Universidade de São Paulo

Interunidades Bioengenharia

RENATO DE MORAES

**Utilização da membrana de elastina associada
a hidroxiapatita e proteína morfogenética
óssea no reparo de defeitos cranianos de ratos**

São Carlos

2017

RENATO DE MORAES

Versão Corrigida

**Utilização da membrana de elastina associada a hidroxiapatita e
proteína morfogenética óssea no reparo de defeitos cranianos de
ratos**

Dissertação 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 de título de mestre em Ciências.

Área de Concentração: Bioengenharia

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Rodrigues da Cunha

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 e
Seção Técnica de Informática, EESC/USP com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

DM827u de Moraes, Renato
Utilização da membrana de elastina associada a
hidroxiapatita e proteína morfogenética óssea no reparo
de defeitos cranianos de ratos / Renato de Moraes;
orientador Marcelo Rodrigues da Cunha. São Carlos,
2017.

Dissertação (Mestrado) - 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,
2017.

1. Elastina. 2. Hidroxiapatita. 3. Proteína
morfogenética óssea. 4. Regeneração óssea. I. Título.

Bibliotecário responsável pela estrutura de catalogação da publicação:
Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

RENATO DE MORAES

Título: "Utilização da membrana de elastina associada a hidroxiapatita e proteína morfogenética óssea no reparo de defeito craniano de ratos".

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

Data da defesa: 24/10/2017

Prof. Dr. Marcelo Rodrigues da Cunha (Orientador)	Faculdade de Medicina de Jundiaí
Assinatura:	Não votante

Prof. Dr. Itihagi Rocha Machado	Faculdade de Medicina de Jundiaí
Assinatura:	Resultado: aprovado

Prof. Dr. Eduardo José Caldeira	Faculdade de Medicina de Jundiaí
Assinatura:	Resultado: APROVADO

Dra. Virginia da Conceição Amaro Martins	Instituto de Química de São Carlos / USP
Assinatura:	Resultado: APROVADO

Homologada em: ____/____/____

DEDICATÓRIA

À família

À minha esposa Ana Paula, pela compreensão, incentivo e estímulo durante a realização deste trabalho. Sou privilegiado em desfrutar do seu amor, companhia e presença em minha vida.

Aos meus filhos Anita e João, que me alegram e estimulam com sua simples presença.

À minha esposa Tatiana (*in memoriam*), pelos maravilhosos anos vividos ao seu lado.

Aos meus pais Roberto e Zilda (*In memoriam*), pelo incentivo e custeio da minha formação profissional e por me guiar ao caminho da bondade, da moral e dos bons costumes.

Ao meu irmão Roberto, pela presença nos bons momentos e especialmente nos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Itibagi Rocha Machado, pela marcante presença em minha formação profissional e pessoal. Agradeço pela oportunidade de conviver e desfrutar da sua amizade. Enfatizo também o seu estímulo a realização desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Marcelo Rodrigues da Cunha, meu orientador, o qual me direcionou na execução do trabalho com empenho, dedicação, simpatia e amizade.

À Profa. Dra Ana Maria de Guzzi Plepis, Dra. Virgínia da Conceição Amaro Martins e Dra Marília Marta Horn, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, campus São Carlos, pela cooperação, esclarecimentos e o desenvolvimento dos biomateriais deste trabalho.

À diretoria da Faculdade de Medicina de Jundiaí, representada pelo Prof. Dr. Itibagi Rocha Machado e Prof. Dr. Edimir Américo Lourenço pelo suporte técnico e apoio a pesquisa.

Aos colegas Marcelo Munhoz, Eduardo Machado e Fernando Cunha pelos momentos de descontração e auxílio nos procedimentos cirúrgicos dos animais.

Ao colega Ewerton Alexandre Galdeano pela grande colaboração no trabalho, através da preparação das lâminas histológicas e auxílio na formatação.

RESUMO

DE MORAES, R. **Utilização da membrana de elastina associada a hidroxiapatita e proteína morfogenética óssea no reparo de defeitos cranianos de ratos**. 2017. 106f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação Interunidades Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

Devido as limitações relacionadas ao emprego do enxerto autólogo, o uso dos biomateriais poliméricos naturais tornou-se uma opção viável em terapias regenerativas do tecido ósseo. O objetivo desse trabalho é avaliar de forma qualitativa e quantitativa a contribuição da membrana de elastina utilizada isoladamente ou em associação a hidroxiapatita e proteína morfogenética óssea, no reparo de defeitos ósseos no crânio de ratos. Foram utilizados 49 ratos (*Rattus norvegicus*, *Wistar*), machos, com peso aproximado de 330 gramas e 4 meses de idade. Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para a criação do defeito ósseo no osso parietal esquerdo e divididos em 7 grupos com 7 animais cada. Os grupos foram implantados com os seguintes biomateriais: grupo 1 controle (G1-C) sem implante, grupo 2 (G2-E24h) membrana de elastina 24 h, grupo 3 (G3-E24h/HA) membrana de elastina 24 h com hidroxiapatita, grupo 4 (G4-E24h/BMP) membrana de elastina 24 h com proteína morfogenética óssea, grupo 5 (G5-E96h) membrana de elastina 96 h, grupo 6 (G6-E96h/HA) membrana de elastina 96 h com hidroxiapatita, grupo 7 (G7-E96h/BMP) membrana de elastina 96 h com proteína morfogenética óssea. Após a morte indolor induzida em 6 semanas, as calotas cranianas foram retiradas para análise macroscópica, radiográfica, histológica e morfométrica. As análises macroscópicas, radiográficas e histológicas demonstraram a biocompatibilidade dos biomateriais utilizados. As médias e desvios-padrão do volume percentual relativo de osso neoformado nos defeitos cranianos dos grupos G1 a G7 foram $7,87 \pm 2,53$; $24,01 \pm 0,55$; $9,59 \pm 1,27$; $31,31 \pm 6,37$; $19,77 \pm 2,62$; $7,31 \pm 2,43$; $43,25 \pm 3,72$, respectivamente. Os biomateriais mostraram-se biocompatíveis e o grupo 7 (G7-E96h/BMP) resultou na maior neoformação óssea.

Palavras-chave: Elastina, Hidroxiapatita, Proteína morfogenética óssea, Regeneração óssea.

ABSTRACT

DE MORAES, R. **Use of elastin membrane associated with hydroxyapatite and bone morphogenetic protein in the repair of cranial defects of rats**, 2017. 106f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação Interunidades Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

Due to the limitations related to the use of autologous grafts, the use of natural polymeric biomaterials has become a viable option in regenerative therapies of bone tissue. The objective of this dissertation is to evaluate in qualitative and quantitative way the contribution of the elastin matrice used alone or in combination with hydroxyapatite and bone morphogenetic protein in the repair of bone defects in the skull of rats. Were use 49 Mices (*Rattus norvegicus*, *Wistar*), weighting approximately 330 grams and 4 months of age, were used. The animals were submitted to the surgical procedure to create the bone defect in the left parietal bone and divided into 7 groups with 7 animals each. The groups were implanted with the following biomaterials: group 1 control (G1-C) without biomaterial, group 2 (G2-E24h) 24 h elastin membrane, group 3 (G3-E24h / HA) 24 h elastin membrane with hydroxyapatite, Group 4 (G4-E24h/BMP) elastin membrane 24 h with bone morphogenetic protein, group 5 (G5-E96h) elastin membrane 96 h, group 6 (G6-E96h / HA) elastin membrane 96 h with hydroxyapatite, group 7 (G7-E96h/BMP) 96 h elastin membrane with bone morphogenetic protein. After painless death induced at 6 weeks, the skull caps were removed for macroscopic, radiographic, histological and morphometric analysis. Macroscopic, radiographic and histological analysis demonstrated the biocompatibility of the biomaterials used. The mean and standard deviations of the relative percentage volume of newly formed bone in the cranial defects of the G1 to G7 groups were $7,87 \pm 2,53$; $24,01 \pm 0,55$; $9,59 \pm 1,27$; $31,31 \pm 6,37$; $19,77 \pm 2,62$; $7,31 \pm 2,43$; $43,25 \pm 3,72$, respectively. The implanted biomaterials were shown to be biocompatible and the group 7 (G7-E96h / BMP) resulted with greater bone neoformation.

Keywords: Elastin, Hydroxyapatite, Bone morphogenetic protein, Bone regeneration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fotografias digitais dos biomateriais.....	26
Figura 2: Esquema representativo do planejamento cirúrgico e grupos de estudo.	28
Figura 3: Procedimento cirúrgico e enxertia no osso parietal esquerdo.....	29
Figura 4: Planos de corte transversais da calota craniana de ratos.....	33
Figura 5: Quantificação morfométrica e neoformação óssea.....	34
Figura 6: Imagens macroscópicas das calotas cranianas de G1 a G7	36
Figura 7: Imagens radiográficas das calotas cranianas de G1 a G7	37
Figura 8: Fotomicrografias em Tricrômico de Masson de G1 a G7.....	39
Figura 9: Fotomicrografias em Tricrômico de Masson de G1-C	40
Figura 10: Fotomicrografias em Tricrômico de Masson de G2-E24h.....	41
Figura 11: Fotomicrografias em Tricrômico de Masson de G3-E24h/HA.....	42
Figura 12: Fotomicrografias em Tricrômico de Masson de G4-E24h/BMP.....	43
Figura 13: Fotomicrografias em Tricrômico de Masson de G5-E96h.....	44
Figura 14: Fotomicrografias em Tricrômico de Masson de G6-E96h/HA.....	45
Figura 15: Fotomicrografias em Tricrômico de Masson de G7-E96h/BMP.....	46
Figura 16: Fotomicrografias em Picrosirius Red da borda de G1 a G7.....	48
Figura 17: Fotomicrografias em Picrosirius Red do centro de G1 a G7.....	49
Figura 18: Fotomicrografias em Picrosirius Red da borda de G1-C.....	50
Figura 19: Fotomicrografias em Picrosirius Red do centro de G1-C.....	51
Figura 20: Fotomicrografias em Picrosirius Red da borda de G2-E24h.....	52
Figura 21: Fotomicrografias em Picrosirius Red do centro de G2-E24h.....	53
Figura 22: Fotomicrografias em Picrosirius Red da borda de G3-E24h/HA.....	54
Figura 23: Fotomicrografias em Picrosirius Red do centro de G3-E24h/HA.....	55
Figura 24: Fotomicrografias em Picrosirius Red da borda de G4-E24h/BMP.	56
Figura 25: Fotomicrografias em Picrosirius Red do centro de G4-E24h/BMP.....	57
Figura 26: Fotomicrografias em Picrosirius Red da borda de G5-E96h.....	58
Figura 27: Fotomicrografias em Picrosirius Red do centro de G5-E96h.	59
Figura 28: Fotomicrografias em Picrosirius Red da borda de G6-E96h/HA.	60
Figura 29: Fotomicrografias em Picrosirius Red do centro de G6-E96h/HA.	61
Figura 30: Fotomicrografias em Picrosirius Red da borda de G7-E96h/BMP.	62
Figura 31: Fotomicrografias em Picrosirius Red do centro de G7-E96h/BMP.	63
Figura 32: Fotomicrografias em fluorescência de G1 a G7.....	65

Figura 33: Fotomicrografias em fluorescência de G1-C.....	66
Figura 34: Fotomicrografias em fluorescência de G2-E24h.....	67
Figura 35: Fotomicrografias em fluorescência de G3-E24h/HA.....	68
Figura 36: Fotomicrografias em fluorescência de G4-E24h/BMP.....	69
Figura 37: Fotomicrografias em fluorescência de G5-E96h.....	70
Figura 38: Fotomicrografias em fluorescência de G6-E96h/HA.....	71
Figura 39: Fotomicrografias em fluorescência de G7-E96h/BMP.....	72
Figura 40: Fotomicrografias da mineralização com Von Kossa de G1 a G7.....	74
Figura 41: Análise morfométrica do volume ósseo dos grupos G1 a G7.....	75
Figura 42: Análise estatística de G1 a G7.....	76
Figura 43: Eletrofotomicrografias das matrizes de elastina.....	103

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Sequência de injeção de marcadores fluorocromáticos.....	32
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

a: Alizarina

ATFO: Área total da falha óssea

ATFOe: Área total da falha óssea na região esquerda

ATFOd: Área total da falha óssea na região direita

ATN: Área total de neoformação

ATNe: Área total de neoformação na região esquerda

ATNd: Área total de neoformação na região direita

BMP: Bone Morphogenetic Protein (Proteína Morfogenética óssea)

c: Calceína

Ca(NO₃)₂·4H₂O: Nitrato de Cálcio

CEUA/FMJ: Comitê de Ética para Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Jundiaí

DNA: Deoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico)

ELP: Elastin-Like Peptides

g: Grama (unidade de medida)

G1: Grupo 1

G2: Grupo 2

G3: Grupo 3

G4: Grupo 4

G5: Grupo 5

G6: Grupo 6

G7: Grupo 7

G1-C: Grupo 1 Controle

G2-E24h: Matriz de elastina 24 h a 50°C enxertada no grupo 2

G3-E24h/HA: Matriz de elastina 24 h a 50°C associada à hidroxiapatita e enxertada no grupo 3

G4-E24h/BMP: Matriz de elastina 24 h a 50°C associada à proteína morfogenética óssea e enxertada no grupo 4

G5-E96h: Matriz de elastina 96 h a 37°C enxertada no grupo 5

G6-E96h/HA: Matriz de elastina 96 h a 37°C associada à hidroxiapatita e enxertada no grupo 6

G7-E96h/BMP: Matriz de elastina 96 h a 37°C associada à proteína morfogenética óssea e enxertada no grupo 6

h: Horas (unidade de medida)

HA: Hidroxiapatita

IQSC: Instituto de Química de São Carlos

IPEN: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

kg: Kilogramas (unidade de medida)

kW: kilowatts (unidade de medida)

M: Matriz

mA: Miliampere (unidade de medida)

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

mg: Miligramas (unidade de medida)

min: Minutos (unidade de medida)

mL: Mililitros (unidade de medida)

mm: Milímetros (unidade de medida)

nm: Nanômetros

Na₂HPO₄: Fosfato de Sódio Bibásico

NaCl: Cloreto de Sódio

(NH₄)₂HPO₄: Fosfato de Amônio Dibásico

O: Osso nativo

pH: Potencial Hidrogeniônico

PO: Pós-operatório

P1: Primeiro plano de corte histológico

P2: Segundo plano de corte histológico

P3: Terceiro plano de corte histológico

rhBMP: Bone Morphogenetic Protein Recombinant

RPM: Rotações por minuto

t: Tetracilina

TC: Tecido conectivo

TGFb: Fator de Crescimento Transformador Beta

μm: Microns (unidade de medida)

USP: Universidade de São Paulo

Val-Pro-Gly-Xaa-Gly: Valina-Prolina-Glicina-Xantina-Glicina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Enxertos Naturais.....	18
1.1.1. Autólogo	18
1.1.2. Homólogo	19
1.1.3. Heterólogo	20
1.2. Biomateriais	20
1.2.1. Elastina	20
1.2.2. Hidroxiapatita.....	22
1.3. Proteínas osteoindutoras	23
1.3.1. Proteína Morfogenética Óssea	23
2. OBJETIVO.....	25
2.1. Objetivos específicos.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1. Obtenção dos Materiais.....	26
3.2. Planejamento experimental	26
3.3. Técnica cirúrgica.....	28
3.4. Sutura dos tecidos e medicação.....	29
3.5. Morte indolor induzida dos animais e remoção das áreas cirúrgicas	29
3.6. Análise macroscópica das áreas cirúrgicas.....	30
3.7. Análise radiográfica	30
3.8. Processamento Histológico das amostras da área cirúrgica.....	30
3.9. Análise histológica por microscopia de luz transmitida (óptica)	31
3.10. Análise histológica por microscopia de luz polarizada	31
3.11. Análise histológica por microscopia de fluorescência	31
3.12. Análise histológica da mineralização pelo método de Von Kossa.....	32
3.13. Análise morfométrica	33
3.14. Análise estatística	35
4. RESULTADOS	36
4.1. Análise macroscópica:.....	36
4.2 Análise radiológica.....	36
4.3 Análise histológica por microscopia de luz transmitida (óptica)	38
4.4. Análise histológica por microscopia de luz polarizada	47
4.5. Análise histológica por microscopia de fluorescência	64
4.6. Análise histológica pelo método de Von Kossa.....	73
4.7. Análise Morfométrica	75

4.8. Análise Estatística	76
5. DISCUSSÃO	77
5.1. Modelo experimental	77
5.2. Biocompatibilidade.....	78
5.3. Reabsorção	80
5.4. Caracterização da osteoregeneração.....	82
6. CONCLUSÕES	87
7. REFERÊNCIAS.....	88
8. ANEXOS	102
A. Confecção e caracterização dos biomateriais.....	102
A.1. Membrana de elastina	102
A.2. Síntese da Hidroxiapatita	102
B. Comitê de Ética para Uso de Animais – CEUA.....	104
C. Apresentações em Congressos.....	105

1. INTRODUÇÃO

O sistema esquelético desempenha funções primordiais no corpo humano: proteção a órgãos vitais, suporte muscular, deslocamento do corpo, armazenamento de minerais e produção celular. Devido a sua contínua capacidade de remodelação, o tecido ósseo apresenta rápida regeneração em casos de resposta ao stress mecânico e funcional que possam gerar fraturas (HILL, 1998). Porém em casos de traumas de maior magnitude com grande cominuição ou perdas ósseas, infecções, ressecções tumorais, doenças congênitas e revisões de artroplastias, o processo natural de reparo pode estar comprometido, necessitando de um suporte biológico para recuperação anatômica e funcional (SEN; MICLAU, 2007; MAUFFREY et al., 2011; EGOL et al., 2015; HOSAKA et al., 2017). Para isto, estão disponíveis alguns tipos de enxerto a serem utilizados: autólogos, homólogos, heterólogos e enxertos sintéticos.

O autólogo é considerado o padrão ouro por apresentar células osteoblásticas, arcabouço para proliferação celular, fatores de crescimento e proteínas que estimulam a diferenciação celular, além de não provocar rejeição (GIANNOUDIS; EINHORN; MARSH, 2007; MAUFFREY et al., 2011). Entretanto, o seu uso é limitado pelo fato de ter pouca disponibilidade, necessidade de segundo procedimento cirúrgico, bem como, riscos de infecções e lesões neurovasculares na área doadora (BUZA; EINHORN, 2016). Similarmente, a utilização de enxertos homólogos e heterólogos, apesar de seu uso corrente, não estão imunes às complicações e limitações, como disponibilidade restrita e transmissão de doenças.

Todos os enxertos naturais acima mencionados apresentam desvantagens peculiares, que limitam o uso dos mesmos em grande escala. Desta maneira, a engenharia tecidual vem aprimorando biomateriais capazes de mimetizar o processo biológico de reparo ósseo em situações clínicas que necessitam da enxertia. Dentre esses, destacam-se os materiais poliméricos naturais devido a sua biocompatibilidade, bioabsorção, estabilidade molecular, regulação da fenotipagem celular, assim como a possibilidade de melhorar as suas propriedades por modificações químicas (CUNHA, 2006; HIRATA et al., 2015; JAHAN; TABRIZIAN, 2016). Na constituição dos polímeros naturais estão diversas substâncias, sendo que as mais comumente usadas em pesquisas clínicas e experimentais são: o

colágeno e a elastina (TAJEDA-MONTES et al., 2014; BASHA; SAMPATH KUMAR; DOBLE, 2015; YANG et al., 2015; DEBORDE et al., 2016; JAHAN; TABRIZIAN, 2016; KUTTAPPAN; MATHEW; NAIR, 2016; MIRANDA-NIEVES; ELLIOT, 2017).

1.1. Enxertos Naturais

1.1.1. Autólogo

O enxerto ósseo autólogo ainda é considerado o padrão ouro em cirurgias reconstrutivas com necessidade de enxerto ósseo. Não apresenta reação imunogênica e tem histocompatibilidade completa. Além disso, possui as propriedades de osteogênese, osteoindução e osteocondução, necessárias para o estímulo do crescimento ósseo e regeneração (CUNHA, 2001; ZIMMERMANN; MOGHADDAM, 2011; ZIZZARI et al., 2016). Outras características encontradas são: osteointegração, integridade estrutural e biodegradação. Os enxertos autólogos podem ser esponjosos, corticais, vascularizados e medulares (FINKEMEIER, 2002).

Os enxertos esponjosos são rapidamente incorporados ao sítio receptor devido a fácil revascularização e maior área de superfície. Devido ao seu formato preenchem de forma eficaz o espaço da área receptora, mas não apresentam suporte estrutural imediato, alcançando a mesma resistência do osso cortical somente após 6 a 12 meses do processo de enxertia (GAZDAG; LANE; GLASER, 1995). Sua principal fonte é a crista ilíaca anterior ou posterior, tíbia proximal ou distal e rádio distal (TAKEMOTO et al., 2010). Apresentam como desvantagens a disponibilidade limitada, morbidade em área doadora, riscos de infecção, dor residual, lesão nervosa, aumento de tempo operatório e maior tempo de internação hospitalar (DIMITRIOU et al., 2011; GRUSKAY et al., 2014).

Os enxertos corticais podem ser vascularizados ou não. Suas principais fontes são a fíbula, costelas e crista ilíaca (RICCIARDI; BOSTROM, 2013). Apresentam basicamente propriedades osteocondutoras, com algumas propriedades osteoblásticas e pouca ou nenhuma osteoindutiva (DELL; BURCHARDT; GLOWCZEWSKIE JR., 1985). Proporcionam um excelente suporte estrutural, sendo que os enxertos não vascularizados tem sua resistência diminuída nas primeiras

seis semanas devido a reabsorção e revascularização, o que não ocorre com enxertos vascularizados (DELL; BURCHARDT; GLOWCZEWSKIE JR., 1985; STEVENSON, 1999). Também possuem viabilidade limitada e apresentam possíveis complicações no local de retirada do enxerto como dor residual, infecção, perda sanguínea e fraturas (PUTZIER et al., 2009; NAUTH et al., 2015).

Os aspirados de medula óssea podem conter células osteoblásticas com quantidades relevantes de citocinas e fatores de crescimento, conferindo propriedades osteogênicas e osteoindutivas a esse tipo de enxerto. Podem ser aspiradas e imediatamente utilizadas, ou preparadas através de processo de concentrado de células (NAUTH et al., 2015). Volumes de até 100 a 150 mL podem ser aspirados da parte posterior da crista ilíaca. O procedimento é tecnicamente simples de ser realizado e com menor morbidade em ambiente ambulatorial, dispensando internações e custos adicionais (EMADEDIN et al., 2017).

1.1.2. Homólogo

Enxertos homólogos são aqueles oriundos de indivíduos da mesma espécie e são comumente usados como alternativa ao osso autólogo, respondendo por aproximadamente 1/3 dos enxertos utilizados nos Estados Unidos (BOYCE; EDWARDS; SCARBOROUGH, 1999). Apresentam como vantagem a quantidade abundante, evitam a morbidade e dor residual de outro procedimento, e consequente diminuição do tempo cirúrgico. É reconhecido que nenhum enxerto homólogo possui capacidade osteogênica, embora mantenham propriedades de osteocondução e em menor monta de osteoindução (GROSS, 2012). Para sua utilização são necessários processos de preparação, esterilização e armazenamento que são realizados através de irradiação, liofilização, congelamento e processos químicos. Essas são medidas preventivas que evitam a transmissão de doenças, mas por outro lado alteram a capacidade estrutural e viabilidade celular desses enxertos (DELLOYE et al., 2007; SINGH; SINGH; SINGH, 2016)

Os enxertos homólogos são apresentados em forma de matriz óssea desmineralizada, enxertos corticais, corticoesponjosos, lascas trituradas, enxertos osteocondrais e segmentos ósseos inteiros (FINKEMEIER, 2002; SHEIKH et al., 2017). Podem ser utilizados em diversas situações clínicas relacionadas ao trauma

como perdas de segmentos, em preenchimento de cavidades, em complementação a osteossíntese e não-união com necessidade de suporte estrutural, ou em conjunto com enxertos autólogos e proteínas osteoindutoras (CALORI et al., 2011). A transmissão de agentes bacterianos e virais continua sendo a maior preocupação relacionada ao uso dos enxertos homólogos, assim como a antigenicidade e um alto índice de falhas devido a fraturas e não união (MANKIN et al., 1996).

1.1.3. Heterólogo

Enxertos heterólogos são provenientes de espécies diferentes ao indivíduo transplantado. Fontes viáveis de enxerto heterólogo são os corais, bovinos, equinos e porcos (DEVELIOGLU; UNVER SARAYDIN; KARTAL, 2009). Durante o processamento, os enxertos heterólogos perdem sua capacidade osteogênica, contudo, apresentam atividade osteocondutora e osteoindutora parcial. Apesar de todo o cuidado em seu preparo, a transmissão de zoonoses ainda constitui a maior preocupação ao seu uso. Desvantagens associadas são: a imunogenicidade e o insucesso relatado em alguns ensaios clínicos (MOSHIRI; ORYAN, 2012).

1.2. Biomateriais

1.2.1. Elastina

A elastina é uma proteína polimérica presente na matriz orgânica extracelular, caracterizada por conferir propriedades elásticas aos órgãos e tecidos, sendo mais abundante onde a elasticidade é preponderante, como em vasos sanguíneos, pele, pulmão e ligamentos elásticos (PASQUALI-RONCHETTI; BACCARANI-CONTRI, 1997; FAURY, 2001; MARTYN; GREENWALD, 2001; BELLINGHAN; KEELEY, 2004). É formada através de ligações cruzadas do seu monômero precursor tropoelastina, entremeadas à uma estrutura microfibrilar de fibrilina (BELLINGHAN; KEELEY, 2004).

O uso dos materiais derivados da elastina como biomaterial tem invocado interesse da engenharia tecidual devido as características notáveis desta proteína estrutural: capacidade de coacervação da tropoelastina, elasticidade, grande estabilidade da substância (meia vida aproximada de 70 anos) e a atividade

biológica de sinalização e indução molecular dos peptídios derivados da degradação da elastina (POWELL; VINE; CROSSMAN, 1992; FULOP et al., 1998; KARNIK et al., 2003; SIMIONESCU; PHILIPS; VYAVAHARE, 2005; YEO et al., 2015; RAGNONI et al., 2016).

As fontes para obtenção da elastina para produção dos biomateriais provem da extração natural de enxertos, principalmente de origem animal e mais recentemente utilizando a terapia recombinante e a produção sintética (YEO et al., 2015). Fontes naturais humanas são escassas devido a expressão da tropoelastina ser reprimida em adultos. Como houve permanência de sequências importantes do gene da tropoelastina entre espécies, a utilização deste peptídeo derivado de animais tem sido disseminada em substituição à humana (CHUNG et al., 2006).

A elastina ou tropoelastina pode ser proveniente de fontes como: ligamento nucal equino ou bovino, grandes vasos (MOCZAR; MOCZAR; ROBERT, 1979), pavilhão auricular bovino (NASCIMENTO et al., 2012) e membrana de pericárdio equino e bovino (ROCHA et al., 2006), através de processos químicos com detergentes, enzimas (GRAUSS et al., 2005), solubilização (ROSENBLOOM, 1987) e hidrólise (NASCIMENTO et al., 2012).

A terapia recombinante utiliza o DNA da tropoelastina humana em sistemas de *Escherichia coli*, demonstrando ser funcionalmente similar a tropoelastina natural em sua habilidade de formar fibras elásticas maduras e com a vantagem adicional de ser produzida em larga escala (STONE et al., 2001).

Biopolímeros artificiais contendo elastina são denominados elastin-like peptides (*ELPs*). São baseados predominantemente na sequência hidrofóbica repetida da tropoelastina, mais comumente a sequência pentapeptídica Val-Pro-Gly-Xaa-Gly (VPGXG) (TRABBIC-CARLSON et al., 2004; OZSVAR et al., 2015). A produção dos *ELPs* ocorre através da síntese química ou terapia recombinante e a possibilidade de controle das sequências específicas de polipeptídeos, permite um controle das suas características físico-químicas e estruturais, aumentando assim, a diversidade de aplicação clínica dessas estruturas (YEO et al., 2015). A elastina e as *ELPs* também podem ser modificadas ou associadas a outras moléculas naturais ou sintéticas, incluindo peptídeos, proteínas, polissacarídeos e polímeros sintéticos, com a finalidade de melhorar a capacidade existente ou conferir propriedades adicionais aos compósitos formados (SELL et al., 2006; HAN et al., 2011;

MCCLURE; SIMPSON; BOWLIN, 2012; SWINDLE-REILLY; PARANJAPE; MILLER, 2014)

Os biomateriais a base de elastina são produzidos em forma de gel, partículas, fibras, tubos, folhas e filmes. No caso do seu uso como o revestimento de próteses orgânicas, tem o intuito de prover uma interface biológica ativa entre o implante e o tecido, como no caso de próteses cardio-vasculares (MITHIEUX; RASKO; WEISS, 2004, MITHIEUX et al., 2009; WOODHOUSE et al., 2004; MITHIEUX; WEISS, 2005; YIN et al., 2009; WATERHOUSE et al., 2010)

A utilização proposta aos biomateriais a base de elastina incluem carreamento de células indiferenciadas e fármacos (MACHULA; ENSLEY; KELLAR, 2014; MCGOWAN et al., 2016), produção de próteses valvulares cardíacas (PUTZU et al., 2016; GRANADOS et al., 2017), revestimento e regeneração de enxertos arteriais (BOLAND et al., 2004; MAHARA; KIICK; YAMAOKA, 2017) e nervos periféricos (HSUEH et al., 2014), funcionando também como substitutos a enxertos de pele (RUBIS et al., 2002; XIE et al., 2017), osso e cartilagem. (ANNABI et al., 2011; VILA et al., 2016; COLETTA et al., 2017; ZHU et al., 2017).

1.2.2. Hidroxiapatita

A hidroxiapatita (HA) é a ocorrência natural da forma mineralizada da apatita cálcica, estando presente na matriz óssea mineralizada dos ossos, na dentina e em pequenas calcificações encontradas em glândulas como a pineal (WANG et al., 2014). Apresenta a fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, com características de baixa solubilidade em meios ácidos (VIDEAU; DUPUIS, 1991; TADIC; EPPLE, 2004).

Em conjunto com o beta tricálcio fosfato, a HA é um dos biomateriais cerâmicos mais utilizados como substitutos aos enxertos ósseos nos últimos anos (FRIEB et al., 2002). As principais fontes de hidroxiapatita provêm: dos corais através do tratamento hidrotérmico formando a hidroxiapatita coralina (WHITE; SHORS, 1986), por desproteinização de tecidos ósseos de animais (Mangano et al., 2007) e também por formulações sintéticas com precipitação de soluções aquosas ou reações de estado sólido (OSAKA, 1991; NANDI; KUNDU; GHOSH, 2008).

Apesar de não ser um material com atividade osteogênica e osteoindutora, sua capacidade osteocondutora e biocompatibilidade são devidos a sua similaridade

química com a parte mineralizada da matriz óssea (ERBE et al., 2001; GHOSH et al., 2008). Essas características favorecem a conexão, migração, proliferação e expressão fenotípica de células ósseas, permitindo a formação de osso novo diretamente depositado sobre o biomaterial (ZIMMERMANN; MOCHADDAM, 2011). A porosidade e o tamanho dos poros, variando entre 200 e 500 μm , também são equivalentes ao encontrado no osso esponjoso. Entretanto, havendo poros de maior tamanho, a reabsorção da HA é lenta podendo levar anos ou até mesmo não ocorrer (HAK, 2007).

Como outras cerâmicas, a HA apresenta alta resistência e baixa ductilidade, significando que sofrem pouca deformação, mas como são quebradiços, falham quando sofrem cargas que ultrapassam sua capacidade de resistência. A hidroxiapatita coralina apresenta resistência compressiva discretamente superior ao osso esponjoso, aumentando proporcionalmente com o crescimento ósseo progressivo (MARTIN et al., 1993).

A HA é encontrada em pó, blocos, grânulos e cimento, além de poder ser densa ou porosa (CUNHA, 2001). A sua utilização principal é para o preenchimento de defeitos ou cavidades ósseas metafisárias pós-trauma, bem como em associação ao enxerto autólogo (HAK, 2007). Também vem sendo usada no revestimento das hastes de próteses e parafusos para melhora da fixação implante-osso, bem como atuando como carreador de fatores de crescimento osteoindutivos como as proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) (NOSHI et al., 2000; NGUYEN et al., 2004; MORONI et al., 2005).

1.3. Proteínas osteoindutoras

1.3.1. Proteína Morfogenética Óssea

Proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) são glicoproteínas não colágenas de baixa massa molar presentes na matriz extracelular óssea. Pertencem a superfamília dos fatores transformadores de crescimento beta (TGF β), com pelo menos 20 subtipos identificados, sendo que somente as BMPs 2, 4, 6 e 9 demonstraram propriedades osteogênicas (CHENG et al., 2003). Conjuntamente com outras moléculas sinalizadoras: citocinas, fatores de crescimento derivados de plaquetas, fatores de crescimento derivados de fibroblastos, fatores de crescimento derivados

de insulina, metaloproteinases e fatores angiogênicos, participam ativamente do processo de consolidação óssea através da indução da cascata de eventos celulares que promovem quimiotaxia, proliferação, migração e diferenciação de células medulares mesenquimais (DIMITRIOU; TSIRIDIS; GIANNOUDIS, 2005).

As moléculas dos vários tipos de BMPs induzem a formação óssea ao agirem sinergicamente, onde cada uma funciona em fases diferentes da diferenciação osteoblástica e osteogênese (WOZNEY et al., 1988; CELESTE et al., 1990). A ocorrência natural das BMPs está presente apenas em quantidades limitadas e sua extração de doadores humanos não é uma opção para uso médico rotineiro, sendo utilizadas terapias genéticas recombinantes para sua obtenção (LANE, 2005). As BMP recombinantes viáveis são a rhBMP-2 e rhBMP-7, sendo que ambas tem propriedades osteogênicas e são consideradas as moléculas indutoras mais potentes para o reparo ósseo. Dúvidas na prática clínica incluem: dose, melhor momento de aplicação, associação com outros enxertos naturais e sintéticos e o melhor carreador disponível (NAUTH et al., 2015).

2. OBJETIVO

O experimento tem como objetivo avaliar de forma qualitativa e quantitativa a contribuição da membrana de elastina associada a hidroxiapatita e a BMP no processo de consolidação óssea.

2.1. Objetivos específicos

- Avaliar a biocompatibilidade dos biomateriais utilizados no reparo de defeitos cranianos em ratos através da análise clínica das condições macroscópicas, radiográficas e microscópicas da área cirúrgica;
- Determinar a relação entre a reabsorção do biomaterial com o processo de osteogênese na área cirúrgica;
- Caracterizar a morfologia do tecido ósseo neoformado e matriz extracelular na área da lesão;
- Quantificar o volume relativo de osso neoformado na lesão óssea provocada;
- Estabelecer qual combinação de biomateriais apresenta melhor capacidade de regeneração óssea.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção dos Materiais

As matrizes de elastina e a hidroxiapatita foram confeccionadas e fornecidos pela Profa. Dra. Ana Maria Guzzi Plepis, Dra. Virginia Conceição Amaro Martins e Dra. Marília Marta Horn, do Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo (IQSC). As membranas foram produzidas em forma de disco com 5 mm de diâmetro e são derivadas da cartilagem auricular bovina, conforme procedimento descrito no anexo A. A BMP utilizada foi a rhBMP-2 μg (R&D system inc., Minneapolis, MN, USA). Abaixo, imagens macroscópicas dos biomateriais utilizados (Figura 1).

Figura 1: Fotografias digitais dos biomateriais

Fonte: Próprio autor. (M) Matriz de elastina; (HA) Hidroxiapatita em grânulos; (BMP) rhBMP-2.

3.2. Planejamento experimental

Utilizou-se 49 animais, ratos machos da espécie (*Ratus norvegicus*, Wistar), com 12 semanas de idade e aproximadamente 330 g, fornecidos pelo Biotério da Granja R.G. (Suzano, SP) e do IPEN (Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares). Os animais ficaram alojados no biotério da Faculdade de Medicina de Jundiaí e alimentados com ração balanceada (purina), água *ad-libitum* e ambiente enriquecido com tubos (relax). Houve controle de temperatura no local ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) com ciclo claro/escuro de 12/12 horas. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética

para uso de animais da Faculdade de Medicina de Jundiaí protocolo nº 56/2015 (Anexo B). Os animais foram alocados em 7 grupos com 7 animais cada, conforme descrito abaixo e exemplificado na Figura 2:

GRUPO 1 (G1-C): Falha no óssea no crânio e sem enxerto.

GRUPO 2 (G2-E24h): Falha óssea no crânio, com matriz de elastina de 24 h a 50°C.

GRUPO 3 (G3-E24h/HA): Falha óssea no crânio, com matriz de elastina de 24 h a 50°C e HA.

GRUPO 4 (G4-E24h/BMP): Falha óssea no crânio, com matriz de elastina de 24 h a 50°C e BMP.

GRUPO 5 (G5-E96h): Falha óssea no crânio, com matriz de elastina de 96 h a 37°C.

GRUPO 6 (G6-E96h/HA): Falha óssea no crânio, com matriz de elastina de 96 h a 37°C e HA.

GRUPO 7 (G7-E96h/BMP): Falha óssea no crânio, com membrana de elastina de 96 h a 37°C e BMP.

Figura 2: Esquema representativo do planejamento cirúrgico e grupos de estudo.

Fonte: Próprio autor.

3.3. Técnica cirúrgica

Inicialmente, como solução anestésica foi utilizado Dopalen® (Ketamina) um anestésico geral e Coopazine® (Xilazina) medicação com ação sedativa, analgésica e relaxante na proporção de 1:1 e dose de 0,10 mg/100 g de massa corpórea, via intramuscular na região glútea (CUNHA et al., 2008). Os animais foram posicionados em decúbito ventral com proteção ao globo ocular com gaze embebida em solução fisiológica 0,9%. Realizou-se a tricotomia da área calvária, seguida de lavagem, antissepsia e assepsia local imediatamente antes da incisão. A pele foi seccionada sagitalmente na linha média do crânio e afastada para visualização óssea. O periósteo foi descolado cuidadosamente para exposição do osso parietal esquerdo e sob irrigação copiosa com solução salina foi criado um defeito de 5 mm de diâmetro com uma broca cirúrgica trefina acoplada a um mini motor (ELTEC LB-100, Eltec

Elektronik AG, Mainz, Alemanha) (ROJBANI et al., 2011; PEREIRA et al., 2012). Após lavagem local com solução fisiológica 0,9% para retirada dos debris, e de acordo com os respectivos grupos, o defeito foi preenchido com as matrizes de elastina associadas ou não a BMP na dose 5 µg instilada na face superior da matriz e a HA em pó depositada sobre a matriz (Figura 3).

Figura 3: Procedimento cirúrgico e enxertia no osso parietal esquerdo

Fonte: Próprio autor. (A) Tricotomia e antissepsia; (B) incisão sagital; (C) rebatimento do periósteo e exposição do osso parietal esquerdo; (D) criação do defeito ósseo de 5mm de diâmetro; (E) enxertia com biomaterial

3.4. Sutura dos tecidos e medicação

O fechamento do periósteo e da pele foi realizado com fio de nylon 5.0 (*Ethicon*, Johnson & Johnson®) e aplicado antibiótico rifamicina spray. Logo após o procedimento, cada animal recebeu uma dose de 0,1 mg/100 g de peso do antibiótico Pentabiotic Veterinário Pequeno Porte (*Fort Dodge*®), via intramuscular. Durante o pós-operatório foi oferecida uma dosagem de analgésico (paracetamol) na dose de 200 mg/kg de peso do animal, via oral, três vezes ao dia (LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2009). Os animais permaneceram em gaiolas separadas, alimentados com ração comum e água *ad-libitum* e a limpeza das gaiolas com troca da maravalha foi realizada em torno de 3 vezes/semana.

3.5. Morte indolor induzida dos animais e remoção das áreas cirúrgicas

A morte indolor foi realizada após 6 semanas do procedimento cirúrgico, através de anestesia intraperitoneal de 0.2 mL/100 g da solução de ketamina e xilazina, seguida de perfuração do diafragma para indução de pneumotórax.

3.6. Análise macroscópica das áreas cirúrgicas

Após constatado a morte dos animais, a ressecção das calotas cranianas ocorreu com serra oscilatória Taimim (YDJZ-IID) e foram fotodocumentadas com máquina digital NIKON para o registro das condições clínicas da lesão óssea.

3.7. Análise radiográfica

Utilizou-se aparelho Odel 300 mA, foco com 100 mA, tempo de 0,06 s e radiação de 40 kW. As imagens foram digitalizadas pelo sistema agfa e avaliadas quanto à integridade da falha óssea e áreas adjacentes (CUNHA et al., 2011).

3.8. Processamento Histológico das amostras da área cirúrgica

As amostras contendo a área receptora do enxerto permaneceram imersas em formol tamponado 10% (Allkimia® - Campinas/SP - Brasil) durante 10 dias, seguidas de imersão em solução descalcificante de cloreto de hidrogênio (Allkimia® - Campinas/SP - Brasil). A solução foi trocada a cada 3 dias em um período que variou entre 15 e 20 dias. Após a descalcificação as amostras foram lavadas em água corrente. As mesmas foram inseridas em cassetes histológicos e submetidas ao processo de desidratação e diafanização em processador automático de tecidos LUPE®PT, contendo 2 recipientes com formol tamponado 10%, 4 recipientes com álcool absoluto, 4 contendo xilol 100% e 2 recipientes com parafina líquida a 70°C. O tempo de imersão das amostras em cada recipiente foi de 1 hora, totalizando um processo de 12 horas. Em seguida as amostras foram incluídas verticalmente em bloco de parafina e congeladas a -5°C e foram submetidas a cortes semisseriados com 5 µm de espessura. Após o processo de desparafinização foram coradas com os seguintes marcadores ósseos: Tricrômico Masson, Picrosírus, Fluorocromáticos e Von Kossa. Para análise histológica dessas técnicas foi utilizado o fotomicroscópio Motic BA310E com objetivas de 4,10 e 40 vezes (CALDINI, 2002).

3.9. Análise histológica por microscopia de luz transmitida (óptica)

Nesta técnica, utilizou-se o Tricrômico de Masson que permitiu diferenciar osso maduro original corado em vermelho do osso neoformado imaturo que se cora em azul, além da possibilidade de visualização das fibras colágenas que também coram-se em azul. As imagens histológicas nos permite uma análise qualitativa da neoformação óssea, pela distinção da evolução da organização óssea, bem como fornecendo características dos componentes da matriz extracelular pela identificação do tecido predominante.

3.10. Análise histológica por microscopia de luz polarizada

O método Picrosirius Red (solução aquosa saturada de ácido pícrico adicionada de 0,1 g de vermelho da Síria F3b, Sírius Red F3B-Bayer) permite avaliar o colágeno formado no início da consolidação óssea. O Picrosirius Red interage com as moléculas do colágeno, intensificando a sua capacidade de birrefringência (MONTES; JUNQUEIRA, 1991).

3.11. Análise histológica por microscopia de fluorescência

A fluorescência é uma técnica amplamente utilizada nas avaliações de reparos ósseos. Os fluorocromos quando ligados aos íons de cálcio podem ser identificados nos locais de mineralização óssea na forma de cristais de hidroxiapatita, sendo eficiente na avaliação dinâmica da formação óssea. Permite a identificação do início e localização da mineralização, bem como determinar os períodos com maior osteogênese, através da inoculação de diferentes fluorocromos em intervalos de tempo específicos (VAN GAALEN et al., 2010)

Através da técnica de fluorescência óssea, proposta por Konig Jr., (2010), foi possível identificar 3 períodos distintos da regeneração óssea: **Primeiro período** do 0 ao 12º dia pós-cirúrgico (PO) (tecido neoformado corado por Alizarina); **Segundo período** corresponde do 12º ao 24º dia de PO (tecido neoformado marcado por Calceína); **Terceiro período** corresponde do 24º ao 36º dia de PO (tecido

neoformado corado por Tetraciclina). A metodologia de aplicação e concentração dos corantes fluorocromáticos, está exemplificada no quadro abaixo:

Quadro 1. Sequência de injeção de marcadores fluorocromáticos.

Dias (pós-cirurgia)	Marcador	Solução Injetada (Kg)
0	Alizarina	30mg +1ml soro + 20mg de Na ₂ HPO ₄
6	Alizarina	30mg +1ml soro + 20mg de Na ₂ HPO ₄
12	Calceína	10mg + 1ml soro + 20mg de Na ₂ HPO ₄
18	Calceína	10mg + 1ml soro + 20mg de Na ₂ HPO ₄
24	Tetraciclina	60mg + 1ml soro + 20mg de Na ₂ HPO ₄
30	Tetraciclina	60mg + 1ml soro + 20mg de Na ₂ HPO ₄
36	Sacrifício	

Fonte: Extraído e modificado de König Jr., (2010).

A solução fluorocromática de Alizarina e Calceína, foram administradas via subcutânea, no dorso dos animais, enquanto que a solução fluorocromática de Tetraciclina foi aplicada via intramuscular. Nessa técnica, as cores indicam o comprimento de ondas do feixe de luz do microscópio: vermelho da alizarina (543 nm), verde da calceína (488 nm) e o amarelo da tetraciclina (543 nm) (KONIG Jr., 2010)

3.12. Análise histológica da mineralização pelo método de Von Kossa

Von Kossa é uma técnica histológica para identificação de depósitos de cálcio responsáveis pela formação de ilhas de mineralização em uma camada celular. Quanto mais escuros esses depósitos são observados, maior a quantidade de cálcio depositado, sendo um bom indicador da extensão da mineralização extra-articular (BRITO et al., 2016).

3.13. Análise morfométrica

Os cortes seriados com 5 μ m de espessura e corados com Tricrômio de Masson foram coletados de 3 pontos diferentes da falha óssea de todos os grupos, possibilitando a quantificação da neoformação óssea ao longo da área cirúrgica (Figura 4):

Figura 4: Planos de corte transversais da calota craniana de ratos.

Fonte: Próprio autor. Esquematização dos níveis de corte efetuados para a análise quantitativa da neoformação óssea.

Cada imagem foi quantificada com auxílio do software Motic Images Plus 2.0 ML usando o Fotomicroscópio Motic BA310. Para isto, mediu-se a largura da cortical através de linhas guia, que em seguida, foram replicadas e posicionadas ao longo da falha óssea, com a finalidade de mimetizar a continuação do contorno ósseo original de cada animal (as linhas guias tinham as mesmas medidas da espessura da cortical) (Figura 5: A1 e A2). Após este processo, foi traçado manualmente um contorno que partia da borda esquerda e da borda direita da falha óssea, em direção ao centro da falha, respeitando os limites das linhas guias. Deste modo, obteve-se a área total demarcada, que correspondia à área total da falha óssea (Figura 5: B1 e B2). Em seguida, os pontos de neoformação óssea foram demarcados manualmente na região esquerda e direita, obtendo-se suas respectivas áreas (Figura 5: C1 e C2).

Figura 5: Quantificação morfométrica da área experimental e neoformação óssea.

Fonte: Próprio autor. (A1 e A2) Posicionamento das linhas guia das regiões esquerda e direita da área enxertada; (B1 e B2) demarcação da área total da falha óssea das regiões esquerda e direita da área experimental; (C1 e C2) demarcação dos focos de osteogênese das regiões esquerda e direita da área experimental.

Assim, com a razão dos dados relativos à área total da falha óssea (ATFO) esquerda e direita, e área total de neoformação (ATN) esquerda e direita, obteve-se o percentual de regeneração óssea de cada corte histológico:

$$\frac{\text{ATNe} + \text{ATNd}}{\text{ATFOe} + \text{ATFOd}} \times 100 = \text{Percentual do primeiro nível de corte (P1)}$$

Também foram coletados os percentuais de neoformação para o segundo nível de corte (P2) e para o terceiro nível de corte (P3), seguindo a mesma fórmula citada acima. Com os dados coletados e transcritos para software Office Excel 2000, obteve-se por média simples, o percentual de regeneração óssea de cada rato e subsequentemente, o percentual de regeneração óssea para cada grupo de estudo, assim como o seu respectivo desvio padrão.

3.14. Análise estatística

Os dados relativos aos percentuais de osso neoformado nas áreas cirúrgicas de todos os grupos foram transcritos para o software BioEstat 5.0 para a análise estatística utilizando os testes ANOVA, seguido de Tukey (CUNHA et al., 2017).

4. RESULTADOS

4.1. Análise macroscópica:

Houve a cicatrização adequada da ferida cirúrgica em todos os animais, com ausência de deiscência de sutura, ulcerações ou sinais de infecção da ferida. Observou-se a integridade da calota craniana em todos os grupos, com ausência de sinais inflamatórios nas bordas dos defeitos ósseos, granulomas, erosões, tumorações ou outras alterações indicativas de reação imunológica provocada pelos materiais implantados (G2 a G7). Em nenhum dos grupos houve reabsorção integral do biomaterial. Entretanto, os grupos G4 e G7 apresentavam maior homogeneidade nas peças com menor visualização das membranas e indefinição do contorno da falha óssea (Figura 6):

Figura 6: Imagens macroscópicas das calotas cranianas de G1 a G7.

Fonte: Proprio autor. Note as áreas cirúrgicas (setas) preservadas e sem indícios de infecções ou necroses.

4.2 Análise radiológica

Não houve sinais radiográficos sugestivos de alterações patológicas na área cirúrgica em todos os grupos estudados. Devido a ausência de sinais de reabsorção óssea, fratura secundária e infecção, os materiais usados podem ser considerados biocompatíveis. Os defeitos ósseos experimentais foram identificados com boa definição das suas margens radiopacas. No centro da lesão, a imagem radiolúcida foi predominante em G1 e G2. Nos demais grupos, G3 a G7, notou-se uma densidade maior no centro devido a presença do material que não foi totalmente reabsorvido dentro do período experimental (Figura 7).

Figura 7: Imagens radiográficas das calotas cranianas de G1 a G7.

Fonte: Próprio autor. Área cirúrgica sem enxerto em G1 e área cirúrgica com enxerto de G2 a G7 (setas).

4.3 Análise histológica por microscopia de luz transmitida (óptica)

Em comum a todos os grupos corados com Tricrômico de Masson houve formação óssea oriunda da face periostal do osso original em direção ao defeito crítico com variação no montante da formação óssea, bem como na maturação do osso neoformado. A neoformação óssea apresentava em sua maioria características de osso imaturo, observando-se osteócitos em lacunas dispersas e irregulares. Não houve sinais de rejeição tecidual, pois em nenhum dos grupos contendo os materiais foram observadas células características do processo inflamatório como células gigantes, neutrófilos e linfócitos (Figuras 8 a 15).

Figura 8: Fotomicrografias em Tricrômico de Masson de G1 a G7.

Fonte: Próprio autor. Áreas de neoformação óssea nas bordas e no centro da lesão (seta); (O) osso nativo; (DC) defeito Crítico; aumento 40x.

Em particular no grupo 1 controle (G1-C) notou-se pequena neoformação óssea isolada na borda da lesão, oriunda do osso original e alinhada com a superfície periosteal. O centro da lesão foi essencialmente preenchido por tecido conectivo desorganizado (Figura 9).

Figura 9: Fotomicrografias em Tricrômico de Masson de G1-C.

Fonte: Próprio autor. Borda da área experimental (A); centro da área experimental (B); evidenciam-se as bordas da lesão com projeção de pequena neoformação óssea (Setas); centro da lesão óssea com tecido conectivo (TC); osso nativo (O); defeito Crítico (DC); lacunas de osteócitos (OCT). Aumentos 40x, 100x e 400x.

O grupo 2 (G2-E24h) apresentou neoformação óssea predominantemente de característica imatura e com avanço centrípeto, subperiosteal e margeando superiormente a membrana implantada. Em algumas partes, houve invaginações ósseas até a camada média da membrana de elastina. O periósteo regenerou-se em toda sua extensão na área da lesão (Figura 10).

Figura 10: Fotomicrografias em Tricrômico de Masson de G2-E24h.

Fonte: Próprio autor. Borda da área experimental (A); centro da área experimental (B); evidenciam-se as áreas de neoformação óssea (Setas); presença de tecido conectivo (TC); osso nativo (O); lacunas de osteócitos (OCT); matriz de elastina 24 h a 50°C (G2-E24h). Aumentos 40x, 100x e 400x.

O grupo 3 (G3-E24h/HA) apresentou discreta neoformação óssea isolada na borda do osso nativo. Houve predomínio de tecido conectivo na área da lesão e envolvendo a membrana de elastina a qual ainda permaneceu preservada e intacta, sem sinais de reabsorção ou de neoformação óssea em seu interior. Também ficou evidente a presença de tecido conectivo entre a borda do osso nativo e o material implantado (Figura 11).

Figura 11: Fotomicrografias em Tricrômico de Masson de G3-E24h/HA.

Fonte: Próprio autor. Borda da área experimental (A); centro da área experimental (B); evidenciam-se as áreas de neoformação óssea (Setas); presença de tecido conectivo (TC); osso nativo (O); matriz de elastina 24 h a 50°C associada à hidroxiapatita (G3-E24h/HA). Aumentos 40x, 100x e 400x.

O grupo 4 (G4-E24h/BMP) apresentou osso neoformado imaturo a partir da margem da lesão óssea e também em região subperiosteal, com aspecto de fina camada ao longo da margem superior do material implantado e em toda extensão da lesão. Houve projeção do osso jovem para o interior da membrana implantada (Figura 12).

Figura 12: Fotomicrografias em Tricrômico de Masson de G4-E24h/BMP.

Fonte: próprio autor. Borda da área experimental (A); centro da área experimental (B); áreas de neoformação óssea (Setas); presença de tecido conectivo (TC); osso nativo (O); lacunas de osteócitos (OCT); matriz de elastina 24 h a 50°C associada à *BMP* (G4-E24h/BMP). Aumentos 40x, 100x e 400x.

O grupo 5 (G5-E96h) apresentou tecido conectivo entre o osso original e a membrana de elastina que continuava presente em sua maioria. Houve formação isolada de ilhota óssea na extremidade da lesão provocada com predomínio de osso imaturo no centro e maduro na borda. No centro de lesão observou-se basicamente a presença da membrana entremeada em tecido conectivo (Figura 13).

Figura 13: Fotomicrografias em Tricrômico de Masson de G5-E96h.

Fonte: Próprio autor. Borda da área experimental (A); centro da área experimental (B); áreas de neoformação óssea (Setas); presença de tecido conectivo (TC); osso nativo (O); lacunas de osteócitos (OCT); matriz de elastina 96 h a 37°C (G5-E96h). Aumentos 40x, 100x e 400x.

O grupo 6 (G6-E96h/HA) demonstrou reabsorção incompleta e irregular da matriz de elastina com presença dos grânulos de HA. Predominou-se a presença de tecido conectivo na interface osso/implante bem como no centro da lesão e envolvendo o material enxertado (Figura 14). A pouca neoformação óssea concentrou-se nas margens da lesão.

Figura 14: Fotomicrografias em Tricrômico de Masson de G6-E96h/HA.

Fonte: Próprio autor. Borda da área experimental (A); centro da área experimental (B); evidenciam-se as áreas de neoformação óssea (Setas); tecido conectivo (TC); osso nativo (O); lacunas de osteócitos (OCT); matriz de elastina 96 h a 37°C associada à hidroxiapatita (G6-E96h/HA). Aumentos 40x, 100x e 400x.

O grupo 7 (G7-E96h/BMP) apresentou uma ponte óssea unindo as bordas do defeito craniano, composto predominantemente de osso maduro, com absorção avançada da matriz de elastina. As extremidades da neoformação óssea mostraram-se mais delgadas e o centro apresentou espessura próxima ao do osso original. Lacunas mais organizadas foram observadas com osteócitos no seu interior. Não houve tecido conectivo entre o osso original e o osso neoformado (Figura 15):

Figura 15: Fotomicrografias em Tricrômico de Masson de G7-E96h/BMP.

Fonte: Próprio autor. Borda da área experimental (A); centro da área experimental (B); áreas de neoformação óssea (Setas); osso nativo (O); lacunas de osteócitos (OCT); matriz de elastina 96 h a 37°C associada à *Bone Morphogenetic Protein* (G7-E96h/BMP). Aumentos 40x, 100x e 400x.