva. A perda de peso das membranas iniciou no sétimo dia (6,6%) tornando-se mais intensa aos 14 dias, com uma taxa de 34,1%. Aos 30 dias as membranas já apresentaram quase perda total do peso (94,3%).

O pH do líquido residual não permaneceu constante ao longo do período. O pH iniciou em um estado neutro, não apresentando grande alteração ao final do primeiro dia (pH=7,26). Apresentou um aumento do pH até o sétimo dia (pH=8,01), provavelmente devido à dissolução das moléculas de colágeno no líquido. Aos 14 dias o pH tendeu a voltar para o estado neutro. Então, com a dissolução quase completa do material, aos 30 dias, o pH voltou a neutralizar, caindo para 7,43. A Figura 16 apresenta graficamente a porcentagem de absorção de água, perda de peso e o pH do líquido residual.

Figura 16: Gráficos da absorção de água das membranas nas primeiras 8 horas e a partir do final do primeiro dia ao trigésimo. Gráfico da perda de peso das membranas ao longo dos 30 dias. Gráfico do pH do líquido residual ao longo dos 30 dias.

4.1.4. Resistência mecânica

As membranas apresentaram boas propriedades mecânicas. Com alta resistência a tração, que foi diminuindo ao longo dos tempos. As membranas apresentaram melhor resistência na condição seca. A Tabela 1 apresenta os valores das propriedades mecânicas das membranas.

Não foi possível realizar o ensaio aos 7, 14 e 30 dias com as membranas secas, pois após a secagem elas apresentaram deformidade e fragilidade acentuada. Aos 30 dias as membranas não puderam ser testadas mesmo em condição úmida. Houve perda de amostra durante o experimento, portanto foram mantidos $n=4$ para todos grupos na apresentação dos resultados.

Tabela 1: Propriedades mecânicas das membranas ao teste de tração, apresentados em média (desvio padrão)

	Condição da membrana	Força máxima (N)	Força no limite elástico (N)	Módulo de Young (Mpa)
secas	Normal	48,63 (6,79)	48,48 (6,97)	534,21 (147,55)
	1 d	42,99 (5,00)	42,99 (5,00)	430,91 (96,02)
	3 d	28,87 (15,51)	28,87 (15,51)	386,05 (157,71)
úmidas	1 d	16,96 (5,31)	16,96 (5,31)	38,25 (15,54)
	3 d	2,75 (2,94)	2,65 (3,05)	13,09 (8,22)
	7 d	0,15 (0,15)	0,05 (0,04)	14,40 (9,68)
	14 d	0,09 (0,04)	0,06 (0,05)	14,27 (10,76)

A Figura 17 apresenta a fotomicrografia da seção transversal da membrana após ruptura. É possível observar que as fibras apresentaram grandes sinais de deformação antes da ruptura.

Figura 17: Fotomicrografias da seção transversal da membrana após ruptura em 100 e 1000 X, com sinais de grande deformação das fibras.

4.2. Análise experimental

Finalizada a caracterização da membrana de colágeno, foi analisada a aplicação da membrana em estudo experimental. Durante o experimento 7 animais morreram (2 durante e 5 após a cirurgia) e 9 animais foram excluídos devido a: erro cirúrgico (n=4), sinal de sofrimento do animal (n=4), e ocorrência de fratura completa (n=1). Sendo assim, foram utilizados o total de 96 animais, com perda de 16, que foram substituídos para totalizar os 80 animais propostos inicialmente.

4.2.1. Análise macroscópica dos ossos

Não foi possível observar a olho nu grandes diferenças entre os tempos de 21 e 42 dias no progresso da regeneração. Em ambos os tempos quase não há indícios da lesão, sem formação de calo. Nas imagens radiográficas ainda é possível ver bem o defeito aos 21 dias, bem delimitado e mais radiotransparente que o restante do osso, enquanto aos 42 dias já são menos aparentes (Figura 18).

Figura 18: Aspecto do defeito ósseo a olho nu e na imagem radiográfica nos tempos de 21 e 42 dias.

Não foi observada diferença significativa no peso dos ossos entre os grupos no período de 21 dias ($p=0,234$) e 42 dias ($p=0,263$). Também não foi observada diferença significativa entre os grupos para o comprimento em ambos os períodos ($p=0,635$; $p=0,479$). O outlier presente no peso do grupo CONT- 42 d é referente a um osso que perdeu a extremidade da tíbia durante a dissecação, explicando seu peso inferior aos demais, todavia o valor discrepante não afetou a estatística, sendo mantido. Os resultados estão apresentados graficamente na Figura 19.

Figura 19: Gráficos do peso e comprimento das tíbias dos grupos no período de 21 e 42 dias. O círculo preto (•) representa um outlier.

4.2.2. Densitometria

O CMO apresentou diferença significativa entre os grupos aos 21 dias ($p=0,001$) e 42 dias ($p=0,005$). O grupo TG diferiu significativamente do grupo EA ($p=0,020$) e do grupo TG+EA ($p<0,001$) em 21 dias. E em 42 dias os grupos TG+EA e CONT foram significativamente diferentes ($p=0,003$).

A DMO também apresentou diferença significativa entre os grupos em 21 dias ($p<0,001$). A DMO do grupo TG apresentou diferença significativa quando comparada com o grupo EA ($p=0,011$) e TG+EA ($p<0,001$), no período de 21 dias. No período de 42 dias foi observada diferença significativa entre os grupos ($p=0,012$), comparando a DMO do grupo TG+EA e CONT ($p=0,006$). Os resultados estão apresentados na Figura 20.

Figura 20: Gráficos do conteúdo mineral ósseo (CMO) e da densidade mineral óssea (DMO) das tíbias dos grupos nos períodos de 21 dias e 42 dias. • outlier.

A comparação entre os tempos intragrupo em relação a CMO e DMO demonstrou que houve diferença significativa apenas no grupo TG ($p=0,004$; $p=0,004$, respectivamente). Esses dados sugerem que, embora em 21 dias a média da DMO do grupo TG foi inferior aos demais grupos tratados, durante o intervalo de 21 e 42 dias houve uma intensa mineralização, assemelhando-se aos demais grupos tratados. A Tabela 2 apresenta as comparações intragrupo do CMO e DMO.

Tabela 2: Comparação intragrupo do conteúdo mineral ósseo (CMO) e da densidade mineral óssea (DMO) entre os tempos 21 e 42 dias nos grupos apresentados em média (desvio padrão).

Grupo	CMO (g) média (DP)	p	DMO (g/cm ²) média (DP)	p
EA21	0,010 (0,001)	0,247	0,120 (0,010)	0,299
EA42	0,011 (0,001)		0,125 (0,011)	
TG21	0,008 (0,002)*	0,001	0,094 (0,019)*	0,001
TG42	0,011 (0,002)*		0,128 (0,020)*	
TG+EA21	0,011 (0,002)	0,297	0,130 (0,018)	0,199
TG+EA42	0,012 (0,001)		0,140 (0,018)	
CONT21	0,010 (0,002)	0,785	0,113 (0,019)	0,893
CONT42	0,010 (0,002)		0,114 (0,017)	

*diferença significativa $p < 0,05$.

4.2.3. Microtomografia computadorizada

Em todos os grupos experimentais foi observado progresso do reparo (Figura 21). Aos 21 dias é visível nas imagens 3D que o defeito não estava completamente preenchido, e um osso de aspecto mais imaturo foi observado. Aos 42 dias quase não são visíveis as margens do defeito e um osso mais maduro recobre todo o defeito. No plano transversal foi possível observar um maior volume de osso nos grupos tratados. O osso medular tem uma superfície mais irregular enquanto o osso cortical já apresentava uma superfície remodelada (Figura 22).

Figura 21: Cortes transversais das tíbias exibindo o progresso de reparo do defeito ósseo dos grupos nos tempos de 21 e 42 dias. No canto direito a exemplificação das regiões avaliadas.

Nos grupos tratados com membrana de colágeno (TG e TG+EA), o volume de osso trabecular foi prevalente aos 21 dias e mostrou um aspecto mais compacto aos 42 dias. A formação de osso novo foi predominante no topo do defeito, em proximidade com a membrana.

Nos grupos tratados com enxerto autólogo (EA e TG+EA) o defeito foi ocupado por fragmentos de enxerto rodeados de osso novo. Foi possível observar uma organização inicial de osso compacto no fundo e nas bordas do defeito aos 21 dias, com progressão aos 42 dias. Os fragmentos do enxerto foram visíveis aos 21 dias, mas não mais aos 42 dias. A deposição de osso novo iniciou no fundo do defeito.

No grupo tratado com membrana de colágeno e enxerto autólogo (TG + EA) foram observados ambos padrões de formação óssea, com presença de fragmentos e grande volume de osso trabecular aos 21 dias. Foi observado maior volume ósseo, com um aspecto mais maduro, do que os outros grupos, em ambos os tempos.

No grupo sem tratamento (CONT) foi observado um crescimento ósseo progressivo ao longo do tempo, porém em menor volume quando comparado aos grupos tratados. O crescimento ósseo iniciou nas bordas e no fundo do defeito. Um menor volume de osso foi observado aos 21 e 42 dias quando comparado aos grupos tratados.

Figura 22: Região isolada do defeito ósseo mostrando o aspecto do osso formado nos grupos nos tempos de 21 e 42 dias.

Na análise quantitativa, os resultados de BV/TV% apresentaram diferença significativa entre os grupos ($p < 0,001$) no período de 21 dias. O grupo controle teve diferença significativa quando comparado com os grupos tratados ($p < 0,005$). Com base nas médias dos grupos foi possível notar maior BV/TV% nos grupos tratados do que no grupo controle. No entanto, o grupo TG também foi significativamente diferente dos grupos EA ($p < 0,001$) e TG+EA ($p < 0,001$), sendo que a média de BV/TV% foi menor quando comparada aos demais grupos tratados. No entanto foi significativamente diferente do grupo controle ($p = 0,003$), apresentando maior média.

No período de 42 dias foi observada diferença significativa entre os grupos para BV/TV% ($p = 0,026$). Apenas o grupo TG+EA foi significativamente diferente do grupo CONT ($p = 0,021$). Os demais grupos não diferiram significativamente do grupo CONT (EA $p = 0,106$; TG $p = 0,488$) e também não diferiram entre si.

O volume de osso também foi avaliado em relação ao local de reparo, sendo feitas mensurações nas bordas e no centro do defeito. No período de 21 dias foi observada diferença significativa entre os grupos no centro do defeito ($p < 0,001$). O grupo CONT teve menor média, com diferença significativa dos grupos tratados (EA $p < 0,001$; TG $p = 0,031$; TG+EA $p < 0,001$). O grupo TG foi significativamente diferente do grupo EA ($p = 0,003$) e TG+EA ($p = 0,008$), com menor média. O mesmo foi observado nas bordas do defeito ($p < 0,001$), com o grupo CONT significativamente diferente do que os grupos tratados (EA $p < 0,001$; TG $p = 0,013$; TG+EA $p < 0,001$) e o grupo TG significativamente diferente do que o grupo EA ($p = 0,005$) e TG+EA ($p = 0,002$). Aos 42 dias foi observada diferença significativa apenas em relação ao grupo TG+EA quando comparado ao grupo CONT, tanto na borda ($p = 0,019$) quanto no centro do defeito ($p = 0,038$).

A comparação dos tempos para BV/TV% intragrupo mostrou que não houve diferença significativa entre os grupos EA ($p = 0,661$) e TG+EA ($p = 0,801$), mas houve diferença significativa nos grupos TG ($p = 0,017$) e CONT ($p = 0,004$), com aumento da razão de osso neoformado ao longo do tempo. Esse resultado demonstra que, assim como na densitometria, o grupo TG teve a formação óssea mais marcante no período entre 21 e 42 dias, se igualando aos demais grupos tratados. O grupo controle da mesma forma também teve maior formação óssea nesse período, mas não se igualou a todos os grupos tratados.

Figura 23: Gráfico da razão de volume ósseo em relação ao volume total (BV/TV) dos defeitos dos grupos no período de 21 e 42 dias.

Para os resultados da Tb.th houve diferença significativa entre os grupos no período de 21 dias ($p < 0,001$). O grupo EA apresentou média superior quando comparado aos demais grupos com diferença significativa (TG $p = 0,001$; TG+EA $p = 0,002$; CONT $p = 0,009$). No período de 42 dias não houve diferença significativa entre os grupos ($p = 0,359$).

Os resultados Tb.N apresentaram diferença significativa entre os grupos no período de 21 dias ($p < 0,001$). O grupo TG+EA diferiu significativamente dos grupos EA ($p < 0,001$), TG ($p = 0,021$) e CONT ($p < 0,001$), apresentando média superior aos demais grupos. O grupo TG também teve média superior ao grupo CONT, com diferença significativa ($p < 0,001$). No período de 42 dias os dados apresentaram diferença significativa entre os grupos ($p = 0,017$), sendo que apenas o grupo TG+EA diferiu significativamente do grupo CONT ($p = 0,014$), com média superior.

A Tb.sp no período de 21 dias foi significativamente diferente entre os grupos ($p < 0,001$), sendo que o grupo CONT foi significativamente diferente do EA ($p < 0,001$), TG ($p = 0,002$) e TG+EA ($p < 0,001$), com média superior. No período de 42 dias não houve diferença significativa entre os grupos ($p = 0,469$).

Figura 24: Gráficos da espessura trabecular (Tb.th), do número de trabéculas (Tb.N) e da separação trabecular (Tb.sp) dos grupos nos períodos de 21 e 42 dias.

4.2.4. Ensaio mecânico

As propriedades mecânicas das tíbias dos grupos experimentais não apresentaram diferença significativa no período de 21 dias para força máxima ($p=0,062$), para o deslocamento ($p=0,428$) e para a energia ($p=0,234$). A rigidez relativa apresentou diferença significativa entre os grupos ($p=0,006$), sendo que o grupo TG foi significativamente diferente dos grupos EA ($p=0,018$) e TG+EA ($p=0,009$).

Aos 42 dias não foi observada diferença significativa entre os grupos para força máxima ($p=0,059$) e rigidez ($p=0,348$). O deslocamento apresentou diferença significativa entre os grupos ($p=0,001$), sendo o grupo TG+EA foi diferente do grupo CONT ($p=0,004$) e do grupo TG ($p=0,003$). A energia foi significativamente diferente entre os grupos ($p=0,003$), sendo observado maior valor no grupo TG+EA com diferença significativa quando comparado ao CONT ($p=0,010$) e ao TG ($p=0,011$).

Para as comparações dos tempos intragrupo foi encontrada diferença significativa no grupo EA para a rigidez ($p=0,001$), mas não teve para força máxima ($p=0,066$), deslocamento ($p=0,545$) e energia ($p=0,672$). No grupo TG houve diferença significativa para a força máxima ($p=0,012$), deslocamento ($p=0,009$), rigidez ($p<0,001$), mas não teve para a energia ($p=0,365$). Para os grupos TG+EA não houve diferença significativa na força máxima ($p=0,237$), deslocamento ($p=0,448$) e energia ($p=0,161$), mas teve para a rigidez ($p=0,032$). Nos grupos CONT não houve diferença significativa para força máxima ($p=0,158$), deslocamento ($p=0,194$) e energia ($p=0,848$), mas teve para a rigidez ($p=0,001$).

A Figura 25 apresenta graficamente os resultados do ensaio mecânico.

Figura 25: Gráficos das propriedades mecânicas de força máxima, rigidez, deslocamento e energia das tíbias dos diferentes grupos nos tempos de 21 e 42 dias. • outlier.

A força máxima teve uma correlação positiva fraca com a DMO ($r^2=0,293$) e a rigidez relativa teve correlação positiva moderada com a DMO ($r^2=0,421$). Essa correlação demonstra que o grupo TG apresentou menor DMO aos 21 dias quando comparado aos demais grupos tratados, o que explica a menor rigidez. A força máxima, por ter uma correlação mais branda não evidenciou diferença (Figuras 26).

Figura 26: Gráfico de dispersão da correlação da DMO com a força máxima e com a rigidez relativa.

4.2.5. Histologia

4.2.5.1. Tecido ósseo

Aos 21 dias todos os defeitos das tíbias dos grupos experimentais já tinham um progresso no reparo da lesão. Foram observadas margens bem delimitadas do defeito, grande número de osteócitos na matriz, ainda com aspecto imaturo. Nas imagens foi possível observar uma aparência mais trabecular nos grupos TG, enquanto osso de aspecto compacto foi observado junto aos fragmentos do enxerto nos grupos EA e TG+EA. No grupo EA foi observada uma quantidade de osso de aspecto maciço na região central do defeito, correspondente ao enxerto, e uma concentração de trabéculas nas bordas e no centro. O grupo CONT apresentou trabéculas mais espaçadas e tecido de granulação.

Aos 42 dias todos os defeitos das tíbias dos grupos experimentais apresentaram quantidade considerável de osso no local do defeito, quase completamente fechado, com as bordas mais suaves e poucos espaços vazios. Aos 42 dias quase não eram visíveis as margens do defeito em 100 X de aumento, exceto no grupo controle. Foi observado um osso mais maduro, com menor número de osteócitos no local do defeito. O grupo EA apresentou osso com aspecto mais maduro, com menor espaço vazio. Nos grupos tratados com enxerto não foram observados sequestros, foi possível, pelo contrário, evidenciar a presença de osteócitos também nos fragmentos, confirmando que não houve necrose dos mesmos. O grupo TG teve trabéculas mais espessas, ainda foram observados osteócitos dispostos

irregularmente e uma matriz em maturação. O grupo TG+EA apresentou uma concentração de osso no centro e nas bordas, foi observada uma matriz madura, com coloração regular e os osteócitos alinhados. O grupo CONT teve presença de osso em concentração nas bordas indo para o centro e presença de grandes lacunas, a matriz apresentou um aspecto bem irregular com vários osteócitos (Figura 27).

Figura 27: Fotomicrografias do defeito ósseo das tíbias dos grupos experimentais nos tempos de 21 dias e 42 dias. A região em azul representa a área de osso. Ob: osteoblastos; Oc osteócitos; Tb trabéculas; Seta vermelha Ob sendo englobado pela matriz; Seta laranja matriz de coloração irregular. Masson, aumento de 100 X (figuras lado esquerdo) e 400 X (figuras do lado direito).

A quantificação de tecido ósseo dentro da área do defeito não apresentou diferença significativa entre os grupos aos 21 dias ($p=0,080$) nem aos 42 ($p=0,202$). Os valores estão apresentados graficamente na Figura 28.

Figura 28: Gráfico da área de osso em relação a área total do defeito (B.Ar/T.Ar) nos grupos nos períodos de 21 e 42 dias.

4.2.5.2. Osteócitos

Não houve diferença significativa para o número de osteócito tanto na borda ($p=0,420$) quanto no centro ($p=0,975$) do defeito aos 21 dias. Aos 42 dias também não foi encontrada diferença significativa no número de osteócitos na borda ($p=0,508$) e no centro ($p=0,266$) do defeito. A Figura 29 apresenta os valores para cada grupo.

Figura 29: Gráfico do número de osteócitos na borda e no centro do defeito dos diferentes grupos nos períodos de 21 e 42 dias.

4.2.5.3. Colágeno

Sob luz polarizada, a coloração de *picrosirius red* intensificou a birrefringência natural das fibras de colágeno, vistas em amarelo, vermelho e verde sobre o fundo escuro. As fibras tipo 1, mais densas, foram observadas em amarelo e vermelho, as fibras tipo 3 foram observadas em verde. As fibras colágenas apresentaram múltiplas orientações, organizadas em camadas que se entrelaçam (Figura 30).

Figura 30: Fotomicrografias do colágeno sob luz polarizada na região do defeito ósseo das tíbias dos grupos experimentais com 21 dias e 42 dias. A região em amarelo, vermelho e verde representa as fibras colágenas. *Picrosirius red*, aumento de 100 X.

O percentual da área de colágeno em relação a área total do defeito não foi significativamente diferente entre os grupos aos 21 dias, tanto para o colágeno tipo 1 ($p=0,149$) como para o colágeno tipo 3 ($p=0,312$).

Aos 42 dias o percentual de colágeno tipo 1 também não foi significativamente diferente entre os grupos ($p=0,388$). O percentual de colágeno tipo 3 apresentou diferença significativa entre os grupos aos 42 dias ($p=0,007$), sendo que o grupo EA apresentou menor quantidade de colágeno do que o grupo CONT com diferença significativa entre eles ($p=0,004$) (Figura 31).

Figura 31: Gráfico do percentual da área de colágeno em relação a área total do defeito (Col.Ar/Tt.Ar).

4.2.6. qPCR

4.2.6.1. Teste de eficiência dos iniciadores

Os testes de eficiência dos iniciadores foram realizados com 4 diferentes concentrações e apresentaram eficiência de 90 a 110%, conforme indicado. Sendo a eficiência de 99% para GAPDH, 103% para MMP-9, 96% para RANKL, 104% para OC e 106% para OPG. A curva de eficiência de cada par de primer está apresentada na Figura 32.

Figura 32: Gráficos da curva de eficiência dos iniciadores correspondentes aos genes osteocalcina (OC), metaloproteinase 9 (MMP-9), osteoprotegerina (OPG) e receptor ativador do fator nuclear ligante (RANKL) e gliceraldeído-3-fosfato deidrogenase (GAPDH).

4.2.6.2. Integridade do RNA

O gel de agarose ficou com baixa qualidade, portanto não teve resultados conclusivos (Figura 33). Melhores conclusões puderam ser tomadas com base no teste de integridade por eletroforese microfluídica.

Figura 33: A figura apresenta o gel de agarose com RNA das amostras.

O teste de integridade mostrou que os grupos com 21 dias tiveram em sua maioria RNA íntegro, com bom escore. Foram excluídas as amostras de baixa integridade, mantendo n=4. Já os grupos de 42 dias não apresentaram a mesma qualidade de RNA, quase todas as amostras estavam com baixo escore. Foi mantido n=4 para OC e MMP-9, mesmo com baixa integridade, para que fosse possível apresentar os resultados, e n=3 para OPG e RANKL, que não apresentaram expressão relativa em 2 amostras. Sendo assim, assume-se que os grupos de 42 tem chance de não estarem apresentando a expressão adequada, devido a integridade inadequada do RNA e, portanto, estão apresentados separadamente. O gel de integridade das amostras está apresentado na Figura 34.

Figura 34: Teste de integridade do RNA para as amostras obtidas dos defeitos das tíbias dos grupos experimentais nos tempos de 21 dias e 42 dias.

4.2.6.3. qPCR

Aos 21 dias a expressão relativa de OC ($p=0,009$), MMP-9 ($p=0,003$), OPG ($p=0,005$) e RANKL ($p=0,003$) diferiu significativamente entre os grupos. A expressão relativa de OC foi significativamente diferente no grupo TG quando comparado ao grupo TG+EA ($p=0,031$) e CONT ($p=0,007$), com expressão relativa superior. A expressão relativa de MMP-9 também foi maior no grupo TG, sendo significativamente

diferente quando comparada ao grupo EA ($p=0,020$) e CONT ($p=0,002$). A expressão de OPG e RANKL tiveram uma magnitude similar, tendo o grupo TG apresentado maior expressão relativa tanto de OPG quanto de RANKL comparado aos demais grupos, sendo a expressão relativa de OPG significativamente diferente quando comparada ao grupo EA ($p=0,027$), TG+EA ($p=0,040$) e CONT ($p=0,004$); e também a expressão de RANKL significativamente diferente comparada ao grupo EA ($p=0,032$), TG+EA ($p=0,023$) e CONT ($p=0,002$). No entanto, a razão OPG/RANKL não diferiu significativamente entre os grupos ($p=0,213$), demonstrando que embora ambos, OPG e RANKL, estivessem mais expressos no grupo TG, mantiveram a relação em equilíbrio. A Figura 35 representa graficamente a integridade e expressão relativa dos genes aos 21 dias.

Figura 35: Gráficos da integridade do RNA e da expressão relativa dos genes osteocalcina (OC), metaloproteinase 9 (MMP-9), osteoprotegerina (OPG), receptor ativador do fator nuclear ligante (RANKL) e razão OPG/RANKL dos grupos no período de 21 dias.

Os resultados de 42 dias mostraram que não houve diferença significativa na expressão relativa de OC ($p=0,490$), MMP-9 ($p=0,545$), OPG ($p=0,328$) e RANKL ($p=0,307$) ou mesmo na razão OPG/RANKL ($p=0,370$). Devido à baixa integridade do RNA esses resultados são duvidosos, mas foram apresentados para complementar o

trabalho. A Figura 36 representa graficamente a integridade e expressão relativa dos genes aos 42 dias.

Figura 36: Gráficos da integridade do RNA e da expressão relativa dos genes osteocalcina (OC), metaloproteinase 9 (MMP-9), osteoprotegerina (OPG), receptor ativador do fator nuclear ligante (RANKL) e razão OPG/RANKL dos grupos no período de 42 dias.

Discussão

5. DISCUSSÃO

As consequências de lesões no tecido ósseo afetam milhões de pessoas, com incapacidades, dificuldades funcionais e custos financeiros. Ainda assim, é pressuposto que o número de problemas musculoesqueléticos se elevem nos próximos anos devido ao aumento da expectativa de vida e estilo de vida sedentário (WOOLF; AKESSON, 2007).

A falha do processo de reparo pode terminar em pseudoartrose ou consolidação viciosa, acarretando deficiências estruturais e funcionais. Dentre os ossos longos a maior ocorrência de não união é em tíbias (TZIOUPIS; GIANNOUDIS, 2007). Por essa razão há o interesse em desenvolver terapias eficazes aplicadas à tíbia.

A ROG aplicada a ossos longos é pouco investigada. A associação da ROG com a enxertia é uma alternativa promissora, mas a combinação ideal ainda é estudada. O enxerto autólogo foi selecionado para o estudo uma vez que já tem comprovada eficiência e o objetivo foi avaliar a terapia conjunta da membrana com o enxerto, e não o enxerto em si.

Diversos materiais são utilizados na confecção de membranas aplicadas a ROG. Os materiais naturais, como o colágeno, são os preferíveis para aplicação na engenharia de tecido, sendo elegíveis por suas características de biocompatibilidade, biodegradabilidade e afinidade celular. As dificuldades na produção, propriedades mecânicas inferiores, rápida degradação e alta hidrofiliabilidade são fatores que poderiam ser considerados desvantagens (BURG; PORTER; KELLAM, 2000). Portanto, essas características foram avaliadas na membrana utilizada no presente estudo.

De forma a explorar o potencial uso do Techgraft®, este estudo visou em caracterizar as membranas e avaliar seu uso no tratamento de defeitos em ossos longos, associado ou não com enxerto. Uma consolidação óssea acelerada e aplicação mais vantajosa foram observadas no tratamento conjunto de membrana e enxerto, principalmente aos 21 dias.

O colágeno é usado como matéria prima para aplicações na engenharia de tecidos. No entanto, de acordo com o tecido de origem pode apresentar diferentes

propriedades. Por exemplo, colágeno de origem no tendão tem fibras longitudinalmente paralelas, enquanto que as fibras do colágeno do pericárdio são entrelaçadas (CURY et al., 2016). Esse aspecto em rede poderia ser propício para a agregação celular. Nas imagens da MEV foi possível observar o aspecto das fibras entrelaçadas.

Um importante aspecto na manufatura de um material é o modo de produção que cause mínimas mudanças na estrutura e característica mecânica do material (ABOU NEEL et al., 2013). A produção do Techgraft® não afetou a estrutura natural das fibras de colágeno. Na MEV e AFM foram observadas estruturas inerentes do colágeno natural, afirmando uma técnica de produção adequada, sem nenhuma alteração drástica na estrutura do colágeno. O colágeno tipo 1 tem características de tripla hélice e é um componente da matriz extracelular. As unidades de tropocolágeno se sobrepõem, formando lacunas, que dão o aspecto estriado das fibras de colágeno (SHERMAN; YANG; MEYERS, 2015). As bandas escuras são formadas por 5 moléculas, que são a região de sobreposição, enquanto as bandas claras, formadas por 4 moléculas, são a região da lacuna. A unidade de uma banda escura mais uma banda clara é chamada de período-D (CURY et al., 2016). A peridiocidade pode ser variável. Cury et al. (2016) encontraram uma peridiocidade de 56 nm em tendão de ratos idosos e 59 nm em tendão de ratos *Wistar* adultos. Nas imagens da AFM foi possível observar a organização hierárquica das moléculas de colágeno, sendo notadas fibrilas com aparência estriada agrupadas em fibras que se envolvem.

O colágeno de origem animal é tratado por mudanças químicas para produzir biomateriais. Esses processos químicos incluem esterificação, *cross-linking*, acilação e bloqueio dos grupos guanina dos resíduos de arginina. Em desamidação por hidrólise seletiva de cadeias laterais de carboxiamida de asparagina e glutamina em cadeia alfa, o tempo de hidrolização pode afetar a formação fibrilar. Quanto maior o grupo carboxila, menor a capacidade de formar fibrilas (BET; GOISSIS; LACERDA, 2001). A hidrólise para produção de membranas do presente estudo não alterou as fibrilas de colágeno, confirmando a preservação da estrutura natural do colágeno nas imagens da AFM.

O teste de absorção de água é importante devido à alta presença de água na matriz extracelular. Então, a capacidade da membrana de manter sua função como barreira e não se alterar morfológicamente em um ambiente líquido é ponderosa. Além disso, a penetração de água no interior do biomaterial permite que fatores

hidrossolúveis sejam mais facilmente atraídos (CORRELO et al., 2007). A membrana mostrou alta absorção de líquido nas primeiras horas e manteve-se em equilíbrio. Foi possível observar o aspecto gelatinoso das membranas ao final dos tempos experimentais. O colágeno natural formado por tripla-hélices é resistente a degradação, podendo apenas ser degradado por proteases específicas, as collagenases. Após desnaturado o colágeno torna-se gelatinoso, mas tem alta capacidade de absorção de água (GELSE; PÖSCHL; AIGNER, 2003). Uma vez que o colágeno das membranas passou pelo processo de hidrólise, já aos 14 dias foi possível observar o aspecto gelatinoso das membranas e uma tendência a deformar após seca. Aos 30 dias a membrana mostrou seu aspecto usual em imersão no líquido, mas quando removida teve alteração estrutural, mostrando sua afinidade à água. Aos 14 dias a membrana apresentou uma perda de peso e redução na porcentagem de absorção de água marcantes, vistas no gráfico. No entanto, uma vez que ambas análises se relacionam a pesagem das membranas, a baixa porcentagem de absorção de água não se refere ao menor poder absorutivo, e sim, a perda de peso marcante das membranas nesse período. Além disso houve aumento do pH do líquido residual ao longo do teste. O pH neutro tornou-se mais básico com o tempo, o que sugere a dissolução do material no meio líquido. Esses resultados ainda confirmam os achados da MEV na qual era possível observar o aspecto amorfo das membranas com tempo. Consequentemente, os ensaios mecânicos mostraram que as membranas suportaram menor força máxima ao longo do tempo. A absorção de água reduziu a rigidez do material e sua capacidade de resistir à tração.

Um inconveniente no uso de membranas de colágeno é a rápida reabsorção, que pode fazer a membrana ser reabsorvida antes do final da consolidação. No teste de perda de peso foi observada quase completa dissolução do material ao final dos 30 dias. Como os principais efeitos da membrana são osteocondutores e mecânicos o uso da ROG pode ser mais indicado no início no processo de reparo.

Os biomateriais de colágeno são aplicados de diversas maneiras. As membranas usadas na ROG agem como um arcabouço para migração de células osteogênicas e protegem contra a infiltração de tecido não osteogênico (ELGALI et al., 2017). Uma resistência mecânica adequada é necessária para garantir a proteção do local e suportar cargas. As membranas mostraram boas propriedades mecânicas, confirmando que o colágeno é uma proteína hábil para responder as forças mecânicas. Yang et al. (2015) relataram um módulo de elasticidade de 0–50 MPa em

colágeno da pele, enquanto Rigby et al (1959) relataram 1 GPa em colágeno do tendão. Percebe-se que é grande a variabilidade encontrada na literatura nas avaliações dos diferentes tipos de colágeno e dos níveis: molecular, fibrilar, fibra e tecido (SHERMAN; YANG; MEYERS, 2015). Van der Rijt et al. (2006) encontraram uma resistência de 0,2–0,8 GPa no colágeno a nível fibrilar por AFM em meio aquoso, e 2–7 GPa em ar ambiente, corroborando com nosso estudo que mostrou uma menor resistência do colágeno quando úmido. Gentleman et al. (2003), por sua vez, relataram 260–560 MPa em fibras reticuladas, que se assemelha aos valores encontrados em nosso estudo. O colágeno fibrilar, incluindo tipo 1, 2, 3, 5, e 11, é composto por cadeias de polipeptídeos que formam uma tríplice hélice, e essa sua estrutura o torna resistente (SPRANGERS; EVERTS, 2017).

O estudo experimental é essencial para elucidar os efeitos dos biomateriais no tecido, de forma a assegurar posterior avaliação em humanos. Análises das propriedades ósseas em macro e microescala permitem a avaliação do processo de reparo em diferentes níveis. Além disso, o uso de defeito ósseo em modelo animal possibilita boa padronização, reprodutibilidade, baixo custo e avaliação minuciosa do processo biológico.

O alto nível de remodelação óssea no rato é considerado um inconveniente para a extrapolação dos resultados para humanos. Outros animais são elegíveis no estudo de regeneração óssea devido à similaridade com o metabolismo ósseo, como porcos e ovelhas. No entanto, em virtude do fácil acesso, manutenção, alojamento e baixo custo a utilização de ratos é mais ampla. Além do mais, são elegíveis os critérios de fácil acesso ao local cirúrgico e tolerância as técnicas cirúrgicas. Todavia, o modelo de rato não favorece a fixação externa ou interna do segmento ósseo e, portanto, o defeito não crítico foi adotado (MCGOVERN; GRIFFIN; HUTMACHER, 2018).

Uma das limitações no trabalho foi justamente a dificuldade em criar um defeito ósseo crítico, uma vez que as dimensões de um defeito crítico em tíbias de rato exigiriam fixação externa e dificultaria a aplicação da membrana envolvendo o defeito. Ainda que o defeito ósseo não tenha sido crítico, foi possível avaliar os efeitos dos tratamentos comparados ao controle, observando se os tratamentos favoreceram ou aceleraram o reparo. O tempo de 21 dias foi escolhido para avaliar os efeitos da terapia num período mediano do reparo e 42 dias um período tardio para verificar se a terapia é efetiva no desfecho do reparo quando comparada ao controle, e quais os mecanismos afetados nesses dois tempos.

Embora com as inúmeras inovações, ainda é limitante a criação de um modelo único para estudo e comparação dos avanços tecnológicos. Alguns estudos avaliaram o efeito da membrana de colágeno de pericárdio bovino na calvária de ratos (CUNHA; SANTOS JR.; GENARI, 2005; MIGUEL et al., 2013b; ROCHA, 2005). Avaliar o efeito do biomaterial em ossos longos distintamente de ossos chatos, como a calvária, é necessário não só por causa da carga mecânica, mas também devido a diferente origem embriogênica e, conseqüentemente, diferente resposta de reparo (MCGOVERN; GRIFFIN; HUTMACHER, 2018).

A enxertia é um dos tratamentos mais utilizados no tratamento de defeitos ósseos. Uma das limitações da enxertia é o enxerto ser absorvido sem completar sua função como arcabouço. Quando combinado com uma membrana, o crescimento celular em sua superfície, uma vez que acelera o processo de reparo, pode evitar a absorção do enxerto em curto tempo (BUCHAIM et al., 2007). A associação de membrana com o enxerto autólogo foi proposta devido as respostas benéficas conhecidas do enxerto autólogo. Então a equivalência da membrana com um padrão ouro foi avaliada, e o efeito de sua associação foi evidenciado sem dúvidas sobre o outro componente. O enxerto de osso autólogo cortical, embora forneça melhor estabilidade mecânica, tem menor poder osteocondutivo, osteoindutivo e osteogênico do que o enxerto advindo de osso trabecular (WANG; YEUNG, 2017). Em nosso estudo, por ser aplicado em ossos longos o uso do enxerto cortical foi preferido e apresentou bons resultados, reforçados com a associação da membrana.

A ROG parece ter efeitos positivos assim como a técnica de indução da membrana biológica. A membrana cria uma câmara biológica que previne que o enxerto ósseo seja reabsorvido. As membranas de ácido poli láctico podem não permitir vascularização adequada na região do defeito, não secretam fatores de crescimento e outros fatores biológicos presentes nas membranas naturais (MASQUELET; BEGUE, 2010).

A membrana pode influenciar mesmo na ausência de enxerto (ELGALI et al., 2016). Elgali et al. (2016), em seu estudo, encontraram maiores porcentagens de formação óssea em defeitos tratados com hidroxapatita contendo estrôncio do que outros tipos de enxertia. Todos defeitos foram cobertos com membrana, o que sugere que, o uso de diferentes enxertos afeta a resposta óssea, mesmo quando associados com uma mesma membrana. Cardemil et al. (2013) por sua vez, mostrou que defeitos

tratados com uma combinação de hidroxiapatita contendo estrôncio e membrana tiveram maior formação óssea do que os tratamentos usados separadamente.

Turri et al. (2016), em seu estudo, mostraram que grupos tratados com membrana tiveram maior nível de formação óssea no topo dos defeitos, região em contato com a membrana, enquanto nas regiões do meio e do fundo não houve diferença quando comparado com o grupo controle em 6 dias. Em 28 dias a área de osso foi maior no centro e topo do defeito dos grupos tratados com membrana. Comparando as regiões do defeito no grupo tratado, aos 6 dias a área de osso novo foi maior no fundo, mas aos 28 dias concentrou-se no topo. O grupo controle mostrou o mesmo padrão aos 6 dias, mas aos 28 dias a área de osso novo foi prevalente no fundo do defeito. Apesar de não ter sido evidenciada diferença estatística no nosso estudo, foi possível observar nas imagens 3D a formação de osso no topo nos grupos com membrana, enquanto os grupos controle e tratados com enxerto tiveram maior formação óssea, inicialmente, no fundo do defeito.

Durante a remodelação óssea, a matriz extracelular secretada pelos osteoblastos é rica em colágeno que é posteriormente mineralizada (ABOU NEEL et al., 2013). Esse processo de crescimento celular e mineralização é propagado nas fibras colágenas (BUCHAIM et al., 2007). Então, a membrana cria um ambiente auspicioso para a formação óssea, explicando a presença de osso neoformado principalmente no topo do defeito tratado com a membrana. Por outro lado, os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção óssea. A reabsorção óssea é importante no estágio final do reparo, remodelando a estrutura do osso para sua forma inicial. Nos grupos tratados com ambos, membrana e enxerto, foi observada na micro-CT uma superfície mais regular aos 42 dias, sugerindo uma fase de remodelação final.

A orientação das fibras varia de acordo com a demanda mecânica. No tendão as fibras de colágeno são paralelas enquanto no pericárdio a disposição é entrelaçada (BUCHAIM et al., 2007). Como a deposição de osso ocorre na matriz de colágeno, a orientação das fibras pode ter causado uma distribuição trabecular do osso neoformado nos grupos tratados com membrana. Isso acarretou valores de maior número de trabéculas, aos 21 dias, nos grupos tratados com membrana. Mas, pelo contrário a espessura das trabéculas foi maior no grupo tratado somente com enxerto. O padrão de formação óssea e a presença dos fragmentos do enxerto podem ter causado essa diferença. Já o espaçamento trabecular foi elevado somente no grupo controle em relação aos grupos tratados. Visto que o padrão de crescimento ósseo foi

diferente nos grupos tratados, mas o espaçamento trabecular só foi maior no grupo controle, sugere-se que o processo de reparo foi inferior na ausência de tratamento, com maiores espaços vazios.

A mineralização dos ossos também ocorreu de forma distinta com os tratamentos. O grupo TG apresentou menor CMO e DMO aos 21 dias do que os demais grupos tratados, mas aos 42 dias essa diferença não foi mais vista. O mesmo aconteceu com a BV/TV% que foi menor aos 21 dias no grupo tratado com membrana quando comparado aos outros tratamentos. A mineralização e a formação óssea foi então mais tardia, mas não ineficiente, visto que foi intensa entre os 21 e 42 dias, confirmado pela comparação dos tempos intragrupo. Já aos 42 dias apenas o grupo tratado com membrana e enxerto teve maior CMO, DMO e BV/TV, confirmando o benefício da associação dos tratamentos.

A remodelação óssea é afetada por fatores extrínsecos e intrínsecos, como sinalização celular, estímulo eletroquímico e demanda mecânica. O osso é um material piezoelétrico e o fato da remodelação ser influenciada por estresse mecânico pode ser justificada pela presença de receptores mecânicos nos osteoblastos, a organização microestrutural e a anisotropia do colágeno (FERREIRA et al., 2012). As cargas, principalmente compressivas, promovem estímulos as fibras de colágeno para que ocorra a mineralização no reparo ósseo. Então, o uso de membranas pode favorecer a mineralização no reparo de ossos longos (NORIS-SUÁREZ et al., 2007).

Concordando com os achados de Turri et al. (2016) as membranas funcionaram como um compartimento bioativo. Os autores observaram que, com a aplicação da membrana derivada de submucosa intestinal de porco, na fase inicial da consolidação (6 dias) a deposição de osso novo ocorreu principalmente na camada inferior e na região periférica, enquanto que na fase tardia (28 dias) houve aumento de osso novo na camada superior e região central. A área imediatamente abaixo da membrana criou um ambiente osteocondutivo que promoveu a formação óssea nessa região. A matriz extracelular, rica em colágeno, não atua somente como um arcabouço mas como um estímulo biofísico e bioquímico, sinalização molecular e distribuição espacial (ABOU NEEL et al., 2013). A membrana, então, pode atuar como um estímulo mais do que uma barreira física inerte.

Os ossos destinados ao ensaio mecânico foram conservados em álcool 70% e, portanto, foi necessária a reidratação antes dos ensaios mecânicos. A conservação em álcool 70% não altera as características densitométricas e microestruturais e as

propriedades mecânicas de fêmur de ratos (BEAUPIED et al., 2006). Segundo Mick et al. (2015) o armazenamento em álcool 70% mantém as propriedades mecânicas dos ossos, assim como o congelamento, desde que sejam reidratados. De acordo com Broz et al. (1993) são necessárias no mínimo 8 horas para o osso recuperar seu conteúdo líquido e ter as propriedades mecânicas comparáveis a de seu estado natural. Já Linde e Sorensen (1993) afirmaram que o armazenamento dos ossos em álcool 70%, com reidratação por 3 horas, causa mudanças mínimas nas propriedades mecânicas do osso, sem diferença em tempo mais longos. Adotamos o tempo de 6h de forma a reidratar o osso em condição ideal e evitar a degradação da amostra em soro.

Os ensaios de torção são comumente usados para avaliar a consolidação de fraturas de ossos longos. No entanto, devido a não homogeneidade e dimensão das amostras, a realização desse tipo de ensaio não foi viável. Além do mais, tratando-se de um defeito unicortical, o ensaio de torção não é o que melhor avaliaria a região do defeito. O teste de flexão em 3 pontos também não foi aplicado devido à proximidade do defeito ao platô tibial, impossibilitando um comprimento adequado para posicionamento dos pontos de apoio. Para tanto, um teste de flexão adaptado foi realizado no presente estudo, usando as propriedades do teste de flexão em 3 pontos, de modo a submeter a região do defeito a um carregamento de tração e de flexão no osso como um todo. Esse tipo de ensaio mecânico em ossos longos de animais de pequeno porte, com objetivo de avaliar a resistência mecânica de um defeito realizado fora da região medial, é inovador. Não foi encontrado nada parecido na literatura.

Aos 21 dias o grupo TG apresentou menor rigidez quando comparado aos outros grupos tratados (EA e TG+EA), esse dado pode ser relacionado a baixa DMO do mesmo grupo quando comparado aos demais grupos tratados. A distribuição do CMO é irregular tanto no osso trabecular, como no osso cortical (BOSKEY, 1999). O CMO e a DMO são correlacionados com a resistência óssea. Segundo Wright et al. (2018) a DMO está correlacionada com a força máxima de flexão de fêmur. No presente estudo a DMO também foi correlacionada com a força máxima, mas teve correlação mais forte com a rigidez. Os grupos tratados com membrana e colágeno aos 42 dias não demonstraram maior rigidez, mas tiveram maior deformação e consequentemente maior absorção de energia. O aumento da rigidez resulta em diminuição da área abaixo da curva de força, que é proporcional a energia absorvida

antes do osso entrar em fase plástica. O aumento do CMO leva ao aumento do módulo de elasticidade (CURREY, 1969).

Ao longo do tempo todos os grupos mostraram aumento da rigidez, com diferença significativa na comparação dos tempos, que explica o fato do osso imaturo ser mais suscetível a deformação e não ter sua integridade biomecânica completamente reestabelecida. O grupo TG teve aumento da força máxima na comparação dos tempos, corroborando com os resultados da CMO, DMO e BV/TV. Com o progresso da mineralização e formação óssea, conseqüentemente, o grupo tratado com membrana teve um aumento da capacidade de suportar carga.

Ao serem submetidas a um carregamento, estruturas mais rígidas deformam pouco a nível estrutural, e possivelmente o mesmo ocorre a nível tecidual (JEPSEN et al., 2015). O corpo está sempre sendo submetido as cargas fisiológicas, sendo assim, estruturas mais rígidas tendem a sofrer menos com essas cargas. No entanto, CMO e DMO não são as únicas associadas a performance biomecânica do osso. Os ossos de pacientes com osteogênese imperfeita podem ser altamente frágeis, mas possuir uma DMO normal. Nesse caso alterações mutagênicas no colágeno causam a fragilidade óssea. O alinhamento das fibras de colágeno também afeta a resposta biomecânica do osso (BOSKEY, 1999).

O colágeno é uma proteína presente no tecido ósseo, confere características de resistencia mecânica, forma e organização de diversos tecidos. Presente na matriz extracelular, o colágeno possui constante renovação e remodelação (SPRANGERS; EVERTS, 2017). A coloração de *picrosirius red* é sensível e específica para colágeno, sendo eficaz para localizar, quantificar e avaliar a organização das fibras de colágeno em diferentes tecidos (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979a; LATTOUF et al., 2014). O colágeno é uma proteína básica, portanto reage com a acidez do *sirius red* e sua estrutura organizada paralelamente lhe confere a característica de birrefringência (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979b). As fibras de colágeno tipo 1 tem coloração natural branca, mas a coloração de *sirius red* cora as fibras colágenas em vermelho no microscópio de luz e em amarelo intenso no microscópio de polarização. O colágeno tipo 3 compões as fibras reticulares e de pequeno diâmetro e se coram de verde por *sirius red* no microscópio de polarização (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005). A coloração vista sob luz polarizada pode variar em diferentes planos de polarização. Dessa forma, a diferenciação do colágeno tipo 1 e 3 torna-se difícil (LATTOUF et al., 2014). Sendo a técnica consagrada para

coloração de colágeno, propusemos a análise sempre no mesmo sentido rotacional de polarização (90°), afim de obtermos resultados comparativos.

Não foi encontrada diferença entre a quantidade de colágeno no defeito aos 21 dias. Porém, aos 42 dias o grupo CONT apresentou maior quantidade de colágeno tipo 3 do que o grupo EA. O colágeno 3 é relacionado a fase mais inicial de reparo, considerado imaturo, portanto, esse resultado sugere que o grupo EA estava com um reparo em fase mais avançada. Cury et al. (2016) relataram que ambos colágenos, tipo 1 e 3 diminuem com a idade, porém o colágeno tipo 3 é prevalente em relação ao 1 em ratos idosos. O colágeno tipo 1 é mais resistente a tração e isso explica o fato de que o tendão se torna mais susceptível a rupturas em idade avançada (CURY et al., 2016). O mesmo ocorre com os ossos (WANG et al., 2002).

Histologicamente o tecido ósseo pode se apresentar de duas formas: imaturo (ou primário) e maduro (ou secundário). Os dois tipos têm a mesma composição celular e matricial, porém apresentam diferente organização principalmente do colágeno. O tecido imaturo apresenta fibras colágenas desorganizadas, dispostas de forma irregular. Enquanto o tecido secundário tem fibras com organização bem definida, dispostas paralelamente ou organizadas em lamelas concêntricas, lamelas estas que compõe o sistema Harvesiano. O tecido primário é temporário, presente no início do processo de reparo. Posteriormente é substituído pelo tecido secundário (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005).

Foi possível observar que os grupos tratados, aos 42 dias, já tinham um aspecto de osso maduro, enquanto o grupo CONT, embora apresentasse progresso, ainda tinha aspecto de tecido ósseo imaturo, com osteócitos dispostos sem organização específica e a matriz óssea com coloração irregular. Na superfície do tecido ósseo encontram-se os osteoblastos dispostos sequencialmente. Variam em forma e coloração de acordo com seu estado de atividade (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005). Em nossos resultados foi possível observar os osteoblastos nas superfícies ósseas em estado mais ativo, com forma retangular e alguns sendo englobados pela matriz para se tornarem osteócitos.

A quantificação de osteócitos também não apresentou diferença entre os grupos em ambos os tempos. Os osteócitos são as células mais abundantes no tecido ósseo, sendo cerca de 20 X maior em quantidade do que osteoblastos. Cerca de 95% do tecido ósseo é composto por osteócitos. Os osteócitos são osteoblastos que foram englobados pela matriz. Os osteócitos são mais abundantes na matriz na fase de

formação óssea, sendo vistos nas imagens da histologia com maior abundância no período de 21 dias. Os osteócitos embora sendo conhecidos por osteoblastos terminalmente diferenciados, tem papel ativo no processo de remodelação, participando da codificação de sinais mecânicos para estímulo da formação óssea. Além do mais, eles têm função de transmitir sinalização para a formação óssea por meio de sua apoptose (ROCHEFORT; PALLU; BENHAMOU, 2010). Tanto osteócitos como osteoblastos foram vistos em menor quantidade aos 42 dias. Apenas 10 a 20% de osteoblastos tornam-se osteócitos. O restante pode permanecer na superfície de forma inativa e transformar-se em células de revestimento ósseo (*bone-lining cells*), ou sofrer apoptose (ROCHEFORT; PALLU; BENHAMOU, 2010).

Os osteócitos tem dificuldade em manter sua atividade de proliferação e sua função *in vitro*, pois depende de sua matriz extracelular mineralizada (FRANZ-ODENDAAL; HALL; WITTEN, 2006). Dadas algumas dificuldades como essa, o estudo *in vivo* ainda encontra espaço e importância na investigação do reparo ósseo.

A diferença encontrada na micro-ct, mas não na histologia pode ser decorrente da possibilidade de alinhamento da imagem na micro-ct. Percebemos que na micro-ct é possível identificar previamente a quantidade de camadas que o osso ocupa e analisar proporcionalmente. Mas na histologia os cortes foram feitos seriados e se observa que os cortes, principalmente centrais, tem grande quantidade de osso, no entanto não ocupam o mesmo volume. Visto que a superfície óssea é convexa os primeiros cortes não representaram bem o osso depositado no topo do defeito, o que pode ter prejudicado a avaliação dos grupos tratados com membrana. Sugerimos que a micro-ct seja feita prévia aos cortes histológicos, de forma a melhor planejar o protocolo para os cortes.

A matriz extracelular do tecido conjuntivo é composta por componentes proteicos, que conferem ao tecido suas propriedades mecânicas e bioquímicas. Além do mais, há uma forte interação da matriz com a função celular do tecido por meio da ligação em epítomos de moléculas da matriz, pela transmissão de sinais bioquímicos e armazenamento e liberação de fatores de mediadores celulares modulados por componentes da matriz (GELSE; PÖSCHL; AIGNER, 2003).

Os osteoblastos expressam OC desde sua forma de preosteoblastos até sua fase de osteócito em mineralização (COMPTON; LEE, 2014). Durante a ossificação endocondral a OC é mais marcada em osteoblastos, na forma de mRNA e proteína, e em menor quantidade nos osteócitos (FRANZ-ODENDAAL; HALL; WITTEN, 2006). A

expressão mais marcante de OC no grupo TG pode ter se dado pela mineralização mais tardia desse grupo, que pode ser vista na DMO e CMO. E dessa forma, houve um recrutamento maior diferente dos demais grupos.

Para detectar o estado de maturação marcadores podem ser úteis. Em osteoblastos a expressão de OC, assim como de sialoproteína, ALP e colágeno tipo 1 é marcante, na diferenciação dos osteócitos há a redução desses marcadores, que se tornam ainda menos marcados no estado maduro (ROCHEFORT; PALLU; BENHAMOU, 2010). Sendo assim, uma vez que a expressão de OC do grupo TG foi diferente do grupo TG+EA e CONT, mas similar à do grupo EA, comparando aos demais resultados, poderíamos dizer que a maturação óssea do grupo TG estava atrasada em relação ao grupo tratado com membrana e enxerto (TG+EA). No entanto, visto que a DMO do grupo TG tornou-se similar aos demais grupos tratados enquanto a do grupo controle continuou diminuída, sugerimos que houve uma intensificação do processo de maturação óssea entre 21 e 42 dias, o mesmo não ocorreu no grupo CONT.

As alterações nos osteócitos e no seu ambiente extracelular, mais especificamente em seus dentritos, pode ser associada a doenças ósseas e alterações na DMO. Assim como na osteoporose os dentritos parecem reduzidos, na osteomalácia há o aumento do número de dentritos, sendo a matriz hipomineralizada. Por sua vez a hipermineralização da matriz aparece em doenças como a osteoartrite. Além disso, os osteócitos são importantes no recrutamento celular e na secreção de OPG na fase inicial de consolidação (COMPTON; LEE, 2014). Não foi encontrado número aumentado de osteócitos no grupo TG, porém a expressão de OPG foi maior do que nos demais grupos. Esses dados mostram que a membrana pode ter forte efeito osteocondutor, porém pode não ter sido posicionada da melhor forma no defeito ósseo. Talvez colocar a membrana restrita ao defeito, cortada de forma circular e mais íntima ao orifício proporcionaria melhor formação óssea local, uma vez que foi visto formação mais ao topo.

O papel dos osteoclastos também é fundamental para a recuperação óssea. Os osteoclastos são importantes estimuladores da formação óssea através da secreção de moléculas durante a reabsorção óssea. A relação OPG/RANKL tem forte influência na ação dos osteoclastos, uma vez que a OPG inibe a ligação RANK/RANKL. Embora o grupo TG tenha apresentado maior expressão de OPG e RANKL, a relação OPG/RANKL não diferenciou entre os grupos, mostrando que não

houve um desequilíbrio na formação e reabsorção óssea, mas sim um aumento da atividade metabólica no período de 21 dias. Embora o grupo controle também tivesse menor DMO e CMO aos 21 dias, o mesmo não ocorreu com ele, mostrando baixa expressão gênica, portanto podemos dizer que a membrana causou o pico de formação óssea entre os 21 e 42 dias.

A OC é mais expressa durante a fase de maturação dos osteoblastos. A deposição de osso novo inicia-se com a deposição de matriz orgânica que é posteriormente mineralizada. A primeira fase conta com uma hiper-regulação de OC (FLORENCIO-SILVA et al., 2015). Sendo assim, notamos que embora em 21 dias a DMO e volume ósseo estivesse baixa, aos 42 dias normalizou devido a intensa formação de osso nesse período, comprovado pela expressão gênica aumentada. Já o grupo controle não apresentou a mesma resposta, apresentando valores inferiores tanto em 21 quanto em 42 dias.

A degradação equilibrada do colágeno é relevante para a homeostase tecidual. O desequilíbrio dessa degradação está envolvido com diversas doenças como doenças articulares, cardiovasculares e neurodegenerativas (SPRANGERS; EVERTS, 2017). O colágeno é uma proteína muito estável e sua degradação só ocorre com a ação de enzimas específicas, as collagenases. Após desnaturados podem então ser responsivo a qualquer protease, o que não ocorre antes (MONTES; JUNQUEIRA, 1991). Portanto, collagenases e proteases são abundantes em tecidos como fibroblastos e osso, que passam por constante renovação (SPRANGERS; EVERTS, 2017). A MMP-9 avaliada no presente estudo mostrou uma maior expressão relativa no grupo TG quando comparado ao grupo EA e CONT, mas não foi diferente do grupo TG+EA. Possivelmente a presença da membrana de colágeno tenha levado ao um aumento da expressão de MMP-9 para sua degradação.

A degradação da matriz é essencial para o desfecho da consolidação óssea. A MMP-9 exerce papel importante na fase inflamatória no reparo ósseo (WANG et al., 2013). Colnot et al. (2003) encontraram valores elevados de MMP-9 tanto na fase inflamatória quanto na fase mais tardia do reparo ósseo. No entanto, a presença de MMP-9 na fase inicial foi marcada nas células inflamatórias, enquanto na fase tardia foi marcada em osteoclastos, no local de remodelação óssea. Ainda, comundongos com deficiência de MMP-9 mostraram atraso no processo de reparo (COLNOT et al., 2003).

Aos 42 dias não houve diferença nas expressões de nenhum dos genes avaliados. Embora, como os demais resultados, podemos dizer que no período de 42 dias os ossos já estejam em fase final do reparo, e por não ser um defeito crítico, não foi possível detectar diferenças em relação ao controle nesse tempo. Aos 42 dias o RNA não apresentou boa integridade, tornando duvidosos os resultados. O processo desde a extração a qPCR foi realizada por grupos, seguindo o mesmo protocolo, portanto não sabemos afirmar o que acarretou a degradação das amostras. A trituração das amostras foi realizada todas no mesmo dia, e por isso sugerimos que pode ter existido contaminação ou degradação das últimas amostras (42 dias).

A capacidade da membrana de atrair fatores de crescimento e facilitar a adesão celular pode ter incrementado as vantagens da enxertia. No entanto quando sozinha, o espaço vazio presente no defeito pode ter favorecido que o osso fosse depositado preferencialmente na zona em contato com a membrana, prejudicando o preenchimento do defeito. Um enxerto sintético combinando hidroxiapatita e β -trifosfato de cálcio também mostraram maior formação óssea quando associados a membrana de colágeno (ABID; AL MUKHTAR, 2019). No entanto, o estudo foi realizado em coelhos, usando o mesmo osso como controle. Sendo que o efeito pode ser sistêmico, sugere-se novos estudos.

Considerando que os enxertos são avasculares e sua aquisição é limitada, a associação com membranas parece ser uma alternativa promissora. Além do que, o enxerto autólogo pode apresentar risco de infecção e dor. Assim, a associação de membranas com outros enxertos poderia, do mesmo modo, contribuir para o sucesso do reparo.

Conclusão

6. CONCLUSÕES

As membranas de colágeno provenientes de pericárdio bovino apresentaram boas características estruturais e mecânicas para o uso na ROG. Embora ainda tenham rápida reabsorção, o tempo que se mantiveram íntegras no organismo foi o suficiente para desencadear respostas na fase intermediária do processo de reparo.

O tratamento combinado de membrana de colágeno e enxerto autólogo foi a melhor opção para a regeneração óssea, do que quando usados separadamente.

O uso da membrana de colágeno apresentou efeito positivo na regeneração de defeito ósseo em tíbias de rato, favorecendo a formação óssea no topo do defeito, em proximidade com a membrana. Os tratamentos com membrana ou enxerto surtiram melhores resultados aos 21 dias, enquanto o tratamento combinado de membrana e enxerto apresentou resultados mais promissores em ambos os períodos.

Considerando as limitações dos enxertos, a associação com membranas parece ser uma alternativa promissora. A avaliação das membranas associadas a outros tipos de enxerto é encorajada.

Referências

REFERÊNCIAS

ABID, W. K.; AL MUKHTAR, Y. H. Repair of surgical bone defects grafted with hydroxylapatite + β -TCP combined with hyaluronic acid and collagen membrane in rabbits: A histological study. **Journal of Taibah University Medical Sciences**, v. 14, n. 1, p. 14–24, 2019.

ABOU NEEL, E. A. et al. Collagen - Emerging collagen based therapies hit the patient. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 4, p. 429–456, 2013.

BEAUPIED, H. et al. The mode of bone conservation does not affect the architecture and the tensile properties of rat femurs. **Bio-Medical Materials and Engineering**, v. 16, n. 4, p. 253–259, 2006.

BET, M. R.; GOISSIS, G.; LACERDA, C. A. Characterization of polyanionic collagen prepared by selective hydrolysis of asparagine and glutamine carboxamide side chains. **Biomacromolecules**, v. 2, n. 4, p. 1074–1079, 2001.

BROZ, J. J. et al. Effects of rehydration state on the flexural properties of whole mouse long bones. **Journal of Biomechanical Engineering**, v. 115, n. 4A, p. 447, 1993.

BUCHAIM, R. L. et al. Biocompatibility of anionic collagen matrices and its influence on the orientation of cellular growth. **Ciência Odontológica Brasileira**, v. 10, n. 3, p. 12–20, 2007.

BURG, K. J. L.; PORTER, S.; KELLAM, J. F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 21, p. 2347–2359, 2000.

CALORI, G. M.; GIANNODIS, P. V. Enhancement of fracture healing with the diamond concept: The role of the biological chamber. **Injury**, v. 42, n. 11, p. 1191–1193, 2011.

CARDEMI, C. et al. Strontium-doped calcium phosphate and hydroxyapatite granules promote different inflammatory and bone remodelling responses in normal and ovariectomised rats. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1–17, 2013.

CIOMS; ICLAS. **International guiding principles for biomedical research involving animals**, 2012.

COLNOT, C. et al. Altered fracture repair in the absence of MMP9. **Development**, v. 130, n. 17, p. 4123–4133, 2003.

COMPTON, J. T.; LEE, F. Y. Current concepts review: a review of osteocyte function and the emerging importance of sclerostin. **Journal of Bone and Joint Surgery - American Volume**, v. 96, n. 19, p. 1659–1668, 2014.

CORRELO, V. M. et al. Water absorption and degradation characteristics of chitosan-based polyesters and hydroxyapatite composites. **Macromolecular Bioscience**, v. 7, n. 3, p. 354–363, 2007.

COSTA, J. N. L. et al. Comparação entre o pericárdio bovino decelularizado e o pericárdio bovino convencional utilizado na confecção de biopróteses valvares cardíacas. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 20, n. 1, p. 14–22, 2005.

CUNHA, M. R.; SANTOS JR., A. R.; GENARI, S. C. Cultura de osteoblastos sobre membranas de colágeno polianiónico: avaliação preliminar do potencial de indução da formação de tecido ósseo visando reparação tecidual. **Boletim Medicina Veterinária - UNIPINHAL**, p. 73–85, 2005.

CURREY, J. D. The mechanical consequences of variation in the mineral content of bone. **Journal Biomechanics**, v. 2, n. 1, p. 1–11, 1969.

CURY, D. P. et al. Structural and ultrastructural characteristics of bone-tendon junction of the calcaneal Tendon of adult and elderly Wistar rats. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, p. 1–18, 2016.

DIMITRIOU, R. et al. Bone regeneration: current concepts and future directions. **BMC Medicine**, v. 9, n. 66, p. 2–10, 2011.

EINHORN, T. A.; GERSTENFELD, L. C. Fracture healing: mechanisms and interventions. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 11, n. 1, p. 45–54, 2015.

ELGALI, I. et al. Guided bone regeneration using resorbable membrane and different bone substitutes: early histological and molecular events. **Acta Biomaterialia**, v. 29, p. 409–423, 2016.

ELGALI, I. et al. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. **European Journal of Oral Sciences**, v. 125, n. 5, p. 315–337, 2017.

ELLIOTT, D. S. et al. A unified theory of bone healing and nonunion. **The Bone & Joint Journal**, v. 98, p. 884–891, 2016.

FERREIRA, A. M. et al. Collagen for bone tissue regeneration. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 9, p. 3191–3200, 2012.

FLORENCIO-SILVA, R. et al. Biology of bone tissue: Structure, function, and factors that influence bone cells. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–17, 2015.

FRANZ-ODENDAAL, T. A.; HALL, B. K.; WITTEN, P. E. Buried alive: How osteoblasts become osteocytes. **Developmental Dynamics**, v. 235, n. 1, p. 176–190, 2006.

GELSE, K.; PÖSCHL, E.; AIGNER, T. Collagens - Structure, function, and biosynthesis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 12, p. 1531–1546, 2003.

GENTLEMAN, E. et al. Mechanical characterization of collagen fibers and scaffolds for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 24, n. 21, p. 3805–3813, 2003.

GHANBARI, H.; VAKILI-GHARTAVOL, R. Bone Regeneration: current status and future prospects. In: **Advanced Techniques in Bone Regeneration**. E: Intech, 2016. p. 3–25.

GHIASI, M. S. et al. Bone fracture healing in mechanobiological modeling: a review of principles and methods. **Bone Reports**, v. 6, p. 87–100, 2017.

GOISSIS, G.; PLEPIS, A. M. G.; ROCHA, J. L. A. Process for the extraction of collagen from tissues with aqueous organic solvent in alkaline media. **Brazilian Patent for Industrial Property**, n. 9.405.043–0, 1994.

GRUBER, R.; STADLINGER, B.; TERHEYDEN, H. Cell-to-cell communication in guided bone regeneration: molecular and cellular mechanisms. **Clinical Oral Implants Research**, p. 1–8, 2016.

HAK, D. J. et al. Delayed union and nonunions: epidemiology, clinical issues, and financial aspects. **Injury**, v. 45, p. S3–S7, 2014.

HORNER, E. A. et al. Long bone defect models for tissue engineering applications: criteria for choice. **Tissue Engineering. Part B**, v. 16, n. 2, p. 263–71, 2010.

JEPSEN, K. J. et al. Establishing biomechanical mechanisms in mouse models: practical guidelines for systematically evaluating phenotypic changes in the diaphyses of long bones. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 30, n. 6, p. 951–966, 2015.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2005.

JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. A simple and sensitive method for the quantitative estimation of collagen. **Analytical Biochemistry**, v. 94, n. 1, p. 96–99, 1979a.

JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **The Histochemical Journal**, v. 11, n. 4, p. 447–455, 1979b.

LACERDA, C.; PLEPIS, A. M. DE G.; GOISSIS, G. Hidrólise seletiva de carboxiamidas de resíduos de asparagina e glutamina em colágeno: preparação e caracterização de matrizes aniônicas para uso como biomateriais. **Química Nova**, v. 21, n. 3, p. 267–271, 1998.

LATTOUF, R. et al. Picrosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 62, n. 10, p. 751–758, 2014.

LEI, H. et al. Regulatory T cell-mediated anti-inflammatory effects promote successful tissue repair in both indirect and direct manners. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, p. 1–10, 2015.

LINDE, F.; SORENSEN, H. C. F. The effect of different storage methods on the mechanical properties of trabecular bone. **Journal Biomechanics**, v. 26, n. 10, p. 1249–1252, 1993.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LOI, F. et al. Inflammation, fracture and bone repair. **Bone**, v. 86, p. 119–130, 2016.

MASQUELET, A. C.; BEGUE, T. The concept of induced membrane for reconstruction of long bone defects. **Orthopedic Clinics of North America**, v. 41, n. 1, p. 27–37, 2010.

MCGOVERN, J. A.; GRIFFIN, M.; HUTMACHER, D. W. Animal models for bone tissue engineering and modelling disease. **Disease Models and Mechanisms**, v. 11, n. 4, p. 1–14, 2018.

MCKIBBIN, B. The biology of fracture healing in long bones. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 60, n. 2, p. 150–162, 1978.

MICK, E. et al. Influence of short-term fixation with mixed formalin or ethanol

solution on the mechanical properties of human cortical bone. **Current Directions in Biomedical Engineering**, v. 1, n. 1, p. 335–339, 2015.

MIGUEL, F. B. et al. Regeneration of critical bone defects with anionic collagen matrix as scaffolds. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 24, n. 11, p. 2567–2575, 2013a.

MIGUEL, F. B. et al. Regeneration of critical bone defects with anionic collagen matrix as scaffolds. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 24, n. 11, p. 2567–2575, 2013b.

MONTES, G. S.; JUNQUEIRA, L. C. U. The use of picosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 86, n. supl 3, p. 1–11, 1991.

NASSER, N. J. et al. Guided bone regeneration in the treatment of segmental diaphyseal defects: a comparison between resorbable and non-resorbable membranes. **Injury**, v. 36, p. 1460–1466, 2005.

NORIS-SUÁREZ, K. et al. In vitro deposition of hydroxyapatite on cortical bone collagen stimulated by deformation-induced piezoelectricity. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 3, p. 941–948, 2007.

OLIVEIRA, C. A. **Análise histológica da utilização da matriz dérmica acelar e da matriz de pericárdio bovino, associados ao retalho reposicionado coronariamente, no tratamento de deiscências ósseas criadas cirurgicamente em cães**. Araraquara: Tese(Doutorado)-Faculdade de Odontologia- Universidade Estadual Paulista, 2005.

PAIVA, K. B. S.; GRANJEIRO, J. M. Bone tissue remodeling and development: focus on matrix metalloproteinase functions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 561, p. 74–87, 2014.

RETZEPI, M.; DONOS, N. Guided bone regeneration: biological principle and therapeutic applications. **Clinical Oral Implants Research**, v. 21, n. 6, p. 567–576, 2010.

RIGBY, B. J. et al. The mechanical properties of rat tail tendon. **Journal of General Physiology**, v. 43, n. 2, p. 265–283, 1959.

ROBERTS, T. T.; ROSENBAUM, A. J. Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics. **Organogenesis**, v. 8, n. 4, p. 114–124, 2012.

ROCHA, L. B. **Matrizes de colágeno aniônico: eficácia e aspectos biológicos no reparo de defeitos ósseos**. Ribeirão Preto: Tese(Doutorado)-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo, 2005.

ROCHEFORT, G. Y.; PALLU, S.; BENHAMOU, C. L. Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. **Osteoporosis International**, v. 21, n. 9, p. 1457–1469, 2010.

ROSA, F. P. et al. Tissue response to polyanionic collagen: Elastin matrices implanted in rat calvaria. **Biomaterials**, v. 24, n. 2, p. 207–212, 2003.

SHERMAN, V. R.; YANG, W.; MEYERS, M. A. The materials science of collagen. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 52, p. 22–50, 2015.

SPRANGERS, S.; EVERTS, V. Molecular pathways of cell-mediated

degradation of fibrillar collagen. **Matrix Biology**, v. 1, p. 1–11, 2017.

STAVROPOULOS, F.; NALE, J. C.; RUSKIN, J. D. Guided bone regeneration. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics**, v. 14, p. 15–27, 2002.

STEEVE, K. T. et al. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 15, n. 1, p. 49–60, 2004.

TURRI, A. et al. Guided bone regeneration is promoted by the molecular events in the membrane compartment. **Biomaterials**, v. 84, p. 167–183, 2016.

TZIOUPIS, C.; GIANNOUDIS, P. V. Prevalence of long-bone non-unions. **Injury**, v. 38S, p. S3–S9, 2007.

VAN DER RIJT, J. et al. Micromechanical testing of individual collagen fibrils. - PubMed - NCBI. **Macromolecular Bioscience**, v. 6, n. 9, p. 697–702, 2006.

WANG, W.; YEUNG, K. W. K. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: a review. **Bioactive Materials**, v. 2, n. 4, p. 224–247, 2017.

WANG, X. et al. Age-related changes in the collagen network and toughness of bone. **Bone**, v. 31, n. 1, p. 1–7, 2002.

WANG, X. et al. MMP9 regulates the cellular response to inflammation after skeletal injury. **Bone**, v. 52, n. 1, p. 111–119, 2013.

WOOLF, A. D.; AKESSON, K. Can we reduce the burden of musculoskeletal conditions? The European action towards better musculoskeletal health. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 21, n. 1, p. 1–3, 1 fev. 2007.

WRIGHT, B. et al. High correlation between mechanical properties and bone mineral parameters in embalmed femurs after long-term storage. **Clinical Biomechanics**, v. 59, p. 136–142, 2018.

YANG, W. et al. On the tear resistance of skin. **Nature Communications**, v. 6, 2015.

Anexos

Anexo A - Aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*Aplicação da membrana de colágeno proveniente de pericárdio bovino na regeneração óssea guiada de tíbias de ratos*”, registrado com o número **188/2017**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Antonio Carlos Shimano**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata*, *subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 25 de setembro de 2017.

Este Protocolo prevê a utilização de 80 ratos Wistar-Old machos pesando 300g oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do *Campus* de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 25/09/2017 a 12/12/2019.

We certify that the Protocol *n° 188/2017*, entitled “*Application of collagen membrane from bovine pericardium on bone guided regeneration of rat tibia*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 09/25/2017. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata*, *subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 80 male Wistar-Old rats weighing 300g from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 12/12/2019.

Ribeirão Preto, 25 de setembro de 2017

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA-FMRP – USP