UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Eduardo Gomes Machado

Reparo de defeito femoral em ratos através do uso de polímeros de colágeno e elastina associados a hidroxiapatita e proteína morfogenética óssea

São Carlos
2018

Eduardo Gomes Machado

Reparo de defeito femoral em ratos através do uso de polímeros de colágeno e elastina associados a hidroxiapatita e proteína morfogenética óssea

VERSÃO CORRIGIDA

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências.

Área de Concentração: Bioengenharia

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Rodrigues da Cunha

São Carlos
2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

M149r MACHADO, EDUARDO GOMES
Reparo de defeito femoral em ratos através do uso de polímeros de colágeno e elastina associados a hidroxiapatita e proteína morfogenética óssea / EDUARDO GOMES MACHADO; orientador MARCELO RODRIGUES DA CUNHA. São Carlos, 2018.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia e Área de Concentração em Bioengenharia -- Escola de Engenharia de São Carlos; Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, 2018.

1. ELASTINA. 2. COLÁGENO. 3. HIDROXIAPATITA. 4. RECEPTORES DE PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS OSSEAS. 5. OSSEOINTEGRAÇÃO. 6. MATERIAIS BIOCOMPATÍVEIS. I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

EDUARDO GOMES MACHADO

Título da Tese:

"REPARO DE DEFEITO FEMORAL EM RATOS ATRAVÉS DO USO DE POLÍMEROS DE COLÁGENO E ELASTINA ASSOCIADOS A HIDROXIAPATITA E PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA".

TESE APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO INTERUNIDADES EM BIOENGENHARIA - EESC/FMRP/IQSC DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS NA ÁREA DE BIOENGENHARIA.

Data da defesa: 23/03/2018

Prof. Dr. Marcelo Rodrigues da Cunha (Orientador)	Faculdade de Medicina de Jundiaí
Assinatura:	Resultado: <i>APROVADO</i>
Prof. Dr. Edmir Américo Lourenço	Faculdade de Medicina de Jundiaí
Assinatura:	Resultado: <i>Aprovado</i>
Profa. Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis	Instituto de Química de São Carlos / USP
Assinatura: <i>Ana Maria de Guzzi Plepis</i>	Resultado: <i>aprovado</i>
Prof. Dr. Eduardo José Caldeira	Faculdade de Medicina de Jundiaí
Assinatura:	Resultado: <i>Aprovado</i>
Dra. Marília Marta Horn	Universitt Kassel (videoconferência)
Assinatura:	Resultado: <i>APROVADO</i>

Homologado em: ____/____/____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

À minha esposa Elaine e filhos Teodora e Vinícius, pelo eterno companheirismo, amor, carinho e apoio em todos os momentos,

Aos meus pais, Itibagi e Elizabeth, pela educação e valores que sempre sigo em vida,

Ao meu tio Itiberê (in memorian), pelo apoio, carinho e alegrias nos momentos juntos,

Aos meus avós (in memorian) Evaporê, Olga, Breno e Helena, por todo legado deixado à nossa família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, em especial:

Ao Prof. Dr. Itibagi Rocha Machado pelo grande incentivo, como pai, professor e colega, seus ensinamentos e cobranças que foram fundamentais nesta conquista.

Ao Prof. Dr. Marcelo Rodrigues da Cunha pela orientação, competência, dedicação, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual, paciência e principalmente pela amizade.

Aos amigos Marcelo Munhoz, Renato de Moraes e Fernando Cunha pelo companheirismo, apoio e momentos de descontração.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia - EESC/FMRP/IQSC-USP, sempre dedicados à arte de ensinar com muita competência.

À Prof. Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis pela oportunidade de participar neste programa de pós-graduação.

Ao Ewerton Galdeano, pela inestimável ajuda nas ilustrações, gráficos e laminas.

A Faculdade de Medicina de Jundiaí e especial de nosso diretor, Prof. Doutor Edmir Lourenço, pelo suporte financeiro a esta pesquisa,

Aos funcionários do Departamento de Morfologia e Patologia Básica, Faculdade de Medicina de Jundiaí (FMJ), Jundiaí/SP em especial à Damaris dos Santos Frigo e Geovane Ribeiro dos Santos.

Aos colegas e residentes do Instituto Jundiaiense de Ortopedia e Traumatologia, pela compreensão nos momentos de ausência e ajuda nas cirurgias experimentais.

RESUMO

MACHADO, E.G. **Reparo de defeito femoral em ratos através do uso de polímeros de colágeno e elastina associados a hidroxiapatita e proteína morfogenética óssea**. 2018. 123f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

Na presença de fraturas, infecções ou tumores ósseos que ocasionem perda extensa de tecido ósseo, existe a necessidade da utilização de enxerto ósseo autólogo. Apesar deste método ser considerado o padrão-ouro, apresenta algumas desvantagens, como a morbidade da área doadora e limitação do volume a ser obtido. Alternativamente, são considerados como uma importante opção de tratamento, os implantes com biomateriais. Dentre eles, destacam-se as esponjas de colágeno, hidroxiapatita e proteína morfogenética óssea (BMP). A elastina atualmente está sendo investigada como nova opção para substrato na regeneração tecidual. Assim, o objetivo deste projeto foi avaliar o processo de reparo de defeitos ósseos enxertados com estes biomateriais. Foram estudados 77 animais da seguinte forma: Grupo 1 (G1-C): ratos com defeito crítico induzido no osso femoral direito, sem preenchimento com implante (grupo controle). Grupo 2 (G2-E24/37): animais com defeito produzido no fêmur distal direito, preenchido com membrana de elastina 24h a 37°C. Grupo 3 (G3-E24/37+HA): animais com defeito produzido no fêmur distal direito, preenchido com membrana de elastina 24h a 37°C + hidroxiapatita. Grupo 4 (G4-E24/37+BMP): animais com defeito produzido no fêmur distal direito, preenchido com membrana de elastina 24h a 37°C + BMP. Grupo 5 (G5-C24/25): animais com defeito produzido no fêmur distal direito, preenchido com membrana de colágeno da serosa de intestino porcino 24h a 25°C. Grupo 6 (G6-C24/25+HA): animais com defeito produzido no fêmur distal direito, preenchido com membrana de colágeno da serosa de intestino porcino 24h a 25°C + hidroxiapatita. Grupo 7 (G7-C24/25+BMP): animais com defeito produzido no fêmur distal direito, preenchido com membrana de colágeno da serosa de intestino porcino 24h a 25°C + BMP. As análises demonstraram a biocompatibilidade das membranas devido a ausência de elementos celulares característicos de processo inflamatório. A membrana de elastina isolada ou associada a hidroxiapatita não apresentou resultados superiores ao grupo controle, apenas quando associada à BMP, o resultado foi superior ao controle. A membrana de colágeno isolada ou associada à BMP ou hidroxiapatita apresentaram resultados superiores ao controle. Os biomateriais estudados apresentaram capacidade osteogênica e houve osteointegração na falha óssea induzida experimentalmente.

Palavras-chave: Osseointegração, elastina, colágeno, hidroxiapatita, receptores de proteínas morfogenéticas ósseas, materiais biocompatíveis.

ABSTRACT

MACHADO, E.G. Repair of femoral defect in rats through the use of collagen and elastin polymers associated with hydroxyapatite and bone morphogenetic protein. 2018. 123f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018

Bone lesions as fractures, infections or bone tumors can cause extensive bone loss. In this scenario, the use of any type of bone augments is advocated. Although autologous bone graft is considered the gold standard, some disadvantages are related with this method such as donor area morbidity and limited availability of graft material. Alternatively, implants with biomaterials are considered an important option. Among them, the sponges of collagen, hydroxyapatite and BMP show outstanding results. Elastin is currently being investigated as a new substrate option in tissue regeneration. Thus, the objective of this project was to evaluate the repair process of bone defects grafted with these biomaterials. A total of 77 animals were studied as follows: Group 1 (G1-C): rats with critical defect induced in the right femoral bone, without implant filling (control group). Group 2 (G2-E24 / 37): animals with defect produced in the right distal femur, filled with elastin membrane. Group 3 (G3-E24 / 37 + HA): animals with defect produced in the right distal femur, filled with elastin membrane plus hydroxyapatite. Group 4 (G4-E24 / 37 + BMP): animals with defect produced in the right distal femur, filled with elastin membrane plus BMP. Group 5 (G5-C24 / 25): animals with defect produced in the right distal femur, filled with porcine intestinal serosa collagen membrane. Group 6 (G6-C24 / 25 + HA): animals with defect produced in the right distal femur, filled with porcine intestine serous collagen membrane plus hydroxyapatite. Group 7 G7-C24 / 25 + BMP: animals with defect produced in the right distal femur, filled with porcine intestinal serosa collagen membrane plus BMP. The analyzes demonstrated the biocompatibility of the membranes due to the absence of cellular elements characteristic of inflammatory process. The elastin membrane isolated or associated with hydroxyapatite did not present superior results to the control group. The result was superior to the control only when elastin was associated with BMP. The collagen membrane isolated or associated with BMP or hydroxyapatite presented superior results to control. The studied biomaterials presented osteogenic capacity and osseointegration in experimentally induced bone failure.

Keywords: Elastin. Collagen. Bone Morphogenetic Receptors. Biocompatible Materials. Osseointegration.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Imagens macroscópicas dos biomateriais
- Figura 2:** Planejamento experimental
- Figura 3:** Procedimento cirúrgico para criação de falha óssea no fêmur de ratos.
- Figura 4:** Procedimento de redução da área enxertada e preparação para histologia.
- Figura 5:** Planos de cortes transversais sobre a área enxertada do fêmur de rato.
- Figura 6:** Demarcação morfométrica da osteogênese na área cirúrgica.
- Figura 7:** Fotomacrografia e radiologia dos grupos de estudo.
- Figura 8:** Fotomicroscopias G1 a G7 pelo Tricromio de Masson e Picrosirius Red
- Figura 9:** Fotomicroscopias em fluorescência óssea dos Grupos G1 ao G7
- Figura 10:** Fotomicroscopias dos Grupos G1 a G7 pelo método Von Kossa
- Figura 11:** Fotomicroscopias do Grupo 1 (G1-C) Controle – Tricrômio de Masson
- Figura 12:** Fotomicroscopias do Grupo 1 (G1-C) Controle – Picrosirius Red
- Figura 13:** Fotomicroscopias em fluorescência óssea do Grupo 1 (G1-C) Controle
- Figura 14:** Fotomicroscopias do Grupo 1 Controle (G1-C) pelo método Von Kossa
- Figura 15:** Fotomicroscopias do Grupo 2 (G2-E24/37) – Tricromio de Masson
- Figura 16:** Fotomicroscopias do Grupo 2 (G2-E24/37) – Picrosirius Red
- Figura 17:** Fotomicroscopias em fluorescência óssea do Grupo 2 (G2-E24/37)
- Figura 18:** Fotomicroscopias do Grupo 2 (G2-E24/37) pelo método Von Kossa.
- Figura 19:** Fotomicroscopias do Grupo 3 (G3-E24/37+HA) – Tricrômio de Masson
- Figura 20:** Fotomicroscopias do Grupo 3 (G3-E24/37+HA) – Picrosirius Red
- Figura 21:** Fotomicroscopias em fluorescência óssea do Grupo 3 (G3-E24/37+HA)
- Figura 22:** Fotomicroscopias do Grupo 3 (G3-E24/37+HA) pelo método Von Kossa.
- Figura 23:** Fotomicroscopias do Grupo 4 (G4-E24/37+BMP) – Tricrômio de Masson
- Figura 24:** Fotomicroscopias do Grupo 4 (G4-E24/37+BMP) - Picrosirius Red
- Figura 25:** Fotomicroscopias em fluorescência óssea do Grupo 4 (G4-E24/37+BMP)
- Figura 26:** Fotomicroscopias do Grupo 4 (G4-E24/37+BMP) pelo método Von Kossa
- Figura 27:** Fotomicroscopias do Grupo 5 (G5-C24/25) – Tricrômio de Masson
- Figura 28:** Fotomicroscopias do Grupo 5 (G5-C24/25) - Picrosirius Red
- Figura 29:** Fotomicroscopias em fluorescência óssea do Grupo 5 (G5-C24/25)
- Figura 30:** Fotomicroscopias do Grupo 5 (G5-C24/25) pelo método Von Kossa
- Figura 31:** Fotomicroscopias do Grupo 6 (G6-C24/25+HA) – Tricrômio de Masson
- Figura 32:** Fotomicroscopias do Grupo 6 (G6-C24/25+HA) - Picrosirius Red

Figura 33: Fotomicroscopias em fluorescência óssea do Grupo 6 (G6-C24/25+HA)

Figura 34: Fotomicroscopias do Grupo 6 (G6-C24/25+HA) pelo método Von Kossa.

Figura 35: Fotomicroscopias do Grupo 7 (G7-C24/25+BMP) - Tricrômio de Masson

Figura 36: Fotomicroscopias do Grupo 7 (G7-C24/25+BMP) - Picrosirius Red

Figura 37: Fotomicroscopias em fluorescência óssea do Grupo 7 (G7-C24/25+BMP)

Figura 38: Fotomicroscopias do Grupo 7 (G7-C24/25+BMP) pelo método Von Kossa

Figura 39: Gráfico da análise morfométrica dos grupos G1 a G7.

Figura 40: Gráfico da análise estatística dos grupos G1 a G7.

Figura 41: Fotomicrografia por MEV para Matriz de elastina após tratamento alcalino a 37°C.

Figura 42: Fotomicrografia por MEV para Matriz de serosa porcina após tratamento alcalino a 25°C

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de injeção de marcadores fluorocromáticos.....	45
Tabela 2. Temperatura de desnaturação (Td, °C) para as diferentes matrizes.....	120

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Alz	Alizarina
BMP	Proteínas ósseas morfogenéticas
hBMP	Proteínas ósseas morfogenéticas humana
rhBMP	Proteínas ósseas morfogenéticas recombinante humana
rhBMP-2	Proteínas ósseas morfogenéticas recombinante humana tipo 2
CEUA	Comitê de Ética para Uso de Animais da
E	Elastina
ELP	Polipeptídeos semelhantes a elastina
HA	Hidroxiapatita
IL-1	Interleucina tipo 1
IL-6	Interleucina tipo 6
LEPO	Laboratório de Estudo de Plasticidade Óssea
MEC	Matriz Extracelular
MECa	Matrizes extracelulares artificiais
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MOD	Matriz óssea desmineralizada
O	Osso original
PSR	Picrosirius Red
TC	Tecido conectivo
TCP	Trifosfato de cálcio
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
TGF-β1	Fator de transformação do crescimento beta 1
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Engenharia Tecidual.....	21
1.2. Osteogênese.....	21
1.2.1. Mecanismos biológicos do reparo ósseo.....	21
1.2.2. Princípios básicos do reparo óssea.....	22
1.3. Enxertos ósseos.....	23
1.4. Biomateriais.....	24
1.4.1. Hidroxiapatita.....	25
1.4.2. BMP-2.....	26
1.4.3. Polímeros naturais.....	27
1.4.3.1. Colágeno.....	28
1.4.3.2. Elastina.....	29
2. OBJETIVOS	31
2.1. Geral.....	31
2.2. Específicos.....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1. Preparo dos biomateriais	33
3.2. Animais	33
3.3. Grupos Experimentais	34
3.4. Procedimentos Cirúrgicos	35
3.4.1. Técnica Anestésica e Cirúrgica.....	35
3.4.2. Sutura dos Tecidos e Medicação	37
3.5. Controle Pós-Operatório	38
3.6. Morte indolor induzida dos animais	38
3.7. Métodos de análises do reparo ósseo das áreas cirúrgicas.....	38
3.7.1. Etapa 1	39
3.7.1.1. Análise Macroscópica.....	39
3.7.1.2. Análise Radiológica	39
3.7.1.3. Análise Histológica por microscopia de luz transmitida	39
3.7.1.4. Análise Qualitativa da Osteogênese.....	42
3.7.1.5. Análise Morfométrica da Osteogênese	42
3.7.2. Etapa 2.....	44
3.7.2.1. Análise Qualitativa por Microscopia de Fluorescência.....	44
3.7.2.2. Análise da Mineralização por Microscopia de Luz Transmitida.....	44

4. Resultados.....	47
4.1. Análise Comportamental e Física dos Animais após Cirúrgica.....	47
4.2. Análise Macroscópica da Lesão	47
4.3. Análise Radiológica da Área Cirúrgica	47
4.4. Análise histológica da área Cirúrgica femoral	50
4.4.1. Grupo 1 (G1-C) Controle	54
4.4.2. Grupo 2 (G2-E24/37)	59
4.4.3. Grupo 3 (G3-E24/37+HA).....	64
4.4.4. Grupo 4 (G4-E24/37+BMP)	69
4.4.5. Grupo 5 (G5-C24/25).....	74
4.4.6. Grupo 6 (G6-C24/25+HA).....	79
4.4.7. Grupo 7 (G7-C24/25+BMP).....	84
4.5. Resultados Morfométricos	89
4.6. Resultados Estatísticos.....	89
5. DISCUSSÃO	91
5.1. Biocompatibilidade.....	92
5.2. Reabsorção das matrizes poliméricas (colágeno e elastina).....	95
5.3. Capacidade osteorregenerativa da elastina	97
5.4. Capacidade osteorregenerativa do colágeno.....	98
5.5. Comparação da osteorregeneração entre colágeno x elastina.....	99
5.6. Hidroxiapatita (G3 e G6)	100
5.7. Proteína Morfogenética Óssea 2 (BMP-2) (G4 e G7)	100
5.8. Perspectivas futuras em biomateriais	102
6. CONCLUSÕES	103
7. REFERÊNCIAS	105
8. ANEXOS	117
8.1. ANEXO A: Confeção dos Biomateriais.....	117
8.1.1. Membrana de elastina	117
8.1.2. Matriz de colágeno de serosa.....	117
8.1.3. Síntese da Hidroxiapatita.....	117
8.1.4. Caracterização.....	118
8.1.5. Resultado da caracterização.....	118
8.2. ANEXO B – Protocolo Comitê de Ética.....	122

1. INTRODUÇÃO

1.1 Engenharia Tecidual

Milhões de pessoas ao redor do mundo são afetados por desordens musculoesqueléticas e muitos desses pacientes poderiam se beneficiar pela engenharia de tecidos cartilaginosos, ósseos ou reconstruções de tecidos conjuntivos. Atualmente, o desenvolvimento de reconstruções de tendões, cartilagens para reparos articulares e osso para se tratar extensos defeitos ósseos podem ser utilizados em necessidades clínicas. No entanto, embora a indução, em laboratório, da diferenciação específica da linhagem óssea ou cartilaginosa seja comum, a produção de tecidos mecânicos e biologicamente funcionais, ou tecidos de compósitos complexos, que possam ser utilizados em paciente, permanece um desafio. Através da aplicação de conhecimentos adquiridos à partir de estudos sobre o desenvolvimento de tecidos esqueléticos, novas abordagens podem ser desenvolvidas para gerar reconstruções teciduais aplicáveis.

De todos os tecidos esqueléticos, o osso exibe uma notável capacidade de regeneração após a lesão, porém, apesar do processo de formação e regeneração óssea ser bem estudada, e existem muitos caminhos potenciais para a engenharia tecidual cooperar em casos que o processo natural de regeneração óssea não seja o suficiente para a cura da lesão.

1.2 Osteogênese

1.2.1 Mecanismos biológicos do reparo ósseo

A osteogênese em defeitos ósseos é um processo de reconstrução tecidual que geralmente demanda uma variável inexorável, que é o tempo (BLUMENFELD et al., 2002). O processo de reparo ósseo inicia-se com a formação de uma ferida, levando a uma cascata inflamatória que ativa o processo de hemostasia. Plaquetas formam uma barreira inicial ao meio externo a essa lesão e secreta fatores de crescimento. Associado a isso, fibrinogênio é convertido em fibrina, uma proteína insolúvel criando um coágulo sólido, o que promove suporte para outras células inflamatórias. Após isso, vários outros fatores quimiotáticos como: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento epidermal,

histamina e fator von Willebrand são secretados. Todos esses sinais atraem macrófagos e outros leucócitos, retirando tecidos necróticos e bactérias locais e terminando com a fase inflamatória deste processo (AGHALOO; HADAYA, 2017).

Na fase de proliferação, fatores de crescimento como o de transformação do crescimento beta 1 (TGF- β 1), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento insulina-like, além de PDGF, são responsáveis pela angiogênese e formação de tecido fibroso, características próprias desta fase, iniciando a reconstrução da área lesada (LIN; YERANOSIAN, 2016). Após esta fase, o tecido em reparo passa por um processo de remodelamento e maturação. Inicia-se uma contração da lesão através de miofibroblastos, as fibras colágenas tornam-se mais organizadas e o epitélio sobre a área é regenerado (COTRELL et al., 2016).

1.2.2 Princípios básicos do reparo óssea

Em um ambiente com condições fisiológicas favoráveis, é comum a cura espontânea desses defeitos, devido à capacidade de regeneração do tecido ósseo local. Entretanto, esse tempo variável para a cura do defeito ósseo pode ser longo devido à lentidão da formação do novo osso, dependendo do suporte sanguíneo local e dos substratos para fortalecer e amadurecer esse osso neoformado. Somando-se à isso, outras alterações podem ocasionar falha de consolidação como: forças adicionais de estresse aplicado no local, alterações hormonais ou nutricionais e instabilidades biomecânicas. Além dessas alterações, perdas ósseas extensas, causam diminuição das propriedades mecânicas, diminuindo a habilidade de formação de calo secundário. Como a maioria das fraturas se consolidam através do calo secundário, o estímulo mecânico limitado durante este período inicial, aumenta a formação desorganizada deste calo, ao mesmo tempo que o movimento na mesma área contribui para a não consolidação nas últimas fases de reparo da fratura (GASTON; SIMPSON, 2007; JHA; BLAU; BHATTACHARYYA, 2016).

Defeito ósseo de tamanho crítico tem sido definido nas últimas décadas como defeitos que não se curam espontaneamente. (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986), ou defeitos com tamanho de 2,5 vezes o raio do osso, caracterizando um defeito ósseo crítico, constitui um problema significativo para a formação de osso novo e consolidação óssea (LI et al., 2015). Modelos de defeito crítico avaliam a performance *in vivo* de enxertos ou biomateriais utilizados para seu preenchimento em termos de

neoformação óssea, remodelamento, reabsorção do implante e efeitos biológicos locais baseados em estudo radiográfico e histológico. Um modelo de defeito ósseo crítico permite uma avaliação robusta da resposta *in vivo* de um material e se ele pode atingir o objetivo clínico de resolução de um defeito que não cicatriza espontaneamente (WALSH et al., 2017).

1.3 Enxertos ósseos

O padrão ouro atual para estratégia terapêutica na reconstrução de lesões ósseas críticas é o uso de enxerto ósseo autólogo ou autógeno, que representa o “substituto de enxerto ósseo ideal”. O osso autólogo combina todas as características ideais para induzir crescimento e regeneração óssea como a osteogênese e propriedades osteoindutivas e osteocondutivas (ZIMMERMANN et al., 2009). Osteogênese refere-se à capacidade do enxerto de formar osso e mediar precursores osteogênicos. Osteoindução é a propriedade de estimular e ativar células mesenquimais do osso hospedeiro que irão se diferenciar em linhagem óssea, mediadas por fatores de crescimento. Já a osteocondução é a capacidade de promover base estrutural na qual as células hospedeiras criarão sistemas Haversianos novos.

Os enxertos autógenos, adicionalmente, são biomecanicamente estáveis, servem como suporte, permitem invasão celular e aderência vascular para formação de osso novo. Finalmente, o autoenxerto secreta fatores de crescimento necessários à indução da maturação de células tronco indiferenciadas e pré-osteoblastos em células ósseas maduras (JANICKI; SCHMIDMAIER, 2011).

Autoenxertos esponjosos e corticais diferem na rapidez da deposição de osso novo, o que é obviamente mais rápido no osso esponjoso, por seu maior metabolismo ósseo e maior porosidade. Além disso, o osso esponjoso fornece uma área de superfície maior do que o osso cortical para a deposição de osso novo. A taxa de substituição de enxerto ósseo por osso recém-formado é mais lenta no osso autólogo cortical. No entanto, enxerto cortical proporciona suporte estrutural por um maior período de tempo, o que é necessário quando são utilizados grandes volumes de enxertos, tais como no tratamento de tumores ósseos. É também importante recordar que o processo normal de reabsorção ocorre em torno da periferia do enxerto, o que

pode afetar a força do enxerto até que ocorra a remodelação (KHAN et al., 2005; CHIARELLO et al., 2013).

No entanto, há circunstâncias individuais que limitam o uso de autoenxerto, incluindo a morbidade no local de coleta, quantidade inadequada de osso disponível para a coleta, hematoma, dor crônica e tempo de cirurgia adicional, aumentando a probabilidade de infecção. A principal região doadora de enxerto são as cristas ilíacas da pelve (PALMER; CRAWFORD-SYKES; ROSE, 2008; RICCIARDI; BOSTROM, 2013).

Quanto às desvantagens da quantidade de volume ósseo e morbidade pela coleta de osso, estas podem ser evitadas com a utilização de aloenxertos ou enxertos homólogos, obtidos através de doadores vivos da mesma espécie, como por exemplo cabeças femorais de pacientes submetidos à prótese total de quadril, ou através de doadores após óbito. Aloenxerto possui a capacidade de osteocondução e osteoindução (esta última depende do método de preservação do enxerto), proporciona suporte estrutural, porém não possui propriedade osteogênica por causa do seu processo de preparação (CHIARELLO et al., 2013).

No entanto, uma vez que são esterilizados e purificados, aloenxertos e xenoenxertos (enxertos derivados de outras espécies) não fornecem sinais de osteoindução, e não contêm células vivas. A integração do enxerto é rara, terminando na maioria dos casos com substituição óssea apenas nas extremidades dos enxertos, levando à fratura tardia do enxerto, com altas incidências relatadas de até 60% em 10 anos (WHEELER; ENNEKIG, 2005).

1.4 Biomateriais

Uma alternativa promissora diante das desvantagens desses vários tipos de enxertos ósseos naturais, são os substitutos ósseos produzidos pela engenharia tissular, que é a opção “final” no manejo de perdas ósseas. O uso de biomateriais como suporte é um importante tópico dentro da engenharia tissular e podem ser divididos em materiais biológicos (natural ou orgânicos) e sintéticos (artificiais). Metais porosos, vidros bioativos, polímeros sintéticos (ácido polilático ou ácido poliglicólico) e cerâmicas de fosfato de cálcio (hidroxiapatita, fosfato tricalcico) são exemplos de materiais sintéticos. Tal grupo tem vantagens por ser facilmente comercializados e não há necessidade de processamentos especiais antes de sua utilização. Materiais

biológicos (colágeno, elastina, alginato, quitosana, celulose) possuem a vantagem de possuir superioridade significativa em biocompatibilidade, biodegradabilidade, osteorregeneração em relação aos materiais sintéticos, porém seu comportamento imunológico varia em cada espécie (ORYAN et al., 2014; CHIARELLO et al., 2013).

1.4.1 Hidroxiapatita

O osso contém entre 50 a 70% de fosfato de cálcio na forma cristalina de carbonato de hidroxiapatita, a qual na matriz de colágeno do osso torna-se uma estrutura cristalina estável com grande força mecânica e alta flexibilidade. Fosfatos de cálcio tem sido estudado há quase um século como potencial suporte e utilizado extensamente em estudos clínicos para preenchimento de lesões ósseas, por sua similaridade com o carbonato de hidroxiapatita. A hidroxiapatita (HA), por exemplo, possui composição e estrutura semelhantes a fase mineral do carbonato de hidroxiapatita e apresenta-se em vários formatos e produtos, como bloco, pó ou cimento (DE LONG et al., 2007).

A HA é esterilizável e relativamente não absorvível. Sua utilização é vantajosa por causa de sua composição uniforme, alta biocompatibilidade, segurança (não é tóxica, nem alergênica ou carcinogênica) e pelo fato de sua microestrutura (tamanho dos poros) ser completamente controlável (ONO; TATESHITA; NAKAJIMA, 2000).

A estrutura porosa da hidroxiapatita funciona como suporte passivo à neoformação vascular, o que leva à proliferação de fatores indutores da aposição óssea e fornece um substrato adicional à proliferação do tecido ósseo. A hidroxiapatita permite a junção, proliferação, migração e expressão fenotípica de células ósseas, o que resulta em formação de novo osso, em aposição direta ao biomaterial (SAKANO et al., 2001; LEGEROZ, 2002).

HA apresenta osteocondutividade e sua biodegradabilidade é realizada por reabsorção mediada por células, balanceando reabsorção com regeneração óssea, e seus produtos de degradação são bioativos, passando por um processo de biomineralização através da reprecipitação do carbonato de hidroxiapatita (BILLSTROM et al., 2013). Estudos clínicos sugerem que a HA pode ter propriedades osteoindutivas associadas à capacidade osteoindutiva (MASHHADINEZHAD; SAMINI; ZARE, 2014; NOSOUHIAN et al., 2015; ALT et al., 2016; CONTEDEUCA et al., 2016; JANG et al., 2017). Porém, por causa da sua reabsorção lenta *in vivo* e sua

alta fragilidade, resultados mostraram neoformação óssea lenta, fazendo com que HA não seja usada isoladamente na maioria dos estudos (DE LONG et al., 2007).

1.4.2 BMP-2

Durante o processo de cicatrização de uma fratura, mecanismos moleculares regulam a formação óssea tanto intramembranosa quanto endocondral. Além disso, sabe-se que sinalizações moleculares interagem com vários tipos de células, incluindo neste caso células ossas e cartilaginosas, contribuindo em diferentes estágios da ossificação. Entre as moléculas que possuem expressão durante este evento complexo e atua tanto na ativação quanto na inibição do processo de osteogênese são as proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) (EINHORN, 2003; TSIRIDIS; UPADHYAY; GIANNOUDIS, 2007; KERAMARIS et al., 2008).

Proteínas morfogenética óssea são fatores de crescimento multifuncional pertencente à superfamília dos fatores de crescimento transformantes-beta (TGF- β). BMP foram isoladas as varias espécies e pelo menos 40 diferentes subtipos já foram descritos, sendo divididos em grupos de acordo com sua sequencia inicial de aminoácidos (MATTHEWS, 2005). Inicialmente, BMP eram extraídas de osso de cadáver humano, proporcionando, porém, apenas pequenas quantidades de BMP humana (hBMP), limitando seu uso comercial. Atualmente, utiliza-se, através de tecnologia genética recombinante, isótopos com maior potencial de indução óssea (rhBMP) (AXELRAD; KAKAR; EINHORN, 2007; BLOKHUIS; LINDNER, 2008).

A BMP-2 foi identificado na década de 1970 como uma molécula essencial para neoformação óssea em animais adultos (URIST, 1965). Este subtipo é um dos fatores de maior poder osteoindutivo, capaz de iniciar a diferenciação de células-tronco mesenquimais em osteoblastos e condrócitos tanto *in vitro* (RYOO; LEE; KIM, 2006; GIANNOUDIS; EINHORN, 2009) quanto *in vivo*, como também é capaz de transdiferenciar células musculares em células ósseas (MIGLIORINI et al., 2016). Várias pesquisas experimentais reportaram eficácia da rhBMP-2 em situações que esta acelerou a consolidação de fraturas agudas e em não-união, defeitos ósseos críticos e osteointegração de implantes. (REDDI, 2001; BETZ; BET; NAZARIA, 2007; DONATI; DI BELLA; LUCARELLI, 2008; TARDIF; HUM; PELLETIER, 2004). Além disso, estudos clínicos também indicaram que BMP-2 são efetivas e seguras no uso em humanos. (CALORI et al., 2000; SCHMIDMAIER, 2008; VEILLETTE; MCKEE,

2007; EKROL et al., 2008). Estudo randomizado comparando BMP-2 com enxerto autólogo no tratamento de fraturas expostas de tíbias sugeriu benefício no uso do BMP-2 por ter menor tempo cirúrgico, menor tempo de internação hospitalar e por também evitar a dor do local de retirada de enxerto (GOVENDER et al., 2002). Outro estudo randomizado com uso de rhBMP-2 em cirurgias de artrodese em coluna apresentaram semelhantes resultados (VALENTIN-OPRAN et al., 2002).

Apesar de já se ter demonstrado que BMP, em forma de solução, pode induzir a formação de tecido ósseo, a dose necessária para a osteoindução pode ser reduzida dramaticamente se a BMP for implantada associada a um scaffold apropriado (GROENEVELD; BURGER, 2000; SHEIKH et al., 2015). A principal característica deste *scaffold* é reter o fator de crescimento no local desejado, por um período de tempo prolongado e fornecer suporte inicial para adesão celular. Idealmente, o scaffold deve induzir uma resposta inflamatória adequada, ser completamente biodegradável e apresentar porosidade ideal para infiltração, proliferação celular e dar suporte para penetração de vasos sanguíneos no local de neoformação óssea. Além disso, deve prevenir a degradação da BMP enquanto mantém sua bioatividade e permitir uma liberação sustentável de uma maneira bem controlada para promover a osteoneogênese. Por último, este biomaterial deve ser facilmente esterilizável, de fácil manejo, estável quando estocado e comercialmente viável, permitindo sua produção em larga escala. (BESSA; CASAL; REIS, 2008; CARREIRA et al., 2014; ISSA et al., 2008; DAVID; FEIGE; BAILLY, 2009).

Existem vários biomateriais que se demonstram promissores, com grande potencial para uso associado ao BMP. Lista-se desde metais e cerâmicas como polímeros sintéticos e polímeros naturais, como o colágeno e a elastina.

1.4.3 Polímeros naturais

Polímeros são moléculas de cadeia longa com um número repetido de unidades (monômeros) e agem como barreira na prevenção do crescimento de tecido conjuntivo junto ao defeito, permitindo somente a neoformação óssea. Matrizes à base de polímeros naturais são foco de aplicações para a engenharia de tecidos ósseos devido a excelentes propriedades como biocompatibilidade e biodegradabilidade. Além disso, polímeros naturais possuem estrutura altamente organizada o que pode guiar células a proliferarem em vários estágios de

desenvolvimento e até estimular resposta imunológica. Polímeros como colágeno e elastina, além de sua biocompatibilidade, participam no controle da estrutura do tecido e na regulação do fenótipo celular simulando a matriz extracelular (YANG et al., 2004; SWETHA et al., 2010).

1.4.3.1 Colágeno

O colágeno é a classe mais representativa de proteína fibrosa insolúvel encontrada nos tecidos conjuntivos e da matriz extracelular sendo o responsável pela conformação estrutural inicial dos tecidos. Estruturalmente, a molécula do colágeno é formada pelo entrelaçamento em tripla hélice de três cadeias polipeptídicas, em um mesmo eixo, denominadas cadeia alfa. Esta conformação estrutural desta proteína justifica suas propriedades físicas e biológicas, proporcionando rigidez, resistência à tração e estabilidade. Devido à sua baixa toxicidade, associada à sua alta biocompatibilidade e biodegradabilidade, com fácil reabsorção pelo organismo, o colágeno constitui-se como um dos biomateriais mais comumente aplicado em pesquisas e cirurgias na área médica. Além de ser de fácil manejo, pode ser utilizado como membrana, esponja, gel, carreador ou revestimento de superfícies de blendas poliméricas sintéticas (MOREIRA et al., 2004; BRODSKY; PERIKOV, 2005; ALBERTS 2008; MOREIRA et al., 2013).

O colágeno tem papel fundamental na formação tecidual e vem sendo utilizado como carreador para proteínas indutoras de osso. Além disso, influi na diferenciação celular e possui sítios de reconhecimento para células osteoprogenitoras. Devido à sua atividade osteoindutiva, o colágeno é considerado uma excelente escolha, como substituto ósseo, possuindo propriedades características para o processo regenerativo, estimulando a migração e infiltração celular (MOREIRA et al., 2013; CHEN et al., 2000).

Porém, o colágeno na sua forma pura apresenta algumas desvantagens como sua pobre força mecânica que interfere na estrutura inicial do tecido em formação. Outras desvantagens, incluem o alto custo de purificação, a dificuldade de reprodutibilidade da densidade de reações cruzadas e tamanho de fibra. Portanto, melhorias das características físicas, químicas e biológicas são necessárias para corrigir tais desvantagens. Uma das técnicas é o preparo do colágeno aniônico em pH fisiológico, com pequenas mudanças estruturais, como a hidrólise seletiva das

cadeias carboxiamidas dos resíduos do aminoácidos asparagina e glutamina presente nas cadeias alfa do tropocolágeno. Essa mudança aumenta sua carga negativa e intensificando sua propriedade piezoelétrica (colágeno aniônico) (GOISSIS et al.; 1998; BET; GOISSIS; LACERDA, 2001). Tais melhoras no colágeno demonstraram potencial para osteogênese tanto em pesquisas tanto *in vitro* (MOREIRA, 2004; MOREIRA et al.; 2013) como *in vivo* (MIGUEL et al., 2006; CUNHA et al., 2008; MIGUEL et al., 2013).

Independente das modificações químicas, a estrutura em tripla hélice do colágeno se manteve preservada em todas as membranas, não desnaturando a estrutura do colágeno. Além disso, demonstrou-se que a absorção de água pelas matrizes e seu potencial hidrofílico aumenta linearmente com o aumento do conteúdo de carboxilados. Essas características afetarão o comportamento de adesão celular a essas matrizes, pela mudança estrutural da membrana (HORN; MARTINS; PLEPIS, 2015).

Estudos utilizando colágeno de osso desmineralizado juntamente com HA em defeitos ósseos, mostraram que o colágeno de osso desmineralizado enxertado em combinação com a HA foi um excelente material osteoindutivo. Observou-se também osteoindução, quando células osteogênicas foram colocadas na matriz de colágeno associada com a BMP. Para a utilização de carreador de colágeno associado à BMP-2, mostrou-se necessária a utilização de uma quantidade trinta vezes menor da proteína (TAKAOKA et al., 1988; ZOU et al., 2005; QUINLAN et al., 2015).

1.4.3.2 Elastina

O tecido elástico possui dois componentes morfológica e quimicamente distintos - elastina e microfibrilas. Elastina compreende aproximadamente 90% das fibras elásticas e forma seu núcleo central. A estrutura das matrizes elásticas difere entre os tecidos e sua função é consequência de sua composição e arquitetura. Na cartilagem, as fibras elásticas são organizadas em uma larga configuração tridimensional em favo de mel. A elastina é uma proteína importante da matriz extracelular, proporcionando elasticidade e resiliência a vários tecidos, além de ser um biopolímero extremamente durável, estável e insolúvel. É formada pela ligação cruzada de seu precursor tropoelastina e sua degradação é extremamente lenta,

devido à extensa reticulação de tal precursor dentro da fibra elástica (MITHIEUX; WEISS, 2005).

A necessidade do reparo de diferentes tecidos tem levado ao desenvolvimento de novos biomateriais, com a intenção de mimetizar o ambiente celular nativo, além de possuir propriedades mecânicas apropriadas como força e elasticidade. Consequentemente, pesquisas a partir da matriz extracelular tornou-se uma grande área de atenção. O requisito da propriedade elástica no reparo tecidual e das diversas propriedades biológicas da elastina tem causado crescente interesse no desenvolvimento de matrizes à base de elastina, entre elas membranas desvitalizadas devidadas de bovinos (GOISSIS et al.; 2000). Propostas para utilização de biomateriais à base de elastina incluem: prótese de parede vascular (EFTHYMIU; WEIR; TIMMIS, 2012), matrizes para formação de tecido cartilaginoso (ROSOWSKI et al., 2006) e matrizes para osteoindução, entre outras (MIRANDA-NIEVES; CHAIKOF, 2017).

A presença de elastina em matrizes de colágeno é capaz de reduzir a formação de fibrose e evitar respostas inflamatórias. Além disso, a elastina tem forte tendência de calcificação, cuja utilização é muito favorável e aceleradora na regeneração óssea, além de apresentar característica favorável à biodegradabilidade (GARCIA et al., 2009; AMRUTHWAR; PUCKETT; JANORKAR, 2013).

Membranas a base de elastina ou materiais revestidos de elastina apresentaram em estudos *in vitro* (AMRUTHWAR; PUCKETT; JANORKAR, 2013; TEJEDA-MONTES et al., 2014; GURUMURTHY; BIERDEMAN; JANORKAR, 2016) e *in vivo* (RAPHEL et al., 2016; GALDEANO, 2017) a possibilidade de serem utilizadas para aplicação em osteorregeneração, por promover adesão e proliferação celular e mineralização local. Além de demonstrar potencial como scaffold para BMP (MCCARTHY; YUAN; KORJA, 2016).

A membrana de elastina, como a produzida para esta pesquisa, é pioneira em estudos de osteorregeneração, sendo de grande valia sua comparação com membranas já reconhecidas com potencial osteogênico, como a membrana aniônica de colágeno, associadas ou não a substâncias também reconhecidas no processo de osteorregeneração como a BMP-2 e hidroxiapatita.

1. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar de forma qualitativa e quantitativa a contribuição das matrizes de elastina e colágeno associadas ou não à hidroxiapatita e proteína morfogenética óssea no processo de consolidação óssea, quando utilizadas no preenchimento de defeitos ósseos provocados no fêmur distal de ratos.

2.2. Específicos

- Avaliar a biocompatibilidade dos materiais utilizados no reparo de defeitos no fêmur distal em ratos, através da análise clínica e patológica das condições macroscópicas, radiográficas e microscópicas da área cirúrgica;
- Avaliar a reabsorção do biomaterial simultaneamente ao processo de osteogênese na área cirúrgica;
- Caracterizar a morfologia do tecido ósseo neoformado na área da lesão;
- Quantificar o volume relativo de osso jovem na lesão óssea;
- Estabelecer qual biomaterial isolado ou combinado apresenta a melhor capacidade quanto ao estímulo do processo de reparo ósseo;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Preparo dos biomateriais

As matrizes de elastina, colágeno e a hidroxiapatita foram confeccionadas e fornecidos pela professora Dra. Ana Maria Guzzi Plepis e Dra. Virginia Conceição Amaro Martins, Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (IQSC) (vide anexo A). A BMP utilizada foi a *recombinant human* BPM-2 (R&D system inc., Minneapolis, MN, USA), (Figura1):

Figura 1: Imagens macroscópicas dos biomateriais

A figura 1 mostra a Membrana de elastina ou colágeno (M); Hidroxiapatita em grânulos finos(HA); Proteína morfogenética óssea (BMP) (MORAES, 2017).

3.2 Animais

Para realização desse trabalho foram utilizados 77 ratos machos (*Rattus norvegicus*, Wistar), com 16 semanas de idade e com peso médio de 330 g, fornecidos pelo Biotério da Granja R.G. (Suzano, SP) e do IPEN (Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares) e mantidos no biotério da Faculdade de Medicina de Jundiaí, Jundiaí-SP, Brasil. Foram alojados 4 animais em cada caixa e receberam ração balanceada (Purina-Nestlé Brasil Ltda) e água *ad-libitum*. O ambiente teve a temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e fotoperíodo claro/escuro de 12/12 horas, sendo o início do período de claro às sete horas da manhã. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Jundiaí (protocolo 62/2015) (Anexo B).

3.3 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em 7 grupos com 11 animais cada e distribuídos da seguinte maneira (Figura 2):

Grupo 1 (G1-C) Controle: Ratos com defeito no fêmur direito e sem preenchimento;

Grupo 2 (G2-E24/37): Ratos com defeito no fêmur direito, preenchido com membrana de elastina 24 h a 37°C;

Grupo 3 (G3-E24/37+HA): Ratos com defeito no fêmur direito, preenchido com membrana de elastina 24 h a 37°C + hidroxiapatita;

Grupo 4 (G4-E24/37+BMP): Ratos com defeito no fêmur direito, preenchido com membrana de elastina 24 h a 37°C + BMP;

Grupo 5 (G5-C24/25): Ratos com defeito no fêmur direito, preenchido com membrana de colágeno da serosa de intestino porcino 24 h a 25°C;

Grupo 6 (G6-C24/25+HA): Ratos com defeito no fêmur direito, preenchido com membrana de colágeno da serosa de intestino porcino 24 h a 25°C + hidroxiapatita;

Grupo 7 (G7-C24/25+BMP): Ratos com defeito no fêmur direito, preenchido com membrana de colágeno da serosa de intestino porcino 24 h a 25°C + BMP

Figura 2: Planejamento experimental

A figura 1 mostra a divisão dos grupos de estudo e biomateriais utilizados

3.4. Procedimentos Cirúrgicos

3.4.1. Técnica Anestésica e Cirúrgica

Os animais foram anestesiados com solução de Xilazina (Vetaset® - Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas-SP, Brasil), um sedativo, analgésico e relaxante muscular; e Ketamina (Dopalen® - Agibrands do Brasil LTDA- Campinas-SP, Brasil), na proporção de 1:1. Esta solução foi aplicada na dose de 1 mL/kg de massa corpórea, via intramuscular na região glútea (CUNHA et al., 2008). Após assepsia e antissepsia da região da pata traseira direita, usando degermante Riohex 2% e solução alcoólica 70%, foi realizada incisão mediana anterior na coxa direita com acesso para patelar medial e subluxação lateral da patela e mecanismo extensor. O periósteo foi incisado e descolado com rugina para manter sua integridade e reparo ao final da cirurgia. Na região supracondiliana, na sua superfície anterior, foi realizada uma lesão de 3 mm de diâmetro através de uma broca cirúrgica do tipo trefina,

acoplada à caneta de um mini-motor (ELTEC LB-100- Eltec Elektronik AG, Mainz, Alemanha), até atingir o canal medular (Figura 3) (FRANCO et al, 2013).

Durante este procedimento, a área foi continuamente irrigada com solução fisiológica para evitar o aquecimento local e lesões no tecido. Após a obtenção da cavidade, seu conteúdo medular foi curetado e aspirado através de material cirúrgico apropriado. Em seguida foram implantadas as substâncias estudadas nesta pesquisa, exceto no grupo controle (grupo 1). Primeiramente foi colocado a membrana de colágeno ou elastina e superficialmente à estas, depositou-se 5 µg de BMP-2 ou uma quantidade de HA suficiente para o preenchimento de todo o defeito. Também foi feita a colocação de gazes embebidas em solução de soro fisiológico a 0,9% em ambos os olhos dos animais, durante a cirurgia, para prevenir o ressecamento das córneas.

Figura 3: Procedimento cirúrgico para criação de falha óssea no fêmur de ratos.

(A) Incisão cutânea na pata traseira direita do rato; (B) Incisão para-patelar medial; (C) Exposição do terço distal do fêmur; (D) Criação do defeito ósseo de 3mm de diâmetro com broca trefina; (E) Deposição da BMP ou grânulos de hidroxiapatita; (F) Processo de enxertia com membrana de elastina ou colágeno. Fonte: autoria própria.

3.4.2. Sutura dos Tecidos e Medicação

Após a cirurgia, procedeu-se à sutura dos tecidos, sendo o periósteo e a pele reposicionados e suturados com fio de seda 5.0 (Ethicon®, Johnson & Johnson, São José dos Campos-SP, Brasil). Em seguida, cada animal recebeu uma dose de 0,1 mg/100 g de peso do antibiótico Pentabiotic Veterinário Pequeno Porte (Vetaset® - Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas-SP, Brasil). No local da ferida cutânea da região cirúrgica foi aplicado o antibiótico Rifamicina spray (EMS - Hortolândia-SP, Brasil). Também foi dada uma dosagem de analgésico paracetamol na dose de 200

mg/kg de peso do animal, por via oral, duas a três vezes por dia (LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2009).

3.5. Controle Pós-Operatório

Os animais operados ficaram isolados em gaiolas, sob observação constante e receberam ração comum e água *ad libitum*. Realizou-se a limpeza de suas caixas com a troca da maravalha três a quatro vezes na semana. Os animais foram monitorados constantemente no pós-cirúrgico, tomando-se os cuidados com os fatores de estresse e de dor (LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2009).

3.6. Morte indolor induzida dos animais

Os animais foram induzidos a morte com 6 semanas de pós-operatório. Esse tempo foi determinado pois é um período suficiente para se analisar a neoformação óssea sem que ocorra total fechamento da falha produzida, o que dificultaria a análise comparativa entre os grupos. A morte dos animais foi realizada através da aplicação de alta dosagem de anestésico (xilazina e ketamina) via intraperitoneal, seguido de um pneumotórax através da secção do musculo diafragma por acesso abdominal. Após constatado a morte dos animais, as áreas cirúrgicas foram submetidas às análises macroscópica, histomorfométrica e biomecânica, conforme a sequencia das etapas de análises padronizadas.

3.7. Métodos de análises do reparo ósseo das áreas cirúrgicas

As análises dos achados foram realizadas em 2 etapas conforme a seguir:

Etapas 1: macroscópica, radiológica e histológica por luz óptica e polarizada. Nesse processo foram utilizados 7 ratos de cada grupo.

Etapas 2: mineralização da matriz óssea e marcadores fluorocromáticos da neoformação óssea através do microscópio de fluorescência. Para esta análise, utilizaram-se 4 animais de cada grupo.

3.7.1 Etapa 1

3.7.1.1 Análise Macroscópica

Para a coleta das amostras após a morte indolor induzida dos animais, procedeu-se a uma incisão longitudinal na pele da pata traseira esquerda, expondo a área cirúrgica receptora do terço distal do fêmur esquerdo. Em seguida, a região foi exposta e foto documentada, avaliando a presença de alguma alteração patológica ou qualquer outra condição anormal. Posteriormente, o fêmur direito foi removido para ser radiografado com equipamento digital.

3.7.1.2 Análise Radiológica

As amostras foram radiografadas utilizando um equipamento aparelho Odel, reveladora digital CR-30X® AGFA (Agfa HealthCare – EUA) com técnica de 300 mA, 0,05 mAs e 40 kV em todas amostras. O objetivo foi avaliar visualmente a integridade da falha (lesão) óssea, bem como a regeneração através do aspecto radiopaco e radiolúcido da área do implante (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979).

3.7.1.3 Análise Histológica por microscopia de luz transmitida

Após as análises macroscópicas e radiológicas, as amostras foram enviadas ao Laboratório de Patologia Básica da Faculdade de Medicina de Jundiaí, para os procedimentos histológicos. Inicialmente, os espécimes foram imersos no fixador de medula óssea (Allkimia - Campinas-SP, Brasil) por 10 dias e em seguida no descalcificador (Allkimia - Campinas-SP, Brasil). Após o período de descalcificação, que variou de 7 a 10 dias, a ação do ácido foi neutralizada por 24 horas em uma solução de sulfato de sódio a 5%.

Finalizado o processo de descalcificação, foi realizada a redução macroscópica com navalha da área enxertada e descartadas as partes ósseas que não estavam em contato com o implante. Após a redução da amostra, o bloco ósseo contendo o implante foi inserido em cassete histológico para a desidratação do material, conforme figura 4.

Figura 4: Procedimento de redução da área enxertada e preparação para histologia.

(A) Macro amostra do fêmur com implante; (B) Corte transversal com navalha de micrótomo 1mm acima da área enxertada; (C) Corte transversal 1 mm abaixo da área enxertada; (D) Inclusão da micro amostra em cassete histológico. Fonte: autoria própria.

A desidratação ocorreu em série crescente de álcoois: 70% (*overnight*), 80%, 85%, 90%, 95% e 100%. A seguir, as amostras foram colocadas em partes iguais de álcool e xilol (*overnight*) e diafanizadas em xilol, com trocas a cada duas horas, sendo executadas três trocas e em seguida, incluídas em parafina. De cada amostra, foram realizados cortes semi-seriados de 5 μ m de espessura em três pontos diferentes da amostra, para a qualificação e quantificação da regeneração óssea ao longo de toda a área cirúrgica, conforme Figura 5.

Figura 5: Planos de cortes transversais sobre a área enxertada do fêmur distal do rato.

Corte 1: borda distal da área cirúrgica. Corte 2: centro da área cirúrgica. Corte 3: borda proximal da área enxertada. Fonte : autoria própria.

Em seguida, os cortes foram afixados em lâmina histológica, seguida de desparafinização em estufa a 80°C por 40 min e xilol por 15 min, seguida de desidratação em álcool absoluto e corados com os seguintes marcadores histológicos:

- Hematoxilina e Eosina: para marcação do tecido ósseo original e osso neoformado;
- Tricrômico de Masson: para diferenciação do osso maduro original corado em vermelho e do osso neoformado (jovem) que se cora em azul. Esta técnica, tradicional para tecido conjuntivo, cora também fibras colágenas em azul, destacando-as dos outros elementos do tecido;
- Método histoquímico de Picrosírius Red: (solução aquosa saturada de ácido pícrico adicionada de 0,1 g de vermelho da Síria F3b, Sírius red F3B-Bayer) para avaliação dos constituintes fibrilares da matriz extracelular na área da lesão óssea com o uso da Luz Polarizada do Microscópio.

3.7.1.4 Análise Qualitativa da Osteogênese

A análise qualitativa dos cortes histológicos da área do enxerto permitiu avaliar o processo do reparo da falha óssea através da observação das características do osso neoformado. Foi utilizado Fotomicroscópio Motic BA310 do Laboratório de Estudo de Plasticidade Óssea (LEPO) do Departamento de de Morfologia e Patologia Básica da Faculdade de Medicina de Jundiaí, Jundiaí-SP, Brasil. As imagens digitais foram analisadas com objetivas de 40, 100, 200, 400 vezes de aumento.

3.7.1.5 Análise Morfométrica da Osteogênese

Através de *software* Motic BA310 em fotomicroscopia com 40 vezes de aumento, foi procedida a quantificação morfométrica da osteogênese. A partir da identificação das margens da lesão, foram traçadas linhas guia com a mesma largura do osso original e reproduzidas ao longo da falha óssea, mimetizando a continuidade do tecido cortical. Em seguida, foi demarcada a extensão do defeito crítico e obtida a Área total da lesão (Figura 6A).

Posteriormente, foram demarcadas manualmente com ferramenta de precisão do próprio software, para identificação da Área total de neoformação (Figura 6B). Logo após, demarcou-se as Áreas ausentes em neoformação, para que pudessem ser desconsideradas das áreas de neoformação (Figura 6C). Finalmente, através de cálculo matemático simples (Figura 6D), obteve-se o percentual relativo de osso neoformado para cada corte histológico. Este método foi repetido para os três níveis de corte de cada amostra que posteriormente, foi calculada a média e desvios-padrão dos percentuais de osso neoformado de cada grupo de estudo.

Figura 6: Demarcação morfométrica da osteogênese na área cirúrgica.

Fonte: Autoria própria. Aumento 40 X.

3.7.2 Etapa 2

3.7.2.1 Análise Qualitativa por Microscopia de Fluorescência

- Fluorescência óssea: para identificação das fases da regeneração óssea, foi dividida em 3 períodos: do pós-cirúrgico imediato até o décimo primeiro dia; do décimo segundo dia ao vigésimo terceiro dia; do vigésimo quarto dia ao trigésimo sexto dia. Em cada um destes períodos foram aplicados marcadores fluorocromáticos via injeção subcutânea na região do dorso do rato, conforme Quadro 1 abaixo:

Tabela 1. Sequência de injeção de marcadores fluorocromáticos. Extraído e modificado de König et al., (2010).

Semanas (pós-cirurgia)	Marcador	Solução Injetada via subcutânea (kg)
0	Alizarina	30 mg + 1 mL soro + 20 mg de Na ₂ HPO ₄
1	Alizarina	30 mg + 1 mL soro + 20 mg de Na ₂ HPO ₄
2	Calceína	10 mg + 1 mL soro + 20 mg de Na ₂ HPO ₄
3	Calceína	10 mg + 1 mL soro + 20 mg de Na ₂ HPO ₄
4	Tetraciclina	60 mg + 1 mL soro + 20 mg de Na ₂ HPO ₄
5	Tetraciclina	60 mg + 1 mL soro + 20 mg de Na ₂ HPO ₄
6	Sacrifício	

A alizarina irá conferir ao osso, neoformado na coloração vermelha, a calceína será observada pela coloração verde e a tetraciclina em tons amarelos e castanhos (König et al.; 2010).

3.7.2.2 Análise da Mineralização Óssea por Microscopia de Luz Transmitida

- Método histoquímico Von Kossa: Permite a identificação de focos de mineralização em tecidos, através da marcação dos íons de cálcio por nitrato de prata. As amostras foram fixadas em formol 10% e incluídas em blocos de resina acrílica composta por glicolmetacrilato. Os blocos contendo as amostras foram cortados transversalmente com espessura de 300 µm em micrótomo e posteriormente, foram reduzidas em lixadeira automática até serem obtidos cortes seriados com 30 µm de espessura. Os cortes foram aderidos em lâminas

histológicas para técnica histoquímica (KONIG JR., 2010.). As amostras foram hidratadas em água corrente durante 5 minutos e lavadas 3 vezes em água destilada. Em seguida, foi depositada uma solução de nitrato de prata sobre as lâminas histológicas, composta por 5 g de nitrato de prata em 100 mL de água destilada. As lâminas foram expostas à luz ultravioleta durante 1 hora e lavadas em água destilada. Após este processo, foram mergulhadas em solução de tiosulfato de sódio 5 g diluído em 100 mL de água destilada e imediatamente, lavadas em água destilada. Este processo confere colorações róseas e negras, referentes ao citoplasma e íons de cálcio respectivamente. Os núcleos celulares foram contra-corados por imersão de 5 minutos em solução composta por 0,1 g de Safranina, 1,0 mL Ácido acético glacial e 99 mL de água destilada, atribuindo coloração avermelhada. Finalmente, as amostras em lâminas histológicas foram desidratadas, diafanizadas e montadas para posterior análise por microscopia de luz óptica transmitida (MORETTI et al., 2017).