FLÁVIA CORREIA FUSO OTTOBONI

**Estudo comparativo da biocompatibilidade *in vivo* de
matrizes acelulares de pericárdio bovino e porcino**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades 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 a obtenção do título de mestre em Ciências

Área de Concentração: Bioengenharia

Orientador: Profª. Dr. Ana Maria de Guzzi Plepis

São Carlos
2010

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.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

091e	<p>Ottoboni, Flávia Correia Fuso</p> <p>Estudo comparativo da biocompatibilidade <i>in vivo</i> de matrizes acelulares de pericárdio bovino e porcino / Flávia Correia Fuso Ottoboni; orientadora Ana Maria de Guzzi Plepis. -- São Carlos, 2010.</p> <p>Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Interunidades e Área de Concentração em Bioengenharia -- Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2010.</p> <p>1. Pericárdio animal. I. Título.</p>
------	---

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia
EESC / FMRP / IQSC

FLÁVIA CORREIA FUSO OTTOBONI
MESTRADO EM CIÊNCIAS
ÁREA DE BIOENGENHARIA

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

Aprovado em: 01/02/2011

PROFA. DRA. ANA MARIA DE GUZZI PLEPIS
(ORIENTADORA)

Instituto de Química de São Carlos - USP

Resultado: aprovada

Assinatura: Ana Maria de Guzzi Plepis

PROFA. DRA. ANA MARIA MINARELLI
GASPAR

Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho"

Resultado: APROVADA

Assinatura: Amy

PROF. DR. MÁRCIO DE PAULA

Instituto de Química de São Carlos - USP

Resultado: Aprovada

Assinatura: Marcio

Agradecimentos

A minha orientadora Profa. Dr. Ana Maria de Guzzi Plepis.

Em especial aos meus pais Mara e Wallace que acreditaram e me apoiaram nessa busca pelo conhecimento.

Ao meu marido Sandro pela ajuda incondicional, compreensão e carinho.

Ao professor Evertom Regonato pela ajuda na manipulação dos animais.

Ao Hospital Veterinário da Universidade de Rio Preto – UNIRP, que nos cedeu o biotério e estrutura para a prática do trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação em Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos.

Ao laboratório de histologia animal da UNESP de São José do Rio Preto.

A aluna Fabiana Tessari Rodrigues pelo material cedido.

Ao Laboratório de Bioquímica e Biomateriais do Instituto de Química de São Carlos, em especial a Dra Virginia C. A. Martins.

Resumo

OTTOBONI, Flávia. **Estudo comparativo da biocompatibilidade *in vivo* de matrizes acelulares de pericárdios bovino e porcino**. 2010. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia (EESC/FMRP/IQSC), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

As matrizes acelulares são utilizadas na engenharia de tecidos com o objetivo da reconstrução ou substituição de tecidos danificados. Nesse trabalho matrizes acelulares foram preparadas a partir de pericárdio porcino e pericárdio bovino, por possuírem uma grande quantidade de colágeno tipo I, usando-se ao tratamento de hidrólise alcalina nos tempos de 12 e 24 horas. Essas matrizes foram desenvolvidas para serem utilizadas como barreiras de proteção no processo de cicatrização de feridas como também na indução de formação de tecidos ósseos. Foram submetidas ao teste de biocompatibilidade *in vivo*, com a implantação das matrizes no subcutâneo de 65 ratos Wistar, machos, adultos que sofreram eutanásia aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias de pós-operatório. A avaliação microscópica no 7º dia mostrou existência da matriz e uma grande quantidade de infiltrado inflamatório em volta do material, sendo que ao 14º dias além do infiltrado inflamatório, foi observado uma neovascularização. Aos 21º e 28º dias foi observado uma diminuição gradual do infiltrado inflamatório, crescimento celular no local em que as fendas se formaram nas matrizes e uma grande revascularização. Ao 35º dias a matriz de pericárdio bovino e porcino foram reabsorvidas totalmente. Comparando o pericárdio bovino com o porcino tratado por 12 e 24 horas em relação ao tempo de degradação, foi observado que as matrizes tanto bovina como a porcina tratadas por 24 horas degradaram mais rápido que as tratadas por 12 horas. Portanto as matrizes de pericárdio bovino e porcino são biocompatíveis, pois não causaram reações citotóxicas, reações inflamatórias e nem imunológica adversa.

Palavras-Chave: Matrizes de colágeno, pericárdio porcino, pericárdio bovino, biocompatibilidade.

Abstract

OTTOBONI, Flávia. **In vivo Biocompatibility Study of Acellular Bovine and Porcine Pericardium Matrices**. 2010. 90 f. Thesis (MA) – Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia (EESC/FMRP/IQSC), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

Acellular matrices are used in tissue engineering for reconstruction or replacement of damaged tissues. In this study acellular matrices were developed using porcine pericardium and bovine pericardium, which contain a large quantity of type I collagen, using an alkaline hydrolysis treatment at the times of 12 hours and 24 hours. The matrices were developed to be used as protective barriers in the process of wound healing, and also in bone tissue inducing formation. In the test of *in vivo* biocompatibility, matrices were implanted subcutaneously in 65 adult male Wistar rats, sacrificed at 7, 14, 21, 28 and 35 days postoperatively. The microscopic evaluation on day 7 showed a large amount of inflammatory infiltrate around the material; at the 14th day, beyond the inflammatory infiltrate was observed a neovascularization. At 21st and 28th days were observed a gradual decrease in the inflammatory infiltrate, cellular growth and a large neovascularization. By day 35, porcine and bovine pericardium matrices were completely resorbed. Comparing the degradation time between the matrices treated with 12 and 24 hours, it was observed that both matrices treated for 24 h, degraded faster than those treated for 12 hours. Both matrices are biocompatible, do not cause cytotoxic reactions, inflammatory or immune adverse reactions.

Keywords: Collagen matrices, porcine pericardium, bovine pericardium, biocompatibility.

Lista de Figuras

FIGURA 1: Classificação dos defeitos ósseos de acordo com o número de paredes (a) uma, (b) duas, (c) três.....	19
FIGURA 2: Esquema representando o tecido Pericárdio	22
FIGURA 3: Esquema da hélice tripla da molécula de colágeno.....	24
FIGURA 4: Esquema da hidrólise alcalina dos resíduos de asparginas e glutaminas da molécula de colágeno.....	25
FIGURA 5: Esquema da preparação das matrizes acelulares PP e PB.....	28
FIGURA 6: sequência da técnica cirúrgica.....	31
6 A: Animal com anestesia com máscara	31
6 B: Incisão e exposição do tecido subcutâneo	31
6 C: Colocação do material na bolsa confeccionada no subcutâneo.....	31
6 D: Sutura da área e assepsia pós operatória	31
FIGURA 7: Fotografia digital das matrizes de pericárdio bovino	36
7 A: PB12(matriz de pericárdio bovino tratada por 12h).....	36
7 B: PB24 (matriz de pericárdio bovino tratada por 24h).....	36
FIGURA 8: Fotografia digital das matrizes de pericárdio porcino.....	37
8 A: PP12 (matriz de pericárdio porcino 12h)	37
8 B: P B24 (matriz de pericárdio porcino 24h)	37

FIGURA 9: Corte histológico com 7 dias.....	39
9 A: Animal Controle, HE (7 dias)	39
9 B: Animal Controle, HE (7 dias) seta amarela hemácias, seta verde macrófagos.....	39
FIGURA 10: Pericárdio porcino 12h.....	40
10 A: PP 12h, WG (7 dias)	40
10 B: PP 12h, HE (7 dias) seta amarela hemácias e vasos sanguíneos, seta verde macrófagos.....	40
FIGURA 11: Pericárdio porcino 24h.....	41
11 A: PP 24h, HE (7 dias) seta amarela hemácia e seta azul matriz implantada.....	41
11 B: PP 24h, HE (7 dias) seta verde macrófagos.....	41
FIGURA 12: Pericárdio bovino 12h.....	43
12 A: PB 12h, WG (7 dias).....	43
12 B: PB 12h, HE (7 dias).....	43
FIGURA 13: Pericárdio bovino 24h.....	44
13 A: PB 24h, WG (7 dias).....	44
13 B: PB 24h, WG (7 dias).....	44
FIGURA 14: Comparação em porcentagem da quantidade de material implantado, coletado com 7 dias.....	45
FIGURA 15: Corte histológico com 14 dias.....	46

15 A: Animal Controle, HE (14 dias)	46
15 B: Animal Controle, HE (14 dias).....	46
FIGURA 16: Pericárdio porcino 12h	47
16 A: PP 12h, WG (14 dias)	47
16 B: PP 12h, WG (14 dias).....	47
FIGURA17: Pericárdio porcino	48
17 A: PP 24h, HE (14 dias).....	48
17 B: PB 24h, HE (14 dias).....	48
FIGURA 18: Pericárdio bovino 12h	49
18 A: PB 12h, WG (14 dias)	49
18 B: PB 12h, WG (14dias) seta roxa tecido muscular.....	49
FIGURA 19: Pericárdio bovino 24h	50
19 A: PB 24h, WG (14 dias).....	50
19 B: PB 24h, HE (14 dias) seta laranja cápsula delgada, seta verde célula gigante....	50
FIGURA 20: Comparação em porcentagem da quantidade de material implantado, coletado com 14 dias	52
FIGURA 21: Corte histológico com 21 dias.....	53
21 A: Animal Controle, HE (21 dias) seta amarela fibras do tecido conjuntivo, seta azul vasos sanguíneos	53

21 B: Animal Controle, HE (21 dias).....	53
FIGURA 22: Pericárdio porcino 12h	54
22 A: PP 12h, WG (21 dias).....	54
22 B: PP 12h, WG (21 dias) seta amarela matriz.....	54
FIGURA 23: Pericárdio porcino 24h	55
23 A: PP 24h, WG (21 dias) seta laranja cápsula.....	55
23 B: PP 24h, WG (21 dias) seta verde fenda na matriz.....	55
FIGURA 24: Pericárdio bovino 12h	56
24 A: PB 12h, WG (21 dias)	56
24 B: PB 12h, WG (21 dias) seta amarela fendas na matriz.....	56
FIGURA 25: Pericárdio bovino 24h	57
25 A: PB 24h, WG (21dias) , seta verde tecido muscular.....	57
25 B: PB 24h, WG (21dias) seta amarela matriz	57
FIGURA 26: Comparação em porcentagem da quantidade de material implantado, coletado com 21 dias	59
FIGURA 27: Corte histológico com 28 dias.....	60
27 A: Animal Controle, HE (28 dias)	60
27 B: Animal Controle, HE (28 dias)	60
FIGURA 28: Pericárdio porcino 12h	61

28 A: PP 12h, WG (28 dias) seta preta fendas na matriz.....	61
28 B: PP 12h, WG (28 dias)	61
FIGURA 29: Pericárdio porcino 24h	62
29 A: PP 24h, WG (28 dias) seta azul tecido conjuntivo neoformado	62
29 B: PP 24h, WG (28 dias)	62
FIGURA 30: Pericárdio bovino 12h	63
30 A: PB 12h, WG (28 dias) seta amarela matriz	63
30 B: PB 12h, WG (28 dias) seta amarela matriz	63
FIGURA 31: Pericárdio bovino 24h	64
31 A: PB 24h, WG (28 dias) seta verde tecido conjuntivo neoformado.....	64
31 B: PB 24h, WG (28 dias) seta verde tecido conjuntivo neoformado	64
FIGURA32: Comparação em porcentagem da quantidade de material implantado, coletado com 28 dias	66
FIGURA 33: Corte histológico com 35 dias.....	67
33 A: Animal Controle, HE (35 dias) seta verde substância fundamental amorfa, seta amarela fibras do tecido conjuntivo, seta azul vasos sanguíneos.....	67
33 B: Animal Controle, HE (35 dias).....	67
FIGURA 34: Pericárdio porcino 12h	68
34 A: PP 12h, HE (35 dias) seta azul metaplasia cartilaginosa	68

34 B: PP 12h, HE (35 dias) seta laranja paniculite crônica	68
FIGURA 35: Pericárdio porcino 12h	69
35 A: PP 24h, WG (35 dias) seta verde tecido conjuntivo neoformado	69
35 B: PP 24h, HE (35 dias)	69
FIGURA 36: Pericárdio bovino 12h	70
36 A: PB 12h, WG (35 dias) seta verde tecido conjuntivo neoformado	70
36 B: PB 12h, WG (35 dias) seta verde tecido conjuntivo neoformado	70
FIGURA 37: Pericárdio bovino 24h	71
37 A: PB 24h, WG (35 dias) seta verde tecido conjuntivo neoformado	71
37 B: PB 24h, WG (35 dias) seta verde tecido conjuntivo neoformado	71
FIGURA 38: Gráfico da trajetória de degradação pós-implante do pericárdio porcino 12h e 24h	74
FIGURA 39: Gráfico da trajetória de degradação pós-implante do pericárdio bovino 12h e 24h	75
FIGURA 40: Corte histológico do pericárdio porcino	85
40 A: nativo	85
40 B :matriz após hidrolise alcalina, HE	85

Lista de Tabelas

Tabela 1: Resultados da avaliação da resposta tecidual.....	73
Tabela 2: Trajetória de degradação pós-implante do Pericárdio porcino 12h e 24h.....	75
Tabela 3: Trajetória de degradação pós- implante do Pericárdio bovino 12h e 24h.....	76
Tabela 4: Espessura das matrizes derivadas de pericardio porcino	85
Tabela 5: Porcentagens de degradação enzimática das matrizes de PP e PB	87

Lista de Símbolos e Abreviações

AAP - Associação Americana de Periodontia

Asn - Asparagina

Col - Colágeno

COOH - Ácidos Carboxílicos.

Gln - Glutamina

Gly-X-Y - Triplete

Hyp - Hidroxiprolina

MTT - 4,5-dimetil/Trazol-2-il-2,5-difinil brometo de tretazolio

PB - Pericárdio Bovino.

PP - Pericárdio Porcino

PB12 - Matriz de pericárdio bovino tratado por 12 horas.

PB24 - Matriz de pericárdio bovino tratado por 24 horas.

PP12 - Matriz de pericárdio porcino tratado por 12 horas.

PP24 - Matriz de pericárdio porcino tratado por 24 horas

PvPi - Iodo Povidine

PBS –Tampão fosfato salino (phosphate buffer saline)

Pro - Prolina

SFB - Soro fetal bovino

Sumário

AGRADECIMENTO

RESUMO

ABSTRAT

LISTA DE FIGURA

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Biomateriais	19
1.2. Colágeno como Biomaterial.....	22
1.3. CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS	23
1.3.1. Colágeno Tipo I.....	23
2. OBJETIVOS.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. Material	27
3.2. Preparação das Matrizes.....	27
3.3. Caracterização	28
3.4. Avaliação Biológica	29
3.4.1. Biocompatibilidade In Vivo	29
3.5. Análise Histológica	32
3.6. Verificação das lâminas na análise histológica	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1 Matrizes.....	35
4.2 Biocompatibilidade <i>in vivo</i>	38
4.3 GRUPO 1: 7 dias.....	39
4.4 GRUPO 2: 14 dias.....	46
4.5 GRUPO 3: 21 dias.....	53
4.6 GRUPO 4: 28 dias.....	60
4.7 GRUPO 5: 35 dias.....	67
5 CONCLUSÕES	77
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

ANEXO A	84
Ensaio de estabilidade biológica	84
ANEXO B	87
Citotoxicidade in Vitro	87
ANEXO C	88
Coloração Hematoxilina e Eosina	88
ANEXO D	90

Introdução

Com o avanço da tecnologia na área da saúde, com o propósito de proporcionar tratamentos que antes não eram possíveis, surgiu a engenharia de tecidos, que, num âmbito maior, veio a desenvolver uma medicina regenerativa (SOARES, 2005).

Um defeito ou mau funcionamento de um órgão ou tecido trazia severos problemas de saúde ao ser humano, sendo que esses eram removidos devido a poucos recursos existentes em relação aos tratamentos, o que levava a um significativo decréscimo da qualidade de vida do paciente. Sendo assim, a engenharia de tecido vem sendo usada para proporcionar tratamentos curativos e devolver função e estética a esses pacientes.

Com o crescimento da expectativa de vida e o desenvolvimento da engenharia de tecidos, há um aumento no interesse de desenvolver materiais biodegradáveis e biocompatíveis para regeneração de tecidos (ANGELE et al, 2000).

Tendo como objetivo a reconstrução ou a substituição desses tecidos danificados, a engenharia de tecido produz produtos que tentam mimetizar osso, pele, cartilagem, etc. os quais são usados na odontologia, em cirurgias ortopédicas, em cirurgia bucomaxilofacial, devolvendo aos pacientes uma qualidade de vida melhor (CURTIS; RIEHLE, 2001). Na odontologia, em especial em regiões de lesões bucais crônicas, câncer e outros tipos de feridas que causam danos aos tecidos, os tratamentos atuais ainda são insuficientes para curar totalmente estas lesões e evitar a formação de cicatrizes (MIDDELKOOP et al, 2004). Além disso, essas feridas podem levar a uma perda tecidual extensa e o processo de cicatrização pode não ser suficiente para que ocorra a cura, devendo-se considerar, então, o tratamento com enxertos (HOYAMA et al, 2005).

Essa reposição, segundo Bermard, pode ser concretizada utilizando-se diferentes tipos de enxerto: Autógeno, Alógeno, Aloplástico, Xenógeno.

- Autógeno (proveniente do próprio indivíduo) - é uma referência devido as suas

vantagens biológicas e seu potencial osteogênico. Mas devido a uma série de inconvenientes como o período de recuperação, morbidade e susceptibilidade a infecções no sítio doador e uma reabsorção progressiva e constante, estimulou-se a busca por novos materiais (GOSAIN, 1997);

- Alógeno (proveniente de outro indivíduo da mesma espécie) - apesar do uso ser favorável, é necessário uma extensa conservação e seleção para diminuir a probabilidade, tanto da rejeição do enxerto, quanto da transmissão de doença (SIMOND et al, 1992);
- Xenógeno (materiais provenientes de outra espécie) - vem apresentando resultados promissores e mostra-se como uma alternativa à intervenção em um segundo leito cirúrgico (no caso do enxerto autógeno). Materiais como osso bovino, esponja de colágeno e membrana óssea são alguns exemplos que apresentam características favoráveis e são muito utilizados (YISHIKAWA, 2000);
- Aloplástico (materiais sintéticos) – muitos materiais podem ser usados, como os polímeros, as cerâmicas e os compósitos, servindo como material de preenchimento. Esses materiais podem permanecer no local de implante, ser reabsorvidos ou servir de matriz para deposição de tecido ósseo, dependendo de sua composição.

Os materiais de enxertos podem atuar através de três mecanismos: osteogênese, osteocondução e osteoindução:

- Osteogênese é quando ocorre o transplante de osteoblastos ou células precursoras de osteoblastos com o material de enxerto para o interior do defeito, onde forma centros de formação óssea. O material pode ser obtido com ou sem processamento, para enxertos de diferentes formas, incluindo fragmentos corticais, coágulos ósseos (mistura de partículas de osso obtidas usando-se instrumentos rotatórios com sangue do paciente), (GARA, 1981);
- Osteocondução ocorre quando o material de enxerto usado serve de arcabouço para que as células dos odontoblastos migrem para o interior do defeito, fazendo com que ocorra a substituição desse material ou a incorporação que é restrita à posição óssea na superfície desse material (LANG et al, 1994);

- Osteoindução ocorre quando o material de enxerto que possui fator de crescimento induz a formação de um novo osso pela diferenciação local das células mesenquimais indiferenciadas em células formadoras de osso, sob a influência de um ou mais agentes indutores. Vêm sendo muito usados por apresentarem bons resultados quanto à formação óssea, também diminuem o tempo cirúrgico, e dores pós-operatórias, evitando o segundo tempo cirúrgico. Ex: membrana óssea, membrana de pericárdio bovino, membrana de pericárdio porcino, (BOWERS et al, 1989; SIGURDSSON et al, 1994).

Materiais com função de osteocondução (esponja de colágeno, matriz óssea bovina) são muitos usados na prática odontológica, na técnica de Regeneração Tecidual Guiada (RTG), são usadas matrizes que possuem a função de barreiras, demonstraram ser efetivas por proteger fisicamente a área do defeito, impedindo a migração de células de tecidos conjuntivo gengival e epitelial adjacentes para dentro do coágulo sanguíneo, impedindo assim a neoformação óssea no local (KARRING. T, 1985; MELCHER A. H., 1987; NYMAN, 1980).

SCULEAN et al, 2000, relataram que a aplicação de xenoenxerto bovino e colágeno reabsorvível em pacientes com defeitos periodontais resultava em melhora significativa nos níveis de inserção clínica, com redução da profundidade de sondagem periodontal após 1 ano do tratamento.

De acordo com AAP (Associação Americana de Periodontia), um defeito ósseo periodontal refere-se que o dente é rodeado por uma, duas ou três paredes ou uma associação delas. Sendo assim GOLDMAN e CLOHEN (1958) as classificaram:

- Defeito intra-ósseo de uma parede: defeito limitado por uma parede óssea e a superfície do dente;
- Defeito intra-ósseo de duas paredes: defeito limitado por duas paredes ósseas e a superfície do dente;
- Defeito intra-ósseo de três paredes: defeito limitado por três paredes ósseas e a superfície do dente.

A figura 1 ilustra os defeitos ósseos e sua divisão de acordo com a classificação de Goldman e Clohen.

Figura 1- Classificação dos defeitos ósseos de acordo com o número de paredes, (a) uma, (b) duas, (c) três.

Com essa classificação os autores associaram técnicas de tratamento com matrizes absorvíveis e não absorvíveis, com o intuito de reparar os defeitos ósseos, onde através de um estudo feito usando defeitos ósseos e barreiras não absorvíveis resultou em ganhos no nível de inserção clínica de $3,7 \pm 1,8\text{mm}$; semelhante aos resultados obtidos no tratamento de defeitos intra-ósseos e barreiras de membranas absorvíveis ($3,6 \pm 1,5\text{mm}$). Com esses estudos dirigiram o resultado de avaliação da extensão e previsibilidade dos resultados clínicos dos defeitos ósseos, após a aplicação da técnica de RTG (Regeneração Tecidual Guiada). (CORTELLINI, PINI PRATO, TONETTI, 1996)

1.1. BIOMATERIAIS

Um biomaterial pode ser definido como qualquer substância ou a combinação de substâncias, de origem sintética ou natural, que pode ser utilizado por um período de tempo, para melhorar, aumentar ou substituir parcialmente ou inteiramente, tecidos ou órgãos. Quanto ao tipo de material, os biomateriais podem ser sintéticos (polímeros, metais, cerâmicas) ou naturais (colágeno, elastina, queratina); que são manufaturados ou processados para se adequarem à utilização em dispositivos médicos e odontológicos, sobretudo naqueles que são temporários ou permanentemente implantados no corpo humano (PARK, LAKES, 2007).

Os materiais a base de colágeno podem ser encontrados sob diversas formas, tais como: géis, esponjas, membranas, matrizes (RUSZCZAK, SCHWARTZ, 2000). Os biomateriais inicialmente foram desenvolvidos para que permanecessem inertes no organismo. Através de pesquisas, os cientistas conseguiram minimizar e prevenir reações

teciduais indesejáveis que ocorriam entre material e indivíduo. Com o tempo esses biomateriais foram produzidos para uma efetiva interação com os tecidos, provocando respostas fisiológicas como crescimento e diferenciação celular no local implantado (HUBBELL, 1995). Para que esses biomateriais sejam produzidos para comercialização, é necessária a realização de testes com critérios e responsabilidades os quais seguem as especificações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Food and Drug Administration (FDA), International Organization for Standardization (ISO).

A norma da ISO referente à área médica é a Norma 10993 (Avaliação biológica de dispositivos médicos), desenvolvida pelo Comitê Técnico 194 em parceria com outros comitês, que se divide em 18 partes, que vão desde a fabricação biomaterial, esterilização, armazenagem e a comercialização.

Na biocompatibilidade, correspondente a 6ª parte da norma (ISO 10993-6) denominada de teste dos efeitos locais após a implantação do material, a avaliação é caracterizada por natureza do contato corpóreo que se divide em tipo de categoria (dispositivo superfície, dispositivo comunicação externa, dispositivo de implantação) e tipo de contato (pele, membrana mucosa, superfície rompida ou comprometida, parte sanguínea indireta, tecido/osso/dentina, circulação sanguínea, sangue); de acordo com o período de contato no animal, é dividido em: A (limite) duração do material no animal é de até 24 horas; B (prolongado) duração do material no animal é a partir de 24 horas a 30 dias; C (permanente) corresponde a permanência acima de 30 dias no animal. Outro dispositivo que é avaliado é o efeito biológico que se subdivide de acordo com as necessidades que são: citotoxicidade, sensibilização, toxicidade sistêmica aguda, irritação ou reação intracutânea, toxicidade subaguda e sub-crônica, genotoxicidade, implantação, hemocompatibilidade, toxicidade crônica, carcinogêneses, reprodutivo, biodegradável.

O teste de citotoxicidade tem como objetivo determinar a resposta biológica de células de mamíferos *in vitro* com o uso de parâmetros biológicos adequados (ISO 10993-5), através da avaliação de dano celular por meios morfológicos e medições desses danos, do crescimento celular e de aspectos específicos do metabolismo celular. A norma oferece diversas opções de testes que podem ser de contato direto com o material, indireto ou utilizando extratos específicos. Todos estes são utilizados para a demonstração de que os biomateriais usados não geram efeitos citotóxicos quando implantados.

Com a estratégia de desenvolver biomateriais para atuar como matriz, que se comportam como suporte onde células possam crescer e se diferenciarem na camada de matriz extracelular, materiais naturais à base de pericárdio porcino e bovino, são considerados uma ótima alternativa, pois são de fácil obtenção, podem ter o tamanho e formato do defeito de acordo com o receptor, são de fácil manipulação e de serem implantados. O pericárdio bovino já algum tempo está sendo utilizado na função de matriz, mas o pericárdio porcino ainda é pouco estudado nessa função; portanto, através desse trabalho vem a tentativa de aprofundar o estudo sobre duas matrizes que são de origens diferentes, que receberam o mesmo tratamento e foram implantadas em ratos, para observar, através de análise histológica, as respostas biológicas e comparação de suas diferenças. Seguem alguns exemplos do uso desses materiais com função de enxerto.

Tanto o pericárdio bovino (PB) como o pericárdio porcino (PP), são tecidos que vêm sendo utilizados como enxertos xenógenos em pacientes em algumas áreas da saúde. Na área médica, o pericárdio porcino é utilizado na fabricação de próteses valvulares usadas em cirurgias cardíacas infantis, como também é utilizado o pericárdio bovino na confecção de próteses valvares cardíacas em adultos (COSTA et al, 2005). O pericárdio bovino também está sendo estudado na ortopedia (CALASSANS-MAIA, et al, 2009), em traumatismo de face (TURRER et al, 2008), em tratamentos de queimaduras; na odontologia, em tratamento de defeitos ósseos (CIANI et al , 2006), também é muito usado em pesquisa na especialidade de periodontia nas cirurgias de regeneração tecidual guiada, e em implantes osseointegrados (THORWARTH et al, 2007). Esses tecidos são denominados de biomateriais, por apresentarem características de biocompatibilidade e biodegradabilidade, tendo uma composição à base de colágeno tipo I.

O pericárdio é uma das três túnicas que reveste o coração: a túnica mais interna é denominada de endocárdio, a média de miocárdio, e a mais externa de pericárdio, que se divide em duas partes: o saco fibroso e a membrana serosa. O saco fibroso mantém o coração fixado e posicionado no seu interior (MOORE, DALLEY, 2001). A membrana serosa divide-se em três camadas, como mostra na figura 2:

- Camada serosa é a camada mais interna, constituída de epitélio pavimentoso simples, denominado mesotélio;

- Camada fibrosa sendo essa constituída por tecido conjuntivo frouxo que possui fibras elásticas, fibras colágenas, vasos sanguíneos, nervos e gânglios nervosos;
- Camada epi-pericárdica denominada camada visceral do pericárdio onde ocorre o acúmulo de tecido adiposo. (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2008).

Figura 2 - Esquema representando o tecido pericárdio (SUZIGAN, 2007).

Uma das grandes vantagens da utilização do PB e PP no desenvolvimento de biomateriais é o elevado teor de colágeno tipo I, sendo cerca de 47% nesses tecidos (VILELA, 2006). O colágeno possui uma grande quantidade de grupos reativos, tais como, aminas (NH_2), ácidos carboxílicos (COOH) e hidroxilas alcoólicas (OH), que possibilitam alterações químicas do tecido, principalmente através de reações de reticulação (KHOR, 1997), hidrólise seletiva (LACERDA, PLEPIS, GOISSIS, 1997).

1.2. COLÁGENO COMO BIOMATERIAL

O colágeno é uma proteína muito conhecida e tem sido amplamente utilizada na engenharia de tecidos, por apresentar um baixo índice de imunogenicidade (cerca de 2% para colágeno heterólogo) e podendo ser diminuído com a modificação através da remoção dos telopeptídeos N e C- terminais, tornando-o mais biocompatíveis. São capazes, quando

colocados próximos a outro tecido, de se organizarem estruturalmente da mesma forma que o tecido nativo com propriedades similares, suas fibras são resistentes, elásticas.

É visto pelo corpo humano como um constituinte normal e não como um material estranho. O colágeno é a proteína mais abundante do reino animal, representando 25% das proteínas presentes em mamíferos (LEE, SINGLA, LEE, 2001).

1.3. CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS

O colágeno é uma proteína que possui uma propriedade singular: forma um arranjo supramolecular, a fibrila, sendo também classificada como proteína fibrosa. Métodos histoquímicos confirmados por microscopia eletrônica de varredura ou transmissão, mostram que cada tipo de colágeno apresenta sua própria estrutura química com propriedades funcionais, e interações específicas com os componentes da matriz extracelular (MONTES, 1996).

Atualmente, são conhecidos 29 tipos de colágenos quimicamente distintos (SÖDERHÄLL et al, 2007), que são encontrados em tecidos, tais como pele, tendão, vasos sanguíneos, cartilagem, osso, córnea e estão presentes também na estrutura e nos interstícios de todos os outros tecidos e órgãos com exceção do sangue, linfa e tecidos queratinosos. Em muitos casos, a função específica do colágeno no tecido é a manutenção de sua integridade estrutural, e a característica principal que lhe permite exercer tal função é a grande força de tração de suas fibras.

1.3.1. COLÁGENO TIPO I

O colágeno tipo I é constituído de mais de 90% do total de colágeno de mamíferos e é utilizado como matriz biológica em aplicações terapêuticas (ANSELME, 2000). A molécula completa de colágeno incluindo os telopeptídeos, têm um comprimento de 2800Å, diâmetro de 15Å e massa molar em torno de 300 kDa (VAN DER REST, GARRONE, 1991).

Consiste de três cadeias polipeptídicas em formato de hélice, sendo que cada cadeia chamada α é composta de cerca de 1000 aminoácidos. O colágeno tipo I especificamente, consiste de duas cadeias idênticas $\alpha 1$ e uma não idêntica $\alpha 2$, com telopeptídeos extra hélice contendo 16 e 25 aminoácidos nas extremidades N e C- terminais, respectivamente. Esses

telopectídeos são os sítios para o estabelecimento de ligações cruzadas covalentes intermoleculares. As cadeias polipeptídicas individuais se entrelaçam e formam uma hélice tripla regular (Figura 3) denominada de tropocolágeno (exceto para os telopeptídeos N e C-terminais). A estrutura em hélice tripla é possível devido a uma sequência primária, na qual cada terceiro resíduo é uma glicina. O triplete (Gly-X-Y) se repete ao longo das cadeias polipeptídicas, sendo que X e Y pode ser qualquer aminoácido, mas geralmente X é prolina (Pro) e Y hidroxiprolina (Hyp), pois a sequência Gly-Pro-Hyp representa cerca de 10% da molécula (NIMNI,1988).

*Figura 3: Esquema da hélice tripla da molécula de colágeno
(ALBERTS et al,1994).*

Sendo o colágeno susceptível a modificações, a distribuição de cargas na molécula de colágeno pode ser modificada por reações químicas específicas nos aminoácidos carregados, para produzir matrizes carregadas negativamente ou positivamente. As modificações químicas são meios para alterar as propriedades do colágeno, sejam elas mecânicas, estruturais ou físico-químicas, aumentando o conjunto de materiais disponíveis para serem empregados em diferentes aplicações médicas e odontológicas.

O processo utilizado para a preparação de materiais de colágeno carregados negativamente a pH 7,4 é denominada hidrólise alcalina, sendo essa seletiva, pois altera os grupos carboxídeos dos resíduos de aminoácidos asparagina (Asn) e glutamina (Gln) presentes nas cadeias α do tropocolágeno (LACERDA, PLEPIS, GOISSIS, 1998), conforme ilustrada na figura 4.

Figura 4 - Esquema da hidrólise alcalina dos resíduos de asparaginas e glutaminas da molécula de colágeno.

A modificação do material de colágeno por hidrólise alcalina seletiva conduz a um aumento total de 130 cargas por unidade de tropocolágeno. Este método permite a preparação de biomateriais com bom desempenho biológico, embora introduza algumas alterações na estrutura básica da molécula de colágeno (BET, 2002, GOISSIS, 1999, FORTI, 2006).

A principal característica da alteração por hidrólise seletiva é a formação de um centro de carga assimétrico, que é importante para o desenvolvimento de materiais dielétricos, pois melhora essas propriedades em relação àsquelas encontradas no colágeno nativo, sendo uma propriedade interessante para a reconstrução do tecido ósseo (LACERDA, PLEPIS, GOISSIS, 1998).

Objetivos

O objetivo desse trabalho foi avaliar e comparar os efeitos das matrizes acelulares de pericárdio bovino e porcino, obtidas por hidrólise alcalina por 12 horas e 24 horas, quando implantadas no subcutâneo de ratos.

Material e Métodos

3.1. MATERIAL

As matrizes acelulares derivadas de pericárdio porcino e pericárdio bovino usadas nesse trabalho foram preparados e caracterizados no Laboratório de Bioquímica e Biomateriais do IQSC/USP, pela aluna Fabiana Tessari Rodrigues, no seu trabalho de doutorado em Química (RODRIGUES, 2006).

Após a preparação, as matrizes foram esterilizadas por Óxido de Etileno pela empresa Oxetil Indústria e Comércio de Produtos Esterelizados Ltda em Campinas, sob supervisão da Dra. Rita Gisele Biffi Medeiros (CRF: 26.334).

3.2. PREPARAÇÃO DAS MATRIZES

O pericárdio porcino (PP) e o pericárdio bovino (PB) utilizados para a preparação das matrizes foram fornecidos pela Indústria Braille Biomédica Ltda. de São José do Rio Preto – SP. Inicialmente, as matrizes foram limpas mecanicamente e lavadas alternadamente com água destilada por 30 minutos e NaCl 0,9% por 1 hora, à temperatura ambiente para a retirada de sangue.

Numa segunda etapa, foram removidas da solução e colocadas em uma solução alcalina contendo hidróxidos, sulfatos e cloretos de K^+ , Na^+ e Ca^{+2} , a 25°C, por um período de 12 e 24 horas. Após o tempo determinado da hidrólise, as matrizes foram equilibradas em uma solução aquosa de cloretos e sulfatos de K^+ , Na^+ e Ca^{+2} , por 6 horas, seguido de lavagens com ácido bórico 3%, EDTA 0,3% a pH 11 e água deionizada até pH constante e a seguir equilibradas em tampão fosfato 0,13 mol L⁻¹ (TF) a pH 7,4. Esse é um procedimento de rotina do Laboratório de Biomateriais para a preparação de matrizes acelulares com conteúdo

variável de carga negativa (BET; GOISSIS; LACERDA, 2001).

Em seguida, as matrizes foram congeladas e liofilizadas em um equipamento da Edwards modelo Freeze Dryer Modulyo (Edwards High Vacuum International, West Sussex, UK) e armazenadas em dessecador até o momento do uso.

O esquema mostrado na figura 5 resume a preparação das matrizes:

Figura 5 - Esquema da preparação das matrizes acelulares de PP e PB

As matrizes acelulares obtidas foram nomeadas de:

- PP12 - pericárdio porcino após 12 h de tratamento alcalino;
- PP24 - pericárdio porcino após 24 h de tratamento alcalino;
- PB12 - pericárdio bovino após 12 h de tratamento alcalino;
- PB24 - pericárdio bovino após 24h de tratamento alcalino.

3.3. CARACTERIZAÇÃO

As matrizes acelulares de PP e PB foram previamente caracterizadas através de estabilidade biológica (colagenase) (anexo A), titulação potenciométrica, calorimetria exploratória diferencial (DSC), porcentagem de absorção de água, microscopia eletrônica de varredura (MEV) (RODRIGUES, MARTINS, PLEPIS, 2008) avaliação da citotoxicidade *in vitro* (anexo B) e análise histológica (anexo C) (PLEPIS, et al, 2009).

3.4. AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

3.4.1. BIOCAMPATIBILIDADE IN VIVO

3.4.1.1. Preparo dos animais e procedimentos de implantação

O protocolo experimental deste trabalho, que inclui a seleção dos animais, materiais usados, manejo e procedimentos cirúrgicos, foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Carlos-UFSCar, com o número de protocolo de aprovação 050/2007 (Anexo D).

Um total de 65 ratos albinos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), machos, adultos, com 70 dias de vida e peso aproximado de 250g, provenientes do Biotério do Hospital Veterinário da Centro Universitário de Rio Preto - São José do Rio Preto-SP, foram divididos aleatoriamente em cinco grupos de 13 animais correspondente aos 5 tempos de sacrifício dos animais, ou seja 7, 14, 21, 28 e 35 dias. As matrizes para implante foram cortadas, antes da esterilização, em pedaços de 1cm².

Em cada grupo foram usados 3 animais para cada tipo de matriz, e um animal controle com procedimento cirúrgico, porém sem introdução do biomaterial, ou seja:

Grupo 1: sacrifício dos animais com 7 dias:

- 3 animais com matriz PP12;
- 3 animais com matriz PP24;
- 3 animais com matriz PB12;
- 3 animais com matriz PB24;
- 1 animal controle .

A mesma sequência de animais foi usada para os demais grupos, ou seja, o grupo 2 corresponde aos 14 dias com mesmo numero de animais, o grupo 3 correspondente aos 21 dias, o grupo 4 correspondente aos 28 dias e o grupo 5 correspondente aos 35 dias.

Em todos os animais a mesma sequência operatória foi seguida, sendo que, inicialmente, os animais foram anestesiados com Xilamina 4mg/kg por via intramuscular e Tiletamina/Zolazepan 60mg/kg por via intramuscular e sendo necessário o prolongamento da anestesia, com Isoflurano na máscara em circuito aberto. Quando os animais permaneceram imóveis, foram colocados sobre um campo estéril para o procedimento operatório.

Na área dorsal dos animais, seguindo a linha sagital, foi realizada a tricotomia (Figura 6A), expondo a pele, seguida da assepsia com gaze embebida com Iodo Povidine (PvPi) (figura 6B). Procedeu-se uma incisão de 2 cm com lamina de bisturi nº 15 e em sequência foi feita a desinserção e afastamento adequado dos tecidos moles, para confecção de uma bolsa. Após a confecção da bolsa, as margens da incisão foram afastadas e o biomaterial foi introduzido no espaço subcutâneo aproximadamente a 1 cm de distância da incisão, implantando as amostras de matrizes de 1cm² (Figura 6C).

As bordas dos tecidos foram aproximadas e suturadas com fio de náilon 3-0 Ethicon (Johnson & Johnson), (figura 6D). Após o término da sutura foi realizada a assepsia pós-operatória com PvPi e analgesia durante dois dias com Flunexim Meglumine 2,5mg/kg por via intramuscular uma vez ao dia. Durante o período pós-operatório os ratos foram mantidos em gaiolas individuais com ração apropriada e água *ad libitum*.

Figuras 6- sequência da técnica cirúrgica iniciando com tricotomia e anestesia complementar em circuito de máscara aberta, assepsia com PvPi; colocação do material na bolsa confeccionada; sutura da área e assepsia pós- operatória.

3.4.1.2. Sacrifício dos animais e processamento histológico

Decorridos os períodos experimentais particulares a cada grupo, os animais foram anestesiados e sacrificados, seguido pelo procedimento de tricotomia da região dorsal e assepsia com PvPi, semelhante ao descrito anteriormente.

Após a localização dos materiais por palpação, realizou-se a incisão com margem de segurança para a retirada cuidadosa do material com o tecido adjacente.

Após a remoção do tecido foram colocados em um suporte específico (tela) e imerso a solução de formol a 10% em tampão fosfato (pH 7). Foram inicialmente processadas histologicamente, sendo cada porção amostrada (cervical, torácica e lombar), depois fixado em parafina, cortadas a 5 µm de espessura e coradas com HE (hematoxilina/ eosina) e WG (Weigert). Cada lâmina apresentou em média 3 cortes histológicos de cada segmento coletado, proporcionando assim uma ampla amostragem de tecidos para análise histológica.

3.5. ANÁLISE HISTOLÓGICA

Após o processamento rotineiro de histologia, cada amostragem de lâmina foi analisada e fotografada pelo microscópio de luz marca, Leica Leitz DM RX com sistema de análise de imagem acoplado. Foi usado um programa de análise de imagens, Imagem pró-plus 6.0, para obter a porcentagem de material. Foi necessário para esse programa uma sequência de fotos por cada lâmina. O programa Imagem pró-plus 6.0, é uma ferramenta usada para fazer contagem de elementos em cada lâmina histológica. Inicialmente selecionou-se as lâminas e criou-se um arquivo; nesse trabalho foi criado o arquivo denominado material e não material, os quais foram usados para quantificar o que existe de material (matriz enxertada em rato), e o que não era material (musculatura, tecido adiposo, vasos sanguíneos, etc.). Cada lâmina histológica foi analisada através do microscópio com um sistema de imagem acoplada, em média foram feitas 10 fotos de cada lâmina. Essas fotos foram usadas no programa através de uma marcação 13x 10 que significa 13 colunas com 10 pontos onde esses pontos servem para contar o que era material e o que não era material. Essa contagem foi manual (operador do programa que faz a contagem), e a soma os pontos das 10 fotos obtém a

porcentagem de matriz enxertada (fibras) que tem naquele tempo de contagem. Foram analisadas as lâminas coletadas nos tempos de 7, 14, 21, 28 dias, tanto de pericárdio porcino como de pericárdio bovino, observando-se que aos 35 dias não foram encontradas as matrizes de pericárdio porcino e nem bovino.

3.6. VERIFICAÇÃO DAS LÂMINAS NA ANÁLISE HISTOLÓGICA

Para efeito de análise comparativa, foram determinadas as escalas semi quantitativas descritas a seguir:

- A quantidade de infiltrado inflamatório próximo do enxerto:
 - (-) ausência de infiltrado inflamatório;
 - (+) mínima quantidade de infiltrado inflamatório;
 - (++) moderada quantidade de infiltrado inflamatório;
 - (+++ grande quantidade de infiltrado inflamatório;
 - (++++) intensa quantidade de infiltrado inflamatório.

- Diferença de resposta inflamatória entre o pericárdio bovino e porcino:
 - (-) Ausência de diferença da resposta inflamatória entre os pericárdios;
 - (+) Diferença na resposta inflamatória entre os pericárdios.

- Diferença no tempo de degradação entre o pericárdio bovino e porcino nos tempos de 12h e 24h de tratamento:
 - (-) Ausência no tempo de degradação entre o pericárdio bovino e porcino;
 - (+) Diferença no tempo de degradação entre o pericárdio bovino e porcino.

- Crescimento celular interno:
 - (-) ausência de células dentro das fendas dos implantes;
 - (+) pouca quantidade de células dentro das fendas dos implantes;
 - (++) quantidade moderada de células dentro das fendas dos implantes;
 - (+++ grande quantidade de células dentro das fendas dos implantes;

(+++++) intensa quantidade de células dentro das fendas dos implantes.

- Neovascularização:

(-) ausência de capilares em volta do implante;

(+) pouca quantidade de capilares em volta do implante;

(++) quantidade moderada de capilares em volta do implante;

(+++) grande quantidade de capilares em volta do implante;

(+++++) intensa quantidade de capilares em volta do implante.

4. Resultados e Discussão

4.1 MATRIZES

Após a preparação por hidrólise alcalina e liofilização, as matrizes, em todos os casos apresentaram uma coloração branca, textura homogênea e espessura fina, sendo que as matrizes de PB são mais espessas que as matrizes de PP. As figuras 7 e 8 mostram as fotografias digitais das matrizes usadas no trabalho. As matrizes de pericárdio bovino apresentaram uma coloração levemente amareladas, com uma espessura maior do que a matriz de pericárdio porcino. As matrizes de pericárdio porcino apresentaram uma espessura fina, com áreas translúcidas e uma coloração levemente amarelada. As matrizes PP e PB quando secas têm a aparência de uma folha de papel e quando embebidas em solução de soro fisiológico se tornam maleáveis, de fácil manipulação e são facilmente moldadas de acordo com o leito receptor, por apresentarem propriedades elásticas. Devido a esta propriedade, não rasgam facilmente e são fáceis de serem suturadas. Por serem mais espessas, as matrizes de pericárdio bovino (anexo A) assentam melhor no leito receptor do que as matrizes de pericárdio porcino e são mais difíceis de serem rasgadas. As matrizes tratadas 12 horas e 24 horas são indicadas para função como barreira, mas as matrizes tratadas por 12 horas são melhores, pois quanto mais demora a sua degradação melhor sua função, pois impede do epitélio juncional longo de invadir a ferida e impedir a regeneração óssea guiada.

Figura 7: Fotografia digital das matrizes de pericárdio bovino: (A) PB12 (B) PB24

Figura 8: Fotografia digital das matrizes de pericárdio porcino: (A) PP12; (B) PP24

As matrizes foram previamente testadas quanto à citotoxicidade *in vitro*. Nenhum dos pericárdios testados, tanto o bovino como o porcino, analisados pelo método de difusão em Agar, apresentou efeito tóxico (Anexo B). Não foi observado um halo de toxicidade em volta dos biomateriais ou sob as amostras, e as células se mostraram sem nenhuma alteração morfológica, apresentando assim um comportamento idêntico ao controle negativo. Quanto ao controle positivo, foi observado um halo de 13 mm ao redor do látex, confirmando a toxicidade inerente ao material com lise celular (RODRIGUES, 2009).

4.2 BIOCOMPATIBILIDADE *IN VIVO*

As lâminas, depois de confeccionadas e coradas com HE, demonstraram que o material histológico que corou em rosa forte foram as fibras de colágeno, em roxo os núcleos das células, os macrófagos; os vasos sanguíneos coraram em vermelho, e o citoplasma em rosa mais claro. Com a coloração de Weigert (WG), foi observado que as fibras colágenas coraram em rosa a vermelho, os núcleos das células (macrófagos) coraram em azul a preto, fibras elásticas coraram em azul escuro e outros elementos em amarelo (Anexo C). O programa Imagem pró-plus 6.0 foi utilizado para quantificar o número de fibras nas matrizes pós implante, sendo as lâminas histológicas analisadas nos tempos de 7, 14, 21 28 e 35 dias. Observaram-se fibras colágenas em cada tempo de tratamento com hidrólise alcalina (12h e 24h), comparando com a indicação do teste em estabilidade biológica.

4.3GRUPO 1: 7 DIAS

Figura 9: (A) Animal Controle, 7dias, HE,; (B) Animal Controle, 7dias, HE, seta amarela hemácias, seta verde macrófagos.

As figuras 10 e 11 mostram as matrizes de pericardio porcino aos 7 dias.

Figura 10: (A) PP12, HE, 7dias; (B) PP12 HE, 7 dias, seta amarela hemácias e vasos sanguíneos, seta verde macrófagos.

Figura 11: (A) PP24 HE, 7dias, seta amarela hemácia e seta azul matriz implantada; (B) PP24 HE, 7dias, seta verde macrófagos.

Após os primeiros 7 dias, tanto o animal controle como o que continha o material enxertado foram coletados e analisados e apresentaram uma grande quantidade de infiltrado inflamatório rico em células epitelióides e macrófagos.

Na lâmina do animal controle (figura 9 A e B) o infiltrado inflamatório agudo formou – se devido à incisão, a qual caracterizou um estímulo.

A figura 9 mostra os cortes histológicos (coloração HE) do grupo controle aos 7 dias. Observa-se núcleos de macrófagos (seta verde) e pequenos pontos vermelho que são as hemácias que estão dentro do vaso sanguíneo (seta amarela).

Nas lâminas PP 12h e PP 24h (figuras 10 A, B e 11 A e B), o infiltrado inflamatório formado também caracterizou a fase aguda, devido à grande quantidade de macrófagos presentes, que apresenta corado o núcleo em roxo em volta do material, seta azul, formando uma cápsula. Alguns vasos sanguíneos podem ser visto próximo ao material em vermelho (seta amarela).

As figuras 12 e 13 mostram as matrizes de pericárdio bovino aos 7 dias coradas com WG, que permite ver o infiltrado inflamatório em marrom claro e o núcleo dos macrófagos em marrom escuro (seta vermelha) e a matriz enxertada em rosa forte (seta azul).

Nas lâminas PB 12h e PB 24h, o infiltrado inflamatório estava em volta do material, formando uma faixa no subcutâneo, caracterizando uma cápsula, o que caracteriza a fase aguda (Figuras 12 e 13).

Quanto à diferenciação de resposta inflamatória entre os biomateriais, estes não apresentaram diferença quanto à quantidade de infiltrado inflamatório próximo ao enxerto, pouca quantidade de vasos sanguíneos próximo ao enxerto de ambos os tipos de materiais. Os materiais apresentaram pequenas fendas nesse período de 7 dias (Figuras 11, 12 e 13).

Figura 12: (A) PB12, WG, 7dias; (B) PB12, WG, 7dias.

Figura 13: (A) PB24, WG, 7 dias; (B) PB24, WG, 7dias.

Em relação à quantidade de degradação de cada matriz, relacionada com tempo de tratamento das matrizes de 12 horas e 24 horas, houve uma pequena diferença. As quantidades foram analisadas por meio do programa de imagem pró-plus que quantificou as fibras em cada tempo de tratamento das matrizes PB e PP (12h e 24h), e em cada tempo de corte histológico.

As matrizes PB24h e PP24h, apresentaram uma degradação maior do que as matrizes tratadas por 12h, tanto a PP como a PB. Isso só veio confirmar a indicação do teste de estabilidade por colagenase (RODRIGUES, 2006) que mostrou, para maior tempo de tratamento, mais rápida a degradação da matriz (anexo B).

A figura 14 mostra uma comparação entre as porcentagens de material remanecente coletado aos 7 dias. Observa-se que para o material tratado por 12 h não há diferenças entre PB e PP, com uma degradação menor que 40%. Para os materiais tratados por 24h observa-se um aumento na degradação, sendo de 45% para PP e 51% para PB.

Figura 14: Comparação em porcentagem da quantidade de material implantado, coletado aos 7 dias

4.4GRUPO 2: 14 DIAS

As figuras 15 A e B mostram os cortes histológicos (coloração HE) do grupo controle aos 14 dias. Observa-se infiltrado inflamatório no local da incisão, caracterizado pelos macrófagos (seta verde), e hemácias (seta amarela), os vasos sanguíneos.

Figura 15: (A) *Animal Controle, 14 dias, HE.* (B) *Animal Controle, 14 dias, HE.*

Na coleta do grupo 2 com 14 dias, o animal controle (figura 15 A e B) apresentou

uma diminuição do infiltrado inflamatório próximo ao corte comparando com o corte aos 7 dias, considerando a fase crônica.

As figuras 16 e 17 mostram as matrizes de pericárdio porcino aos 14 dias, as quais foram coradas com Weigert, na qual pode-se notar o infiltrado inflamatório em marrom claro (seta azul).

Figura 16: (A) PP 12 WG, 14 dias, (B) PP12 WG, 14 dias.

As figuras 17 A e B mostram o pericárdio porcino 24h, coradas em HE; pode-se observar as fibras da matriz coradas em rosa (seta amarela), e as dos vasos sanguíneos em vermelho (seta verde). Reestruturação do tecido conjuntivo (seta azul).

Figura 17: (A) PP24, HE, 14 dias; (B) PP24h, HE, 14 dias.

As figuras 18 e 19 mostram as matrizes de pericárdio bovino 12h aos 14 dias. Coradas com WG, permite identificar as matrizes entre a musculatura (seta azul), e o tecido adiposo (seta verde).

Figura 18: (A) PB12, WG, 14 dias; (B) PB12h, WG, 14 dias, seta roxa tecido muscular.

As figuras 19 A e B permite observar o pericárdio bovino 24h corado com WG (A) e HE (B), observando uma célula gigante na foto B (seta verde).

Figura 19: (A) PP 24h, WG, 14dias; (B) PB24h, HE, 14 dias, seta laranja cápsula delgada, seta verde célula gigante.

Considerada uma fase aguda, caracterizada pela coleta do material com 14 dias, apresentando uma grande quantidade do infiltrado inflamatório em volta do material, com presença de células epitelióides, macrófagos e células gigantes (figura 19 B). Não foi observada diferença na quantidade de infiltrado inflamatório circundando o material enxertado, formando uma cápsula no subcutâneo, nas matrizes de PB 12h e 24h, como o PP 12h e 24h. Na figura 17B, observam-se os macrófagos circundando o material enxertado e como ele vai sendo invadido pelo tecido conjuntivo ao seu redor.

Nesse período observaram-se fendas (figura 18B) na matriz, caracterizando uma invasão celular, reação de reparo interno, observando pouca quantidade de vasos sanguíneos próximo ao material, figura 17 A.

Em relação à quantidade de degradação de cada matriz, relacionada com tempo de tratamento de 12h e 24h, tanto PB como PP apresentaram degradação da matriz, sendo que o PP tratado tanto com 12h como 24h degradaram mais que PB tratados 12h e 24h. Mas as matrizes tratadas durante 24h tanto a PP como a PB degradam mais que as tratadas por 12h (figura 20).

A figura 20 mostra uma comparação entre as porcentagens de material remanescente coletado aos 14 dias. Observa-se que para o material tratado por 12h ocorreu uma diferença entre o PP e o PB de 10% , com uma degradação menor que 50%. Para os materiais tratados por 24h observa-se um aumento na degradação sendo de 59% para o PP e de 55% para o PB.

Figura 20: Comparação em porcentagem da quantidade de material implantado, coletado com 14 dias.

4.5 GRUPO 3: 21 DIAS

No grupo 3, na coleta do animal controle com 21 dias (figura 21 A e B), foi observada uma diminuição gradual do infiltrado inflamatório em relação ao animal controle de 14 dias, apresentando a fase final de reestruturação das fibras do tecido conjuntivo, fase crônica.

Figura 21: (A) Animal Controle 21 dias, seta amarela fibras do tecido conjuntivo, seta azul vasos sanguíneos; (B): Animal controle com 21 dias, HE.

As figuras 22 e 23 mostram as matrizes de pericárdio porcino coletadas com 21 dias.

Figura 22: (A) PP12 h, 21 dias, WG; (B) PP12h, 21dias, WG, seta amarela matriz.

Figura 23: (A) PP24h, WG, 21 dias, seta laranja cápsula; (B) PP24h, WG, 21 dias, seta verde fenda na matriz.

As figuras 24 e 25 mostram a matriz de pericárdio bovino coletada com 21 dias.

Figura 24: (A) PB12h, 21dias, WG; (B) PB12h, 21dias, WG, seta amarela fendas na matriz.

Figura 25: (A) PB24h, 21dias, WG, seta verde tecido muscular; (B) PB24h, 21 dias WG, seta amarela matriz.

Com 21 dias, foi observado na lâmina PP 12h um intenso infiltrado inflamatório do tipo corpo estranho, com esparsas células gigantes, células epitelióides e macrófagos circundando o material enxertado, formando uma cápsula ao longo do subcutâneo, caracterizando a fase crônica. Raros vasos proliferados (figura 23 A).

Já na lâmina do PP 24h com 21 dias, observaram-se fragmentos apresentando tecido de granulação em fase final de organização junto ao subcutâneo, caracterizando a fase intermediária (figura 22 B).

Tanto o PB 12h e 24h (figuras 24 e 25), indiferente do tempo de tratamento, não apresentaram respostas inflamatórias diferentes, portanto consideramos que os dois possuem a mesma resposta inflamatória quando em contato com o organismo do rato. A fase crônica foi caracterizada com o material coletado nos 21 dias, com pouco infiltrado inflamatório, com células epitelióides e macrófagos existentes nos dois tipos de material, aumentado a quantidade de vasos sanguíneos, e a reabsorção do material ocorrendo a neovascularização e crescimento interno de tecido conjuntivo no enxerto.

Com 21 dias, o material PP tanto 12horas e 24 horas de tratamento degradou mais que os PB 12 horas e 24 horas, sendo que as matrizes tratadas 24 horas, tanto a PP como PB continuaram degradando mais que as tratadas 12 horas (figura 26).

A figura 26 mostra uma comparação entre as porcentagens de material remanescente coletado aos 21 dias. Observa-se que para o material tratado por 12h ocorreu uma pequena diferença na degradação entre o PP e PB, com uma degradação de 60%. Para os materiais tratados por 24h observa-se um aumento na degradação sendo de 63% para PP e de 58% para o PB.

Figura 26: Comparação em porcentagem da quantidade de matéria implantada, coletado com 21 dias.

4.6GRUPO 4: 28 DIAS

A figura 27 mostra os cortes histológicos do animal controle retirados aos 28 dias. Onde observa-se poucos macrófagos e muitas hemácias nos vasos sanguíneos, e o tecido conjuntivo restabelecido com fibras colágenas e elásticas caracterizando a cicatrização da ferida.

Figura 27: (A) Animal Controle, 28 dias, HE; (B) Animal Controle, 28dias, HE.

No grupo 4 o animal controle coletado com 28 dias apresentou alguns pontos com infiltrado inflamatório caracterizando o final da fase crônica.

As figuras 28 e 29 mostram as matrizes de pericárdio porcino.

Figura 28: (A) PP12h, WG, 28 dias, seta preta fendas no matriz; (B) PP12h, WG, 28 dias.

Figura 29: (A) PP24h, WG, 28 dias, seta em azul de tecido conjuntivo neoformado;
(B) PP24h, WG, 28 dias.

As figuras 30 e 31 mostram as matrizes de pericardio bovino.

Figura 30: (A) PB12h, WG, 28 dias, seta amarela matriz; (B) PB12h, WG, 28 dias, seta amarela matriz.

*Figura 31: (A) PB24h, WG, 28 dias, seta verde tecido conjuntivo neoformado;
(B) PB24h, WG, 28 dias, tecido conjuntivo, seta verde.*

A coleta de 28 dias é caracterizada pelo final da degradação do material enxertado, observando pequenos pontos de material dentro do tecido conjuntivo que se formou, caracterizando a fase crônica (figura 29 A). Em algumas lâminas em que existiam partes das matrizes, elas apresentavam grande quantidade de fendas, com a revascularização estabelecida (figuras 28, 29, 30, 31).

Nota-se que na periferia da matriz implantada ocorreu uma neoformação de tecido, em íntimo contato com a matriz, ao mesmo tempo em que ocorria a reabsorção do material (figuras 29 A e B, 30 A e B). Esse crescimento de tecido conjuntivo iniciou a partir do 14º dia, ocorrendo assim um aumento gradual do tecido conjuntivo aparentemente não modificado no local da matriz.

As matrizes PP 12 horas e 24 horas apresentaram uma reabsorção maior do que as matrizes PB 12 horas e 24 horas de tratamento, mas tanto as matrizes PP como a PB tratadas 24 horas degradaram mais que as tratadas 12 horas, confirmando o ensaio de estabilidade biológica por collagenase (figura 32).

A figura 32 mostra uma comparação entre as porcentagens de material remanescente coletado aos 28 dias. Observa-se que para o material tratado por 12h, ocorreu uma pequena diferença entre PP e PB de 10%, sendo a degradação menor a 78% do PP e 68% para o PB. Para os materiais tratados por 24h observa-se um aumento na degradação sendo de 80% para o PP e 70% para o PB.

Figura 32: Comparação em porcentagem da quantidade de material implantada , coletado com 28 dias.

4.7GRUPO 5: 35 DIAS

A figura 33 mostra o animal controle coletado com 35 dias.

Figura 33: (A) Animal Controle, 35dias, HE; (B) Animal Controle, 35dias, HE, seta verde substância fundamental amorfa, seta amarela fibras do tecido conjuntivo, seta azul vaso sanguíneo.

As figuras 34 e 35, mostram as matrizes de pericárdio porcino.

Figura 34: (A) PP12h, HE, 35dias, seta azul metaplasia cartilaginosa; (B) PP12h, HE, 35 dias, seta laranja paniculite crônica.

*Figura 35: (A) PP 24h, WG, 35 dias, seta verde tecido conjuntivo neoformado;
(B) PP 24h, WG, 35 dias.*

As figuras 36 e 37 mostram as matrizes de pericárdio bovino.

Figura36: (A) PB12h, 35dias, WG , seta verde tecido conjuntivo neoformado; (B): PB12h, WG, 35 dias, seta verde tecido conjuntivo neoformado

Figura 37: (A) PB24h, WG, 35dias; (B) PB24h, WG, 35 dias, seta verde tecido conjuntivo neoformado.

No grupo 5, o animal controle coletado com 35 dias apresentou a ferida cicatrizada, ou seja, a inflamação aguda inicial ocorreu pelo ato operatório, diminuindo com o período de cicatrização da ferida. Observa-se que o tecido está restabelecido devido a presença das fibras colágenas, reticulares e elásticas, a substância fundamental amorfa e vasos sanguíneos

Também foi observado, no 35º dia, uma grande quantidade de tecido conjuntivo frouxo no local das matrizes já com a reabsorção total das matrizes tanto PP com a PB (figuras 35, 36, 37). Em duas lâminas correspondentes a animais diferentes, foram observados fragmentos apresentando grande quantidade de macrófagos com citoplasma amplo e espumoso na região do subcutâneo do animal, caracterizando um panículo adiposo (paniculite crônica), tecido de granulação em fase final de organização (figura 34 B).

Foi observada a presença de um foco de metaplasia cartilaginosa em região próxima ao tecido muscular, devido a uma diferenciação do tecido conjuntivo, fato observado somente em uma lâmina (figura 34 A).

A aplicabilidade como matriz para o crescimento tecidual pode ser observada pela grande presença de vasos sanguíneos ao redor e interno ao mesmo; esse estímulo ocorre pela presença de colágeno que apresenta características que favorecem o crescimento tecidual e ósseo (tabela 1).

A presença de infiltrado inflamatório no 35º dia nos mostra uma baixa antigenicidade das matrizes, não apresentando remanescente orgânico no seu interior devido ao tratamento de hidrólise alcalina dos grupos carboxiamidas, dos resíduos de aminoácidos asparagina (Asn) e glutamina (Glu), presentes nas cadeias α , permitindo a obtenção de colágeno carregadas negativamente a pH 7,4 e com boa biocompatibilidade (RODRIGUES,2006).

As células teciduais adjacentes em muitos casos aderem às matrizes, sendo que os tecidos adjacentes sofrem pequenas alterações.

A tabela 1 mostra os resultados obtidos após a avaliação da resposta tecidual das matrizes de pericárdio bovino e porcino referentes a cada tempo de tratamento.

Tabela1 – Resultados da avaliação da resposta tecidual

Parâmetro		PB12	PB24	PP12	PP24
Infiltrado Inflamatório	7 Dias	+++	++++	+++	+++
	14 Dias	++	+++	++	++
	21 Dias	+	++	+	+
	28 Dias	+	+	+	+
	35 Dias	-	-	-	-
Diferença Infiltrado Inflamatório PB e PP	7 Dias	+	+	+	+
	14 Dias	+	+	-	-
	21 Dias	-	-	-	-
	28 Dias	-	-	-	-
	35 Dias	-	-	-	-
Diferença Tempo Degradação PB e PP	7 Dias	-	-	-	-
	14 Dias	-	-	-	-
	21 Dias	+	+	+	+
	28 Dias	+	+	+	+
	35 Dias	+	+	+	+
Crescimento celular interno	7 Dias	-	-	-	-
	14 Dias	+	+	+	+
	21 dias	++	++	++	++
	28 Dias	+++	+++	+++	+++
	35 Dias	++++	++++	++++	++++
Neovascularização	7 Dias	-	-	+	-
	14 Dias	+	+	+	+
	21 Dias	++	++	++	+++
	28 Dias	+++	+++	+++	+++
	35 Dias	+++	+++	+++	+++

As matrizes de PP12 e 24h de tratamento e as matrizes de PB12 e 24h demonstraram um comportamento semelhante em relação ao tempo de degradação, sendo que as matrizes PP24 horas de tratamento e PB24 horas degradaram mais rápido do que as tratadas 12 horas, devido ao tratamento de hidrólise alcalina; quanto maior o tempo de tratamento, maior a desorganização das fibras colágenas, mais rápida a degradação (RODRIGUES, 2006), e com o ensaio através da estabilidade biológica por colágenase, que é um indicativo relativo da biodegradação do material pós-implante, foi confirmado através da prática da implantação das matrizes em animais. As figuras 39 e 40 nos confirmam o ensaio através da estabilidade biológica por colágenase que nos indicam uma diferença de degradação entre os materiais PP e PB pós-implante, sendo que o PP degrada mais rápido que o PB, independente do tempo de tratamento de 12 e 24h. Mas também nos afirma que as matrizes tratadas por 24h tanto do PP como do PB degradam mais rápido do que as tratadas por 12 horas.

Figura 38: Gráfico referente a trajetória de degradação pós-implante do Pericárdio porcino 12h e 24h.

Tabela 2: Trajetória de degradação pós-implante do Pericárdio porcino 12h e 24h.

Horas	Dias	Porcentagem
12	7	63,07
24	7	54,62
12	14	44,61
24	14	41,53
12	21	40,68
24	21	38,50
12	28	22,31
24	28	20,08
12	35	0
24	35	0

Figura 39: Gráfico referente à trajetória de degradação pós-implante Pericárdio bovino 12h e 24h.

Tabela 3: Trajetoria de degradação referente ao Pericárdio bovino 12h e 24h.

Horas	Dias	Porcentagem
12	7	65,38
24	7	48,46
12	14	57,78
24	14	45,62
12	21	51,98
24	21	41,56
12	28	33,08
24	28	30,03
12	35	0
24	35	0

5 Conclusões

Nesse estudo viu-se que as matrizes “*in vivo*” provocaram uma reação, controlada e tolerada fisiologicamente ao organismo, o que sugere que as matrizes são biocompatíveis.

Houve diferença no tempo de degradação das matrizes, sendo constatado que as tratadas por 24 horas degradam mais rápido em relação às de 12 horas, isso ocorre porque este resultado está relacionado ao tipo de tratamento químico, que quanto maior o tempo de tratamento com hidrólise alcalina, mais rápido ocorre a degradação da matriz.

6 Referências Bibliográficas

ALBERTS, B.; BRAY, D.; KEWIS, J.; RALF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. Molecular Biology of the cell. New York: **G. Publishing**, p. 1294, 1994.

ANGELE, P.; ABKE, J.; KEYAT, R.; FALTERMEIER, H.; SCHUMANN, D.; RUSZCZAK, Z.; MEHRL, R.; NERLICH, M.; KINNER, R.; ENGLERT, C.; MERELLER, R. Influence of different collagen species on physic-chemical properties of crosslinked collagen matrices. **Biomat**, v.25, p.2831-2841, 2004.

ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomat**, v.21, p.667-681, 2000.

BARTOLD, P.M, XIAO, Y, LYNGSTADAS, S.P, PAINE, M.L, SNEAD, M.L. Principles and applications of cell delivery systems for periodontal regeneration. **Periodontol** **2000**; v 15, p.123-135, 2008.

BARTOLD, P.M, SLAVKIN, H.C. Desafios e perspectivas na engenharia tecidual. Engenharia dos tecidos Periodontais. **Periodontol** **2000**, v 15, p. 9-15, 2008.

BET, M. R.; GOISSIS, G.; LACERDA, C. A. Characterization of poly anionic collagen prepared by selective hydrolysis of asparagines e glutamine carboxy amide side chains. **Biomacromolecules**, v.2, p.1074-1079, 2001.

BOWERS, G.M, CHADROFF, B, CARNEVALE, R, MELLOING, J, CORIO, R, EMERSON, J, STEVEN, M & ROMBERG, E. Histologist evaluation of new attachment apparatus formation in humans. Part II. **J.Periodontology**, v.60, p.675-682, 1989.

BOWES, G.M., CHADROFF, B., CARNEVALE, R., MELLOING, J., CORRIO, R., EMERSON, J., STEVEN, M & ROMBERG, E. Histologic evaluation of new attachment apparatus formation in humans. Part III. **J. Periodontology**, v 60. p. 683-693, 1989.

CALASANS-MAIA. M.D, ASCOLI. F.O, NOVELLINO. A. T. N.A, ROSSI. A.M, GRANJEIRO. J.M. Avaliação histológica comparativa de reparo ósseo em tibia de coelho tratada com xenoinxertos. **Acta Ortop. Bras.** V.17, n.6, p. 340-3, 2009.

CIANI. R. B, RAHAL. S. C, VOLPI. R.S, TAGA. R, GRANJEIRO. J. M, CESTARI.T.M, MAMPRIM. M. J. Mistura de proteínas morfogenéticas ósseas, hidroxiapatita, osso inorgânico e colágena envolta por membrana de pericárdio no preenchimento de defeito ósseo segmentar em coelhos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.58, n.1, p.59-67, 2006.

CORTELLINI, P, PINI PRATO, G, TONETTI, M.S. Periodontal regeneration of human intrabony defects with bioresorbable membranes. **J Peridontol** v.67, p.217-223,1996.

COSTA. J.N.L, POMERANTZEFF. P.M.A, BRAILE. D.M, RAMIREZ. V.A, GOISSIS. G, STOLF. N.A.G. Comparação entre o pericárdio bovino decelularizado e o pericárdio bovino convencional utilizado na confecção de biopróteses valvares cardíacas **Rev. Bras. Cir. Cardiovasc**, v.20, n.1, p.14-22, 2005.

CURTIS,A.;RIEHLE,M. Tissue engineering the biophysical background. **Phys. Med. Biol.**; v.46, p. R47-R65, 2001.

FDA Notice of Interim Rule: **Human Tissue Intendend for transplantation** (58 FR 65514; 14 December1993).

FORTI,F.L; GOISSIS.G; PLEPIS,A.M.G. Modifications on collagen structures promoted by 1,4 dioxane improve thermal and biological properties of bovine pericardium as biomaterial. **J. of Biomaterial Aplications**, London, v.20 n3, p267-285, 2006.

GARA,G.G; ADAMS,D.F; Implant therapy in human intrabony pockets: A review of the literature. **J West Soc Periodontol**. Periodontal Abst , v.29, p.32-47; 1981.

GIGLIOTI, A.F . **Matrizes acelulares de colágeno: elastina a partir da desvitalização de pericárdio bovino: caracterização química, fisicoquímica e estrutural**, Tese de Doutorado, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

GOISSIS, G; PLEPIS, A. M. G; ROCHA, J. L; **Processo de extração de colágeno de tecidos animais com auxilio de solvente orgânico em meio alcalino**. Patent Industrial: nº9405043-0/1994.

GOISSIS,G; ROSSI,M.A; BET,M.R; ROCHA,L.B. Anionic collagen elastin matrices as scaffold for bone tissue growth: prearration characterization and implant response. **Artif. Organs**, v.23, p.640, 1999.

GOLDMAN. H, COHEN. D.W. The intrabony pocket: Classification and treatment. **J. Periodontol** , v.29, p.272-291, 1958.

GOSAIN AK, Hydroxyapatite cement paste cranioplasty for the treatment of temporal hollowing after cranial vault remodeling in a growing child. **J Craniofac Surg**, v. 8, p. 506-11; 1997.

HOYAMA,E;SCHELLINI,S.A; PELLIZON,C.H; MARQUES,M.E.A, PADOVANI,C.R; ROSA,R.Tratamento de furcas cutâneas extensas usando tec. Dérmico acelular porcino com e sem cobertura impermeável. **An. Bras. Dermatol.**, v.80; p.369-374,2005.

INTERNATIONAL STANDARD: Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Test for Cytotoxicity: in vitro methods. **ISO 10993-5**, 2003.

INTERNATIONAL STANDARD: Biological Evaluation of Medical Devices – Part 6: Test for Biocompatibility: in vivo methods: **ISO 10993-6**, 2003.

JUNQUEIRA E CARNEIRO; **Histologia Básica**; 11^a edição; Editora Guanabara Koogan S.A; 2008.

KARRING. T, ISIDOR.F, NYMAN.S, LINDHE.J. New attachment formation on teeth a reduced but healthy periodontal ligament. **J Clin Periodontol** ,v.12, p.51-60, 1980.

KARRING.T, NYMAN.S, LINDHE.J. Healing following implantation of periodontitis affected roots into bone tissue. **J Clin Periodontol**, v.7, p.96-105,1985.

KHOR,E. Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprotheses. **Biomat**, v.18,p. 95-105,1997.

LACERDA, C.; PLEPIS, A. M. 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. **Quim. Nova**, v.21p.267-271, 1998.

LANG, N.P.BRÄGGER, U., HÄMMERLE, C.H.F. & SUTTER, F. Immediate transmucosal implants using the principle of guided tissue regeneration. I. Rationale, clinical procedures and 30-month results. **C.Oral Implants Research**, v. 5, p. 154-163,1994.

LEE, C. H.;SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. **Int.J. Pharm.**, v.221,p.1-22, 2001.

MELCHER, A.H, MCCULLOCH, C.A, CHEONG. T, NEMENTH. E, SHIGA, A. Cells from bone synthesize cementum-like and bone-like tissues in vitro and may migrate into periodontal ligament in vivo. **J Periodontol**, Res, v.22, p.246-247,1987.

MIDDELKOOP,E.; VAN DEN BOGAERDT,A,J; LAME,E.N.; HOEKSTRH,M.J; BRANDSMA,K.; ULRICH,M.M.W. Porcine wound models for skin substitution and burn treatment. **Biomater**, v.25,p.1559-1567, 2004.

MONTES, G.S. Structural biology of the fibers of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol Int* . v.20, p.15-27, 1996.

MOORE, K.L, DALLEY, A.F. Torax. In: MOORE, K.L, DALLEY, A.F. **Anatomia orientada para a clínica**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan , 4ª ed. 1023p.p.52-151,2001.

NYMAN,S, KARRING, T, LINDHE, J, PLANTEN, S. Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue. **J Clin Periodontol**, v.7, p.394-401,1980.

NIMNI, M.E. Collagen, Florida,**CRV**, v. 01; p. 3-23,1988.

PARK, J.B.; LAKES, R.S. Biomaterials an Introduction. New York: **Springer**, p. 561, 2007.

PLEPIS, A.M.G; RODRIGUES,F.T; FUSO,F.C; MARTINS,V.C.A. Citotoxicity and Biocompatibility studies of acellular collagen matrices derived from porcine pericardium. **ECCOMAS**, 2009.

RODRIGUES, F.T; **Pele Porcina como fonte de Matrizes Tridimensionais de colágeno**. Dissertação Mestrado em Ciências Químicas Analítica, Universidade de São Paulo- São Carlos, 2006.

RODRIGUES, F.T; MARTINS, V.C.A, PLEPIS, A.M.G; **Influência do tempo de hidrólise alcalina na preparação de patches de pericárdio porcino**, 21º Cong. B. Eng. Biomédica, 2008.

ROGERO, S.O; LUGÃO, A.B; IKEDA, T.I; CRUZ, A, S. Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo comparativo entre Duas metodologias. **Materials Research**, vol.6, n.3, p. 317-320, 2003.

RUSZCZAK,Z; SCHWARTZ,R.A. Modern aspects of wound healing: An update. **Dermatol.Surg.**; v.26, p.219-229,2000.

SCULEAN,A; DONOS,N;BRECX,M; REICH,E; KARRING,T. Treatment of intrabony defects with guided tissue regeneration and enamel-matrix-proteins. An experiemental study in monkeys. **J Clin Periodontol**, v.27, p.466-472, 2000.

SIGURDSSON, T.J; HARDWICK, R; BOGLE, G.C; WIKESJÖ, U.M.E. Periodontal repair in dogs: space provision by reinforced e PTFE membranes enhance bone and cementum regeneration in large supraalveolar defectes. **J. Peridontol**, v.65, p. 350-356,1994.

SIMONDS,R.J; HOLMBERG,S.D;HURWITZ,R.L; COLEMAN,T.R; BOTTENFIELD,S; CONLEY,L.J; KOHLENBERG,S.H; CASTRO,K.G; DAHAN,B.A; SCHABLE,C.A. Transmission of human immune-deficiency virus type I from seronegative organ and tissue donor. **N Engl J Med**: 326, p. 726-732,1992.

SOARES, G.A; Biomateriais. **F. Biotec. Biomat.** 2005.

SÖDERHÄLL, C;MARENHOLZ, I; KERSCHER, T; RÜSCHENDORF, F; ESPARZA-GORDILLO, J; WORM, M; GRUBER, C; MAYR, G; ALBRECHT, M; ROHDE, K; SCHULZ, H; WAHN, U; HUBNER, N; LEE, Y. Variants in a novel epidermal collagen gene (COL29A1) are associated with Atopic Dermatitis. **PLoS Biol.**, v. 5, n. 9, p. 1952-1961, 2007.

SUZIGAN. S; BRAILE BIOMEDICA SA, São José do Rio Preto-SP. Analise histológica do pericárdio porcino. Relatório; 2007

THORWARTH.M, WEHRHAN.F, SROUR.S, SCHULTZE-MOSGAU.S, FELSZEGHY.E, BADER.R.D, SCHLEGEL.K.A. Evaluation of substitutes for bone: Comparison of microradrographic and histological assessments. **B. J. of Oral and Maxillofacial Surgery** v.45, p.41-47, 2007.

YISHIKAWA T. Bone reconstruction by cultured bone graft. **Mat Sci Engin**; v.13, p. 29-37, 2000.

TURRER. C. L, FIGUEIREDO. A. R. P, ORÉFICE. R. L, MACIEL. P.E, SILVEIRA. M. E. S, GONÇALVES. S. P, BARBI. J. S. F. O uso de implantes de compósito bioativo de biocerâmica em matriz polimérica na reconstrução do complexo zigomático orbitário: novas perspectivas em biomateriais. **Arq. Bras. Oftalmo**, v.71, n.2, p.153-161.

VILELA, A.S.B; **Matriz extracelular de pericárdio fibroso porcino**, Tese de Doutorado em Biologia celular estrutural na área histológica, Universidade Estadual de Campina, Campinas 2006.

Van der REST, M.,GARRONER, R.; Collagen family of proteins. **Faseb. J.** 5:2814-2823, 1991.

ANEXO A

ENSAIO DE ESTABILIDADE BIOLÓGICA

As matrizes tiveram suas espessuras medidas com um paquímetro, com variações como mostrado na tabela 4.

Tabela4 – Espessura das matrizes derivadas de pericárdio porcino (RODRIGUES, 2008); pericárdio bovino (GIGLIOTI, 2005).

Matrizes	Espessura
PP12	0,210 ± 0,070
PP24	0,230 ± 0,110
PPN	0,190 ± 0,070
PB12	0,779 ± 0,039
PB24	0,334 ± 0,028
PBN	0,255 ± 0,015

*PPN e PBN - pericárdios sem tratamento alcalino

A aparência microscópica das matrizes de PP é mostrada na figura 40. A Figura 40A mostra o pericárdio porcino sem tratamento alcalino, onde se pode ver a presença de células e fibras de colágeno (indicadas com seta). Após a hidrólise alcalina (figura 40B) se observa que as células foram removidas, deixando as matrizes acelulares, sendo que não há alterações significativas na aparência da matriz. Isto acontece já após 12h de tratamento alcalino, tanto para pericárdio porcino como pericárdio bovino (GIGLIOTI, 2005).

Figura 40: corte histológico do pericárdio porcino; (A) nativo; (B) PP matriz, após hidrólise alcalina; (HE, 40x).

Os ensaios de estabilidade biológica por collagenase foram feitos por ser uma indicação relativa da biodegradabilidade do material pós-implante. As porcentagens de degradação enzimática estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5 – Porcentagens de degradação enzimática das matrizes de PP (RODRIGUES, 2008) e PB (GIGLIOTI, 2005)

Matrizes	% degradação Enzimática
PPN	22,1 $\pm$ 1,1
PP12	41,4 $\pm$ 0,8
PP24	69,7 $\pm$ 1,2
PBN	25,2 $\pm$ 0,2
PB12	41,1 $\pm$ 0,3
PB24	83,1 $\pm$ 1,4

Os resultados mostraram um aumento no grau de hidrólise enzimática em função do aumento do número de grupos carboxílicos. Quanto maior o tempo de tratamento com hidrólise alcalina, mais rápido o material degrada. Pode-se observar através da tabela que as matrizes após o tratamento alcalino apresentam uma semelhança nos valores, o único que difere é o do PB24 do PP24, indicando que a matriz de PP24 é mais resistente à degradação por collagenase do que a matriz de PB24.

ANEXO B

CITOTOXICIDADE IN VITRO

Os testes de avaliação da toxicidade celular foram realizados no Laboratório de Cultura Celular do Instituto de Química de São Carlos, sob orientação da Profa. Dr. Janice Rodrigues Perussi.

Método de difusão em Agar

O teste de citotoxicidade in vitro foi realizado pelo método de difusão em ágar com linhagem celular VERO (CCL-81 ATCC-USA). As células na concentração 3×10^5 células/mL foram semeadas em placa de Petri (15 x 60 mm), no volume de 5 mL e incubadas durante 48h a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Após esse período, com a monocamada de células já formada, o meio de cultura foi desprezado e adicionado 5 mL do meio “overlay” em cada placa de Petri. Este meio é composto de partes iguais de mínimo de Eagle (MEM) e ágar a 1,8% contendo 0,01% de vermelho neutro. No momento do uso, o ágar foi fundido e misturado na mesma proporção com o MEM, ambos a uma temperatura de 44°C. Fragmentos com cerca de 0,25 cm² de área superficial das matrizes B1, B2, foram colocados sobre o ágar antes de sua solidificação completa. As placas de Petri foram incubadas novamente em estufa com 5% CO₂ a 37°C por 24h. Foram utilizados como controle positivo fragmentos de látex e como controle negativo, discos de papel de filtro de natureza atóxica, com área superficial de 0,25 cm². As amostras serão avaliadas em triplicata.

As placas analisadas macroscopicamente quanto à presença de halo e microscopicamente quanto à integridade celular ao redor da amostra. A característica de toxicidade é constatada com a presença de um halo claro ao redor do material testado. Este halo é observado quando há lise e morte celular, liberando o corante vermelho neutro ao local. A toxicidade é avaliada pela medida do diâmetro deste halo claro formado, medida com uma régua milimétrica. (ROGERO S.O., 2003).

ANEXO C

COLORAÇÃO HEMATOXILINA E EOSINA

Para que as lamínas histológicas sejam confeccionadas é necessária uma sequência de procedimentos que inclui:

Coleta do material; Fixação em parafina; Desidratação; Clareamento; Impregnação; Inclusão; Microtomia; Coloração.

A coloração constitui na utilização de técnicas tintoriais, para se obter a diferenciação luz entre tecidos, conferindo diferentes graus de absorção da luz incidente, o que possibilita melhor visualização de detalhes estruturais.

Corantes são constituídos de sais, que se comportam como ácidos são denominados como acidófilos e básicos são denominados como basófilos. A parte nucléica, rica em DNA (ácido desoxirribonucléico) é acidófila, e denominada basófila a parte de proteína citoplasmática.

Nesse trabalho foi usado dois tipos de coloração: Hematoxilina e Eosina, Método de Weigert.

Hematoxilina e Eosina:

Hematoxilina por ser um corante básico, tem afinidade aos componentes ácidos das células, denominados basófilos, corando núcleos em roxo.

Eosina tem afinidade aos componentes básicos das células, são denominados acidófilos ou eosinófilos, corando assim citoplasma, fibras colágenas em rosa.

HE (Hematoxilina-eosina): cora núcleos em roxo e estroma / citoplasma em rosa. Utilizada para estudar a presença ou ausência de núcleos (celularidade) e a morfologia tecidual em geral. Quando da identificação de núcleos, esta coloração presta-se somente para sugerir se as células estromais observadas na lâmina são fibroblastos (células usuais deste tecido) ou se o infiltrado inflamatório (quando presente) é composto de células mono ou polimorfonucleares. Esta coloração não é apropriada para identificação de fibras colágenas e

nem para diferenciação de tipos celulares, como por exemplo cortes transversais de fibroblastos X linfócitos ou linfócitos X mastócitos degranulados. (Suzegam. S, 2007)

Método de WEIGERT: VAN GEISON PARA ELÁSTINA E COLÁGENO

É uma mistura de dois corantes o Weigert e o Van Gieson, sendo esse com característica de acidófilos e basófilos, que cora fibras elásticas em azul escuro, fibras colágenas em rosa a vermelho, o núcleos em azul a preto e outros elementos em amarelo.

ANEXO D

Protocolo para uso de animal.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676
Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110
Fax: (016) 3361.3176
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
propq@power.ufscar.br - www.propq.ufscar.br

PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS

USO EXCLUSIVO DA COMISSÃO

PROTOCOLO Nº.: 050/07

RECEBIDO EM 18/10/07

1 - IDENTIFICAÇÃO DO EXPERIMENTO

1.1 - Título do Projeto / Aula Prática

Estudo da biocompatibilidade e toxicidade das matrizes de pericardio bovino e suíno.

1.2 - Finalidade Acadêmica do Experimento:

() GRADUAÇÃO

() Iniciação Científica

() Trabalho de Conclusão de Curso

(X) Pós-Graduação

() Especialização

(x) Mestrado

() Doutorado

() Pós-Doutorado

() Pesquisa

() Aula (Graduação/Pós-Graduação)

2 - EQUIPE

2.1 - Pesquisador Responsável ou Orientador

Nome: Flavia Correia Fuso

Instituição: USP-São Carlos

Depto.: Interunidades bioengenharia

Fone: 33739585

Fax: 33739586

e-mail: flafuso@hotmail.com

CPF: 216.689.438-08

2.2 - Colaboradores:

Código: 1 Docente

2 Pessoal Técnico

3 Graduando

4 Pós-graduando