Universidade de São Paulo

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia

Marcelo de Azevedo e Souza Munhoz

**Capacidade osteorregenerativa da elastina, hidroxiapatita e
proteína morfogenética óssea no tratamento de defeitos
femorais em ratos**

São Carlos

2018

Marcelo de Azevedo e Souza Munhoz

**Capacidade osteorregenerativa da elastina, hidroxiapatita e
proteína morfogenética óssea no tratamento de defeitos femorais
em ratos**

Versão corrigida

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

Área de Concentração: Bioengenharia

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Rodrigues da Cunha

São Carlos
2018

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 elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues
Fontes da EESC/USP

M966c Munhoz, Marcelo de Azevedo Souza
 Capacidade osteorregenerativa da elastina,
 hidroxiapatita e proteína morfogenética óssea no tratamento
 de defeitos femorais em ratos / Marcelo de Azevedo Souza
 Munhoz ; orientador Marcelo Rodrigues da Cunha. -- São
 Carlos, 2018.

 Tese (Doutorado)- Programa de Pós-Graduação
 Interunidades em Bioengenharia e Área de Concentração em
 Bioengenharia -- Escola de Engenharia de São Carlos da
 Universidade de São Paulo, 2018.

 1. Elastina. 2. Hidroxiapatita. 3. Receptores de
 proteínas morfogenéticas. 4. Materiais biocompatíveis.
 5. Ossointegração. I. Título.

Elaborado por Elena Luzia Palloni – CRB 4464

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARCELO DE AZEVEDO E SOUZA MUNHOZ

Título da Tese:

"CAPACIDADE OSTEORREGENERATIVA DA ELASTINA, HIDROXIAPATITA E PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA NO TRATAMENTO DE DEFEITOS FEMORAIS DE RATOS"

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

Data da defesa: 23/03/2018

Prof. Dr. Marcelo Rodrigues da Cunha (Orientador)	Faculdade de Medicina de Jundiaí
Assinatura:	Resultado: <i>APROVADO</i>

Prof. Dr. Itibagi Rocha Machado	Faculdade de Medicina de Jundiaí
Assinatura:	Resultado: <i>Aprovado</i>

Profa. Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis	Instituto de Química de São Carlos / USP
Assinatura:	Resultado: <i>aprovado</i>

Prof. Dr. Eduardo José Caldeira	Faculdade de Medicina de Jundiaí
Assinatura:	Resultado: <i>APROVADO</i>

Prof. Dr. Sergio Akinobu Yoshioka	Instituto de Química de São Carlos / USP
Assinatura:	Resultado: <i>Aprovado</i>

Homologado em: ____/____/____

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos responsáveis por inspirar e incentivar minha vida acadêmica, profissional e pessoal, agradecendo a compreensão nos eventuais momentos de ausência do convívio diário:

- *Meus saudosos Avós, Rui e Ita (in memorian);*
- *Meus pais queridos, Paulo e Beatriz e meu irmão Gustavo;*
- *Minha família amada, Ana Paula, Luiza e Pedro.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Itibagi Rocha Machado pela contribuição na minha formação profissional e pessoal. Gratidão ao Amigo de sempre, presente desde o início da minha vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. Marcelo Rodrigues da Cunha pela orientação, sabedoria, amizade e incentivos ao longo desta jornada.

À Profa. Dra Ana Maria de Guzzi Plepis pela oportunidade, ensinamentos e auxílio na elaboração deste estudo.

À Dra. Virgínia da Conceição Amaro Martins pela cooperação, esclarecimentos e o desenvolvimento dos biomateriais deste trabalho.

Aos professores e colaboradores da Bioengenharia/USP por despertar e incentivar a pesquisa acadêmica.

Ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia.

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 e grandes amigos Renato de Moraes, Eduardo Gomes Machado e Fernando Bento Cunha por participar com o melhor espírito de grupo neste estudo.

Ao colega Ewerton Alexandre Galdeano pela grande colaboração técnica e os conhecimentos compartilhados neste trabalho.

À Damaris Aparecida Barbosa dos Santos Frigo pela dedicação e participação nos procedimentos e cuidados dos animais no biotério.

Aos meus amigos, familiares e colegas que participaram e compreenderam a minha ausência em algumas oportunidades.

RESUMO

MUNHOZ, M.A.S. **Capacidade osteorregenerativa da elastina, hidroxiapatita e proteína morfogenética óssea no tratamento de defeitos femorais em ratos.**

2018. 132f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

Nas doenças que provocam perdas ósseas, destaca-se a utilização de enxerto ósseo autólogo como tratamento padrão-ouro. Entretanto, devido a comorbidades e limitação quantitativa, apresentam-se como alternativa o uso de biomateriais de elastina e hidroxiapatita, bem como a associação com a proteína morfogenética óssea. O objetivo desta pesquisa foi avaliar de forma qualitativa e quantitativa a contribuição da membrana de elastina utilizada isoladamente ou em combinação com a hidroxiapatita e a proteína morfogenética óssea no reparo de defeitos ósseos provocados experimentalmente no fêmur de ratos. Foram utilizados 77 ratos (*Rattus norvegicus*, *Wistar*), machos, com peso aproximado de 330 gramas e 4 meses de idade. Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para criação do defeito ósseo na superfície anterior da região supracondiliana do fêmur direito e separados em 7 grupos com 11 animais cada. Os grupos foram divididos da seguinte forma: Grupo controle (G1-C), ratos com defeito crítico induzido no osso femoral, sem preenchimento com implante. Grupo 2 (G2-E24/50), ratos com defeito crítico induzido no osso femoral preenchido com membrana de elastina hidrolisada durante 24h a 50°C; Grupo 3 (G3-E24/50/HA), defeito preenchido com membrana de elastina hidrolisada durante 24h a 50°C e hidroxiapatita. Grupo 4 (G4 E24/50/BMP), defeito preenchido com membrana de elastina hidrolisada durante 24h a 50°C e BMP. Grupo 5 (G5-E96/37), defeito preenchido com membrana de elastina hidrolisada durante 96 h a 37°C. Grupo 6 (G6-E96/37/HA), defeito preenchido com membrana de elastina hidrolisada durante 96 h a 37°C e hidroxiapatita. Grupo 7 (G7-E96/37/BMP), defeito preenchido com membrana de elastina hidrolisada durante 96 h a 37°C e BMP. Após a morte indolor induzida após 6 semanas, as peças anatômicas femorais foram retiradas para análise macroscópica, radiográfica, histológica, morfométrica e biomecânica. As médias e desvios-padrão do volume percentual relativo de osso neoformado no defeito femoral foram respectivamente 36,39±3,86 (G1); 66,40±3,69 (G2); 55,12±2,23 (G3); 58,46±1,79 (G4); 51,36±3,15 (G5); 71,28±4,26 (G6); 45,54±3,98 (G7). Os achados demonstraram biocompatibilidade, biodegradabilidade e osteorregeneração maior que o grupo controle nos biomateriais estudados. Os grupos com maior volume ósseo neoformado foram G2-E24/50 e G6-E96/37/HA.

Palavras-chave: Elastina. Hidroxiapatita. Receptores de proteínas morfogenéticas ósseas. Materiais biocompatíveis. Osseointegração.

ABSTRACT

MUNHOZ, M.A.S. **Osseoregenerative capacity of elastin, hydroxyapatite and bone morphogenetic protein in the treatment of femoral defects in rats.** 2018.

132f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

In diseases that cause bone loss, the use of autologous bone graft is still a gold-standard treatment. However, due to comorbidities and quantitative limitation, the use of biomaterials of elastin, hydroxyapatite as well as the association with the bone morphogenetic protein are presented as alternatives. The objective of this research is to evaluate in a qualitative and quantitative way the contribution of the elastin membrane used alone or in combination with the hydroxyapatite and the bone morphogenetic protein in bone defects experimentally created in femur of rats. A total of 77 male rats (*Rattus norvegicus*, Wistar) weighing approximately 330 grams and 4 months of age were used. The animals were submitted to the surgical procedure to create the bone defect on the anterior surface of the supracondylar region of the right femur and were separated into 7 groups with 11 animals each. The groups were divided as follows: Control group (G1-C), rats with critical defect induced in the femoral bone without implant filling. Group 2 (G2-E24/50), defect filled with elastin membrane prepared for 24 h at 50°C. Group 3 (G3-E24/50/HA), defect filled with elastin membrane prepared for 24 h at 50°C and hydroxyapatite. Group 4 (G4-E24/50/BMP), defect filled with elastin membrane prepared for 24 h at 50°C and BMP. Group 5 (G5-E96/37), defect filled with elastin membrane prepared for 96 h at 37°C. Group 6 (G6-E96/37/HA), defect filled with elastin membrane prepared for 96 h at 37°C and hydroxyapatite. Group 7 (G7-E96/37/BMP) defect filled with elastin membrane prepared for 96 h at 37°C and BMP. After painless death induced after 6 weeks, the femoral anatomical pieces were removed for macroscopic, radiographic, histological, morphometric and biomechanical analysis. The mean and standard deviations of the relative percentage volume of newly formed bone in the femoral defect were respectively 36,39±3,86 (G1); 66,40±3,69 (G2); 55,12±2,23 (G3); 58,46±1,79 (G4); 51,36±3,15 (G5); 71,28±4,26 (G6); 45,54±3,98 (G7). The findings demonstrated biocompatibility, biodegradability and osseous regeneration greater than the control group in the studied biomaterials. The groups with the highest newly formed bone volume were G2-E24/50 and G6-E96/37/HA.

Keywords: Elastin. Bone morphogenetic receptors. Biocompatible materials. Osseointegration.

Lista de Figuras

FIGURA 1 – MOSTRA OS BIOMATERIAIS UTILIZADOS.	38
FIGURA 2 – MOSTRA OS DETALHES DA TÉCNICA CIRÚRGICA.	41
FIGURA 3 - MODELO EXPERIMENTAL UTILIZADO NO ESTUDO.	43
FIGURA 4 – MOSTRA OS NÍVEIS DE CORTE HISTOLÓGICO PARA ANÁLISES EM MICROSCOPIA DE LUZ.	46
FIGURA 5 - METODOLOGIA PARA CÁLCULO MORFOMÉTRICO DA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA.	47
FIGURA 6 - FOTOGRAFIA DAS PEÇAS ANATÔMICAS FEMORAIS.	51
FIGURA 7 - RADIOGRAFIAS DAS PEÇAS ANATÔMICAS FEMORAIS.	53
FIGURA 8 - FOTOMICROGRAFIA DA ÁREA CENTRAL DA LESÃO FEMORAL DE TODOS OS GRUPOS.	55
FIGURA 9 - FOTOMICROGRAFIA DA ÁREA CIRÚRGICA NO TRICRÔMICO DE MASSON DE G1-C.	57
FIGURA 10 - FOTOMICROGRAFIA DA ÁREA CIRÚRGICA NO PICROSSÍRIUS RED DE G1-C.	58
FIGURA 11 - FOTOMICROGRAFIA DA ÁREA CIRÚRGICA NA FLUORESCÊNCIA DE G1-C.	59
FIGURA 12 - FOTOMICROGRAFIA DA ÁREA CIRÚRGICA NO MÉTODO VON KOSSA DE G1-C.	60
FIGURA 13 - FOTOMICROGRAFIA DA ÁREA CIRÚRGICA NO TRICRÔMICO DE MASSON DE G2E24/50.	62
FIGURA 14 - FOTOMICROGRAFIA DA ÁREA CIRÚRGICA NO PICROSSÍRIUS RED DE G2-E24/50.	63
FIGURA 15 - FOTOMICROGRAFIA DA ÁREA CIRÚRGICA NA FLUORESCÊNCIA DE G2-E24/50.	64
FIGURA 16 - FOTOMICROGRAFIA DA ÁREA CIRÚRGICA NO MÉTODO VON KOSSA DE G2-E24/50.	65
FIGURA 17 - FOTOMICROGRAFIA DA ÁREA CIRÚRGICA NO TRICRÔMICO DE MASSON DE G3E24/50/HA.	67
FIGURA 18 - FOTOMICROGRAFIA DA ÁREA CIRÚRGICA NO PICROSSÍRIUS RED DE G3-E24/50/HA.	68
FIGURA 19 - FOTOMICROGRAFIA DA ÁREA CIRÚRGICA NA FLUORESCÊNCIA DE G3-E24/50/HA.	69
FIGURA 20 - FOTOMICROGRAFIA DA ÁREA CIRÚRGICA NO MÉTODO VON KOSSA DE G3E24/50/HA.	70
FIGURA 21 - FOTOMICROGRAFIA DA ÁREA CIRÚRGICA NO TRICRÔMICO DE MASSON DE G4E24/50/BMP.	72
FIGURA 22 - FOTOMICROGRAFIA DA ÁREA CIRÚRGICA NO PICROSSÍRIUS RED DE G4E24/50/BMP.	73
FIGURA 23 - FOTOMICROGRAFIA DA ÁREA CIRÚRGICA NA FLUORESCÊNCIA DE G4E24/50/BMP.	74
FIGURA 24 - FOTOMICROGRAFIA DA ÁREA CIRÚRGICA NO MÉTODO VON KOSSA DE G4E24/50/BMP.	75
FIGURA 25 - FOTOMICROGRAFIA DA ÁREA CIRÚRGICA NO TRICRÔMICO DE MASSON DE G5E96/37.	77
FIGURA 26 - FOTOMICROGRAFIA DA ÁREA CIRÚRGICA NO PICROSSÍRIUS RED DE G5-E96/37.	78
FIGURA 27 - FOTOMICROGRAFIA DA ÁREA CIRÚRGICA COM A FLUORESCÊNCIA DE G5-E96/37.	79
FIGURA 28 - FOTOMICROGRAFIA DA ÁREA CIRÚRGICA NO MÉTODO VON KOSSA DE G5-E96/37.	80
FIGURA 29 - FOTOMICROGRAFIA DA ÁREA CIRÚRGICA NO TRICRÔMICO DE MASSON DE G6E96/37/HA.	82
FIGURA 30 - FOTOMICROGRAFIA DA ÁREA CIRÚRGICA NO PICROSSÍRIUS RED DE G6-E96/37/HA.	83
FIGURA 31 - FOTOMICROGRAFIA DA ÁREA CIRÚRGICA NA FLUORESCÊNCIA DE G6E96/37/HA.	84
FIGURA 32 - FOTOMICROGRAFIA DA ÁREA CIRÚRGICA NO MÉTODO VON KOSSA DE G6E96/37/HA.	85
FIGURA 33 - FOTOMICROGRAFIA DA ÁREA CIRÚRGICA NO TRICRÔMICO DE MASSON DE G7E96/37/BMP.	87
FIGURA 34 - FOTOMICROGRAFIA DA ÁREA CIRÚRGICA NO PICROSSÍRIUS RED DE G7E96/37/BMP.	88
FIGURA 35 - FOTOMICROGRAFIA DA ÁREA CIRÚRGICA NA FLUORESCÊNCIA DE G7-E96/37/BMP.	89
FIGURA 36 - FOTOMICROGRAFIA DA ÁREA CIRÚRGICA NO MÉTODO VON KOSSA DE G7E96/37/BMP.	90
FIGURA 37 - GRÁFICO DA ANÁLISE MORFOMÉTRICA DE TODOS OS GRUPOS.	91
FIGURA 38 - CURVAS DSC PARA AS MATRIZES COM E SEM TRATAMENTO ALCALINO.	122
FIGURA 39 - MEV DA MATRIZ DE ELASTINA APÓS HIDRÓLISE ALCALINA POR 24 H À 50°C.	123
FIGURA 40 - MEV DA MATRIZ DE ELASTINA APÓS HIDRÓLISE ALCALINA POR 96 H À 37°C.	124
FIGURA 41 - REPRESENTAÇÃO DO DIÂMETRO DE MARTIN.	125

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Sequência de injeção de marcadores fluoro cromáticos.....	48
Tabela 2 - Tamanho de poros ($\mu\text{m} \pm \text{DP}$) das matrizes.....	125

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Alz	Alizarina
BMP	proteína óssea morfogenética
Ca	Calceína
CEUA	Comitê de Ética para Uso de Animais da
CTM	células tronco mesenquimais
β-TCP	β -trifosfato de cálcio
DNA	ácido desoxirribonucleico
Denatran	Departamento Nacional de Trânsito
E	Elastina
FMJ	Faculdade de Medicina de Jundiaí
GDF	fatores de diferenciação do crescimento
HA	hidroxiapatita
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
MEC	matriz extracelular
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
N	carga máxima
O	osso original
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
pH	potencial hidrogeniônico
PO	pós-operatório
PSR	Picrosirius Red
TC	tecido conectivo
TGF-β	fatores de crescimento beta
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
VEGF	fatores de crescimento de vascularização endotelial

Sumário

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 A consolidação de uma fratura	21
1.2 Fatores de crescimento na consolidação óssea	22
1.3 As proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs)	24
1.4 Aspectos moleculares da consolidação da fratura	25
1.4.1 As citocinas pró-inflamatórias	26
1.4.2 Fatores de diferenciação celular	26
1.4.3 Fatores angiogênicos	27
1.4.4 Função das plaquetas no processo de cicatrização	28
1.4.5 Fatores de risco à consolidação	28
1.5 Biomateriais	30
1.6 Polímeros	31
1.7 Elastina	32
1.8 Substitutos ósseos baseados em cerâmica	34
1.9 Hidroxiapatita	34
1.10 Biomateriais associados	35
2. OBJETIVOS	37
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1 Biomateriais	38
3.2 Animais e grupos experimentais	39
3.3 Planejamento experimental	39
3.4 Técnica cirúrgica para criação do defeito femoral	40
3.5 Sutura dos tecidos e medicação	41
3.6 Controle pós-operatório.....	41
3.7 Morte indolor induzida dos animais.....	42
3.8 Métodos de análises do reparo ósseo das áreas cirúrgicas.....	44
3.8.1 Etapa 1.....	44
3.8.2 Etapa 2.....	48
4. RESULTADOS.....	50
4.1 Achados macroscópicos da área cirúrgica femoral após 6 semanas.....	50
4.2 Achados radiográficos da área cirúrgica após 6 semanas	52
4.3 Achados histológicos da área cirúrgica femoral	54
4.3.1 Achados histológicos comuns a todos os grupos.....	54
4.3.2 Achados histológicos de G1-C	56
4.3.3 Achados histológicos de G2-E24/50	61
4.3.4 Achados histológicos de G3-E24/50/HA.....	66
4.3.5 Achados histológicos de G4-E24/50/BMP	71
4.3.6 Achados histológicos de G5-E96/37	76
4.3.7 Achados histológicos de G6-E96/37/HA.....	81
4.3.8 Achados histológicos de G7-E96/37/BMP	86
4.4 Achados Morfométricos.....	91
4.5 Achados da análise estatística	91
5. DISCUSSÃO	93
5.1 Sobre a biocompatibilidade	93
5.2 Sobre a biodegradabilidade	95
5.3 Sobre a osteorregeneração	97
5.3.1 Capacidade osteogênica dos biomateriais no local receptor	97
5.3.2 Porosidade e tamanho dos poros	98
5.3.3 Influência da composição e da superfície do biomaterial	100
5.3.4 Biomateriais associados como estimuladores da osteogênese	101
6. CONCLUSÕES	104
REFERÊNCIAS	106
ANEXO A - Preparação dos biomateriais.	120
ANEXO B - Carta de Aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Jundiaí	126
ANEXO C - Análise estatística comparativas intergrupos dos resultados morfométricos	127

1. INTRODUÇÃO

O principal elemento do sistema esquelético é o osso devido sua capacidade de auxiliar na locomoção, servir de local para as inserções musculares, proteger órgãos internos e participar na homeostasia do cálcio. No entanto, este sistema não está imune aos diversos fatores externos e internos que podem provocar uma falha na sua integridade (BOHNING; DAVENPORT; JEANSONNE, 1999; COMPTON; LEE, 2014; LAVRADOR, 2009; ORYAN; MONAZZAH; BIGHAM-SADEGH, 2015; RAHMAN et al., 2015).

O mecanismo agressor mais frequente do tecido ósseo são os traumatismos. Inicialmente foram mais comumente originados por eventos naturais e guerras e atualmente por traumas em acidentes motorizados com incidência cada vez mais elevada, caracterizando uma verdadeira epidemia em escala global (COSTA et al., 2017; DE SOUZA LEO et al., 2014; LAVRADOR, 2009).

Em contrapartida, o aprimoramento das técnicas cirúrgicas e anestésicas, a evolução das osteossínteses e os cuidados perioperatórios tem melhorado significativamente o tratamento das fraturas, as perdas de tecido ósseo originados por traumas de alta complexidade, as deformidades congênitas e as ressecções tumorais que muitas vezes comprometem a regeneração tecidual (GHIASI et al., 2017; HOSAKA et al., 2017; KIRKER-HEAD et al., 2007; MARSELL; EINHORN, 2010).

1.1 A consolidação de uma fratura

A consolidação óssea depende de um conjunto de ações originadas em quatro principais tipos de tecidos adjacentes ao foco de fratura, notadamente o osso cortical, o perióstio, a medula óssea e as partes moles adjacentes (BOHNING; DAVENPORT; JEANSONNE, 1999; BUZA III; EINHORN, 2016; DIMITRIOU; TSIRIDIS; GIANNOUDIS, 2005; EINHORN, 2005; MARSELL; EINHORN, 2010).

As fraturas se consolidam através de dois tipos de mecanismos:

- Ocorrem com a formação de calo primário ou direta quando se utiliza uma fixação rígida, envolvendo uma resposta biológica com a remodelação de unidades ósseas através de osteoclastos e osteoblastos. Este processo se desenvolve no sentido de unir os fragmentos principalmente através de um modelo de calcificação de uma matriz cartilaginosa. Se caracteriza primordialmente por neoformação cortical e pouca participação do periósteo e tecidos moles externos (DIMITRIOU; TSIRIDIS; GIANNOUDIS, 2005; EINHORN, 2005; GHIASI et al., 2017; ORYAN; MONAZZAH; BIGHAM-SADEGH, 2015).
- A consolidação secundária ou indireta envolve uma combinação de formação óssea intramembranosa e endocondral, em que tanto o periósteo como os tecidos moles externos são fundamentais (EINHORN, 2005; GHIASI et al., 2017; ORYAN; MONAZZAH; BIGHAM-SADEGH, 2015). É tipicamente observada no método de tratamento da estabilização relativa das fraturas, como na fixação por tutor intramedular, fixação externa e imobilizações gessadas ou órteses (ABDEL-AAL, 2006; GHIASI et al., 2017). Nestes casos em que a fixação interna rígida não é utilizada, ocorrem micro movimentos no local da fratura e formação de calo externo evidente (BOHNING; DAVENPORT; JEANSONNE, 1999; DIMITRIOU; TSIRIDIS; GIANNOUDIS, 2005; EINHORN, 2005; GHIASI et al., 2017; ORYAN; MONAZZAH; BIGHAM-SADEGH, 2015).

1.2 Fatores de crescimento na consolidação óssea

No processo de regeneração do tecido ósseo há recrutamento das células tronco mesenquimais (CTM) específicas, com sua proliferação e diferenciação em células osteogênicas. A origem precisa destas células não está totalmente compreendida. Embora a maioria dos estudos indiquem que elas são derivadas de tecidos moles e da medula óssea circunjacentes, pesquisas revelam que um recrutamento sistêmico de CTM circulantes para o local de ferida podem ser de grande importância para uma resposta cicatricial adequada (BISHOP et al., 2012; BUZA III; EINHORN, 2016; EINHORN, 2005; OFTADEH et al., 2015).

Os fatores de crescimento são proteínas que servem como agentes responsáveis desta de sinalização e recrutamento de células. No tecido ósseo as mais atuantes são as proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) (BOHNING; DAVENPORT; JEANSONNE, 1999; BUZA III; EINHORN, 2016; EINHORN; GERSTENFELD, 2015; SIMPSON; MILLS; NOBLE, 2006).

As BMPs agem como parte de uma rede de comunicação celular que influenciam as funções críticas como a divisão celular, a síntese da matriz, e a diferenciação tecidual. Os resultados de estudos experimentais demonstraram que os fatores de crescimento desempenham um papel importante na formação dos ossos e da cartilagem, na consolidação de fraturas e na reparação de outros tecidos musculoesqueléticos. Com o advento da produção destas proteínas em maior escala nas formas recombinantes, tem havido um interesse considerável na utilização de fatores de crescimento como agentes terapêuticos no tratamento das lesões ósseas (EINHORN; GERSTENFELD, 2015; LI et al., 2015; LIEBERMAN; DALUISKI; EINHORN, 2002; MIGLIORINI et al., 2016; NAUTH et al., 2015).

As proteínas secretadas como fatores de crescimento por células agem sobre determinadas células alvo ou em células que executem uma ação específica. São conhecidos três prováveis mecanismos:

- autócrino, em que o fator de crescimento influencia a célula de sua origem ou de outras células com fenótipo idêntico ao da própria célula, como por exemplo, um fator de crescimento produzido por um osteoblasto influencia a atividade de outro osteoblasto.
- parácrino, na qual um fator de crescimento influencia uma célula adjacente ou vizinha que é diferente do fenótipo da sua célula de origem, por exemplo, um fator de crescimento produzido por osteoblasto estimula a diferenciação de uma célula indiferenciada.
- do sistema endócrino, em que o fator de crescimento influencia uma célula que é diferente do fenótipo da sua célula de origem e que está localizada num local anatômico remoto, como um fator de crescimento produzido por tecido neural do sistema nervoso central pode estimular a atividade de osteoblastos. Assim, um fator de crescimento pode ter efeito em vários tipos de células, induzindo ações em diversos tipos de tecidos (LIEBERMAN; DALUISKI; EINHORN, 2002).

1.3 As proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs)

As BMPs são moléculas bioativas disponíveis naturalmente. Desde o seu isolamento por Urist em 1965 são produzidas e comercializadas com utilização de tecnologia genética sendo objeto de grande interesse científico (BLOKHUIS; CALORI; SCHMIDMAIER, 2013; GIANNOUDIS; DINOPOULOS, 2010; RAHMAN et al., 2015; SARBAN et al., 2009; URIST, 1965). As BMPs compreendem uma grande família de proteínas, que desempenham um papel importante na osteogênese, atuando na diferenciação de fatores de crescimento, em células progenitoras, na proliferação de células mesenquimais, na diferenciação de células osteogênicas ou condrogênicas, na angiogênese e na remodelação óssea (GROVER; CAMERON; BEST, 2012; JANICKI; SCHMIDMAIER, 2011; MIGLIORINI et al., 2016; MITHIEUX; WEISS, 2005; PAPANAGIOTOU et al., 2015).

A BMP atua atraindo células osteoprogenitoras e promove a proliferação tanto das células mesenquimais, quanto da linhagem osteoblástica através da estimulação da progressão do pré-osteoblasto em osteoblasto. O resultado clínico desta cascata molecular osteogênica é a formação óssea. Apresentam ainda capacidade de estimular a angiogênese, sendo esta uma etapa crucial no processo de consolidação (GROVER; CAMERON; BEST, 2012; HAIDER et al., 2015; RAHMAN et al., 2015).

Existem numerosas moléculas que participam dos eventos da consolidação óssea. Salienta-se que o grupo das BMPs é a principal de ação local pertencente a superfamília de fatores de crescimento transformadores (EINHORN, 2005; EINHORN; GERSTENFELD, 2015; GIANNOUDIS; DINOPOULOS, 2010).

As BMPs compreendem pelo menos vinte fatores de crescimento divididas em subclasses baseadas em sua estrutura. As que atuam no processo osteorregenerativo são as BMPs-2, 4, 6, 7 e 9. (BLOKHUIS; LINDNER, 2008; GIANNOUDIS; DINOPOULOS, 2010; GROVER; CAMERON; BEST, 2012; MITHIEUX; WEISS, 2005).

Existem descrições de formação de tecido ósseo por indução de BMP até mesmo em regiões ectópicas e em diversos defeitos críticos induzidos em modelos experimentais (GIANNOUDIS; DINOPOULOS, 2010; MIGLIORINI et al., 2016). As proteínas recombinantes humanas 2 e 7 (rh-BMP-2 e rh-BMP-7) estão disponíveis comercialmente e são utilizadas clinicamente em procedimentos cirúrgicos de falhas ósseas, não-união de fraturas, artrodese de coluna e osteoporose (ALT et al., 2007; HAIDER et al., 2015; LI et al., 2015; MITHIEUX; WEISS, 2005; RAHMAN et al., 2015).

A administração da BMP no local a ser estimulado para formação de tecido ósseo idealmente necessita de um carreador, geralmente associada ao colágeno, hidroxiapatita e o β -trifosfato de cálcio. No entanto, a efetividade de ação a ser obtida depende da dosagem adequada da BMP (GROVER; CAMERON; BEST, 2012; MITHIEUX; WEISS, 2005; SCHLIEPHAKE, 2010; SHEIKH et al., 2015).

A efetividade de ação da BMP também está relacionada as capacidades do carreador utilizado em apresentar biocompatibilidade, biodegradabilidade, porosidade, propriedades da superfície que permitam a aderência celular, propriedades mecânicas e osteocondutividade (GARRISON et al., 2010; LI et al., 2015; PAPANAGIOTOU et al., 2015; SCHLIEPHAKE, 2010; SHEIKH et al., 2015).

A velocidade de biodegradação do carreador é um fator vital, uma vez que no caso de ser muito rápida ou muito lenta em relação a formação óssea no local, pode interferir negativamente na atividade da BMP (GIANNOUDIS; DINOPOULOS, 2010; GROVER; CAMERON; BEST, 2012; ISSA et al., 2008; RAHMAN et al., 2015).

1.4 Aspectos moleculares da consolidação da fratura

As moléculas de sinalização podem ser categorizadas em citocinas pró-inflamatórias da superfamília dos fatores de crescimento beta (TGF- β) e nos fatores de crescimento angiogênicos (BUZA III; EINHORN, 2016; DIMITRIOU; TSIRIDIS; GIANNOUDIS, 2005; KWONG; HARRIS, 2008; SIMPSON; MILLS; NOBLE, 2006).

1.4.1 As citocinas pró-inflamatórias

A Interleucina-1 (IL-1) e Interleucina-6 (IL-6), bem como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), desempenham um papel essencial no início da cascata. Elas são secretadas por macrófagos e células inflamatórias, bem como por células de origem mesenquimal presentes no periósteo. Elas realizam funções centrais na indução de respostas próximas a lesão por ter um efeito quimiotático sobre outras células inflamatórias, aumentando a síntese de matriz extracelular, estimulando a angiogênese e recrutando células fibrinogênicas endógenas ao local da lesão (BUZA III; EINHORN, 2016; DIMITRIOU; TSIRIDIS; GIANNOUDIS, 2005; EINHORN; GERSTENFELD, 2015; GIANNOUDIS et al., 2015).

As citocinas também regulam a ossificação endocondral, bem como a remodelação óssea. O TNF- α promove o recrutamento de células tronco mesenquimais, induz a apoptose de condrócitos hipertróficos durante a ossificação endocondral e estimula a atividade dos osteoclastos. Ausência de TNF- α resulta em retardo de reabsorção da cartilagem mineralizada, inibindo formação de osso novo. A IL-1, IL-6 e TNF- α também apresentam níveis de expressão aumentados durante a formação do calo ósseo e na fase tardia de consolidação e remodelação (DIMITRIOU; TSIRIDIS; GIANNOUDIS, 2005; EINHORN; GERSTENFELD, 2015; GIANNOUDIS et al., 2015; KWONG; HARRIS, 2008; MARSELL; EINHORN, 2011).

1.4.2 Fatores de diferenciação celular

Os fatores de crescimento beta (TGF- β) pertencem a grande família de fatores de crescimento e de diferenciação incluindo as proteínas morfogenéticas do osso, fator de crescimento transformador beta, fatores de diferenciação do crescimento (GDF), activinas e inibinas. Pelo menos trinta e quatro membros desta linhagem foram identificados no genoma humano (DIMITRIOU; TSIRIDIS; GIANNOUDIS, 2005; GROSS, 2012; KURIEN; PEARSON; SCAMMELL, 2013; LIEBERMAN; DALUISKI; EINHORN, 2002; YENI et al., 2009).

Eles se originam de precursores de alto peso molecular e são ativados por enzimas proteolíticas. Agem em receptores de membrana dos tipos quinase, serina e treonina. Os membros específicos desta superfamília incluem as proteínas morfogenéticas do osso de 1 a 8, fatores de crescimento, GDF-1, 5, 8, 10, TGF- β 1, β 2, e β 3. Promovem as várias fases de ossificação intramembranosa e endocondral durante a consolidação da fratura (GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005; JANICKI; SCHMIDMAIER, 2011; ORYAN; MONAZZAH; BIGHAM-SADEGH, 2015).

Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) é um polipeptídeo liberado por plaquetas durante as fases iniciais de consolidação da fratura, sendo ainda um estimulador quimiotático potente para células inflamatórias. Além disso, exerce um grande estímulo na proliferação e migração de células mesenquimais e osteoblastos (DIMITRIOU; TSIRIDIS; GIANNOUDIS, 2005; ORYAN; MONAZZAH; BIGHAM-SADEGH, 2015; BUZA III; EINHORN, 2016).

1.4.3 Fatores angiogênicos

A regeneração óssea requer fluxo de sangue adequado. Durante as fases finais da ossificação endocondral, bem como durante a fase de remodelação, metaloproteinases específicas degradam a cartilagem e o osso, permitindo a invasão de vasos sanguíneos. Acredita-se que dois caminhos regulem a angiogênese: um fator de crescimento vascular endotelial dependente e uma via dependente da angiopoietina (BUZA III; EINHORN, 2016; MARSELL; EINHORN, 2011; ORYAN; MONAZZAH; BIGHAM-SADEGH, 2015).

Especula-se que ambas as vias são funcionais durante a reparação de fraturas. Fatores de crescimento de vascularização endotelial (VEGFs) são mediadores fundamentais de nova angiogênese e de células endoteliais específicas de mitose (DIMITRIOU; TSIRIDIS; GIANNOUDIS, 2005; MARSELL; EINHORN, 2011; ORYAN; MONAZZAH; BIGHAM-SADEGH, 2015).

1.4.4 Função das plaquetas no processo de cicatrização

As plaquetas participam em várias etapas do processo de reparação tecidual em resposta a eventos traumáticos. Participam da cascata de coagulação imediatamente após o início de um sangramento e na liberação de proteínas bioativas e fatores de crescimento (EINHORN; GERSTENFELD, 2015; GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005; GIANNOUDIS; EINHORN; MARSH, 2007; GROSS, 2012; MEHTA; WATSON, 2008; SHETH et al., 2012).

A participação plaquetária na regeneração óssea pode ser dividida em três fases. Na fase 1, as plaquetas são ativadas quando encontram tecido lesado e aderem ao colágeno exposto, formando um agregado. Ocorre a degradação das plaquetas com liberação de fatores de crescimento bioativos e hemostáticos resultando na inflamação. A liberação de 70 a 90% destes fatores ocorre nos primeiros 10 minutos do trauma. Fatores adicionais são ainda secretados por 7 a 9 dias. Na fase 2, a proliferação começa após 2 dias da lesão e dura até 3 semanas. Ocorre a formação de vasos, deposição de colágeno através dos fibroblastos e contração da área lesada. Na fase 3, ocorre a remodelação com maturação do colágeno e formação de tecido cicatricial, com duração de mais de um ano (BIGHAM-SADEGH; ORYAN, 2015; DE LONG et al., 2011; EINHORN; GERSTENFELD, 2015; HANKENSON; ZIMMERMAN; MARCUCIO, 2014).

1.4.5 Fatores de risco à consolidação

Todo esse processo biológico complexo da reparação do tecido ósseo está sujeito a falhar, ocasionando retardo, consolidações viciosas ou mesmo a não união dos segmentos ósseos. Em muitas situações clínicas a identificação da causa de falha da consolidação não é clara (BOHNING; DAVENPORT; JEANSONNE, 1999; EINHORN, 2005; MARSELL; EINHORN, 2010).

Entretanto, é possível apontar alguns fatores de risco relacionados, como o diabetes mellitus, a doença inflamatória crônica, distúrbios circulatórios, o abuso de álcool e fumo, o uso crônico de corticosteroides, anti-inflamatórios e certas drogas anticoagulantes (CUNHA et al., 2011; LANZETTI et al., 2017; MARSELL; EINHORN, 2010; RICHARDS; GRAF; MASHRU, 2017).

Devem ser destacadas ainda, as situações clínicas complexas como as fraturas expostas, as fraturas cominutivas, os danos locais ao suprimento vascular e os tratamentos cirúrgicos inadequados, que podem evoluir com não-união dos fragmentos devido a fixações ósseas insuficientes (FLIERL et al., 2013; HAIDER et al., 2015; MARSELL; EINHORN, 2010; MAUFFREY; BARLOW; SMITH, 2015).

Outro fator de risco a ser enfatizado é o chamado defeito ósseo segmentar, caracterizado por ausência de preenchimento da área óssea lesada com a consequente necessidade de algum tipo de procedimento intervencionista. A identificação precisa desta complicação clínica pode ser difícil, uma vez que este diagnóstico muitas vezes é subjetivo. No entanto, existe uma tentativa de padronização dos defeitos críticos, utilizando como critério uma perda circunferencial de 50% ou de 2cm² de área. O tratamento desta situação desafiadora depende da experiência, do treinamento do cirurgião e da disponibilidade de métodos de estabilização e preenchimento da falha com enxertos autógenos ou biomateriais (MAUFFREY; BARLOW; SMITH, 2015; MIJIRITSKY et al., 2017; QUINNAN, 2017; TOSOUNIDIS; GIANNOUDIS, 2017).

A investigação científica dos processos de consolidação óssea em seres humanos e modelos experimentais em animais tem proporcionado um importante avanço no conhecimento desta área, bem como o aprimoramento das diversas técnicas de tratamento dos defeitos ósseos (BOHNING; DAVENPORT; JEANSONNE, 1999; HAFFNER-LUNTZER et al., 2017; ZURA et al., 2017).

Os primeiros relatos da utilização de um enxerto autólogo remetem ao início dos anos de 1800 quando após uma cirurgia de trefinação craniana o defeito foi preenchido com a recolocação do osso retirado no início do procedimento. Este reparo evoluiu com bom resultado, indicando o surgimento de novas perspectivas de tratamento (GROVER; CAMERON; BEST, 2012; RATNAYAKE; MUCALO; DIAS, 2017).

Houve avanços evidentes na medicina regenerativa devido ao desenvolvimento de novas tecnologias que continuam em constante aprimoramento. No entanto, o enxerto ósseo autólogo ainda permanece como a opção de tratamento padrão-ouro nos defeitos ósseos e a fonte mais comumente utilizada é a crista do osso ilíaco (BLOKHUIS; ARTS, 2011; DIMITRIOU et al., 2011; MAUFFREY et al., 2011; MILLER; CHIODO, 2016; RATNER et al., 2013).

A popularidade do enxerto autólogo ósseo está fundamentada na ausência da rejeição imunológica e risco de transmissão de doenças, além de possuir as propriedades mais desejadas de um enxerto, uma vez que são capazes de induzir e formar osso, além de proporcionar arcabouço para regeneração tecidual, sendo considerados portanto, osteogênicos, osteoindutores e osteocondutores (BLOKHUIS; ARTS, 2011; BUZA III; EINHORN, 2016; COMPTON; LEE, 2014; SCHROEDER; MOSHEIFF, 2011).

Os aspectos negativos estão relacionados a dor pós-operatória no local de retirada do enxerto e ao limite de disponibilidade em determinados casos que necessitem de grandes quantidades. Desta maneira, uma abordagem terapêutica alternativa ao enxerto autólogo que desperta notável interesse no tratamento cirúrgico das falhas de tecido ósseo, consiste na utilização dos biomateriais sintéticos ou naturais (BLOKHUIS; CALORI; SCHMIDMAIER, 2013; BUZA III; EINHORN, 2016; CALORI et al., 2014; DIMITRIOU et al., 2011; MARSELL; EINHORN, 2010;).

1.5 Biomateriais

Os biomateriais utilizados nas terapias de regeneração óssea devem idealmente ter capacidade osteogênica, osteocondutora, propriedades mecânicas de resistência óssea e atuar com fatores de crescimento. Não devem somente manter, induzir e restaurar as funções biológicas originais, mas também apresentar uma degradação concomitante a neoformação e não serem imunogênicos (ABDEL-AAL, 2006; AFFONSO, 1998; BILLSTRÖM et al., 2013; JANICKI; SCHMIDMAIER, 2011; LI et al., 2017).

Características fundamentais de um enxerto ideal podem também ser caracterizadas de acordo com sua de forma, função, fixação e formação adequadas. Em relação a forma, o biomaterial deve preencher completamente as falhas ósseas. A função refere-se às propriedades de absorção de carga do enxerto. A fixação adequada na interface do enxerto ao local receptor evita a movimentação excessiva e o consequente efeito adverso da não-união tecidual. A formação é a exigência de que os biomateriais promovam a neoformação óssea, fornecendo ambientes adequados, promovendo permeabilidade de perfusão suficiente e a entrega local de fatores de osteoindução (BILLSTROM et al., 2013; CALORI et al., 2011; HOLLISTER; MURPHY, 2011).

O objetivo final da utilização destes biomateriais sintéticos ou naturais é a reparação do tecido ósseo com a união definitiva entre o biomaterial implantado e o tecido ósseo adjacente, sem a presença de tecido conectivo entre eles, caracterizando a osteointegração (KONIG JR., 2010; KURIEN; PEARSON; SCAMMELL, 2013; LEGEROS; CRAIG, 1993). A partir deste conceito, destacaram-se a partir da década de 60 as membranas poliméricas naturais no tratamento regenerativo dos defeitos ósseos. Os polímeros são moléculas de cadeia longa que consistem em número repetido de unidades, os monômeros. Existem evidências na literatura que esses polímeros participam positivamente no processo de osteointegração (CUNHA, 2006; HIRATA et al., 2015; RIBEIRO et al., 2015; TANASE et al., 2013; VELASCO; NARVAEZ-TOVAR; GARZON-ALVARADO, 2015).

1.6 Polímeros

Os polímeros naturais possuem estruturas altamente organizadas que podem guiar as células a crescer em vários estágios de desenvolvimento. Eles geralmente ocasionam uma baixa resposta imune devido possuírem grupos estruturais semelhantes aos componentes extracelulares naturais (JAHAN; TABRIZIAN, 2016; KHAN et al., 2008; TANASE et al., 2013).

Entre os polímeros naturais, o colágeno permite que sua capacidade regenerativa seja melhorada por alguns processos, entre eles a hidrólise alcalina, que altera suas propriedades pizoeletricas promovendo um estímulo a osteogênese (CUNHA et al., 2008; GOISSIS et al., 1999; HORN; MARTINS; DE GUZZI PLEPIS, 2009; LACERDA; PLEPIS; GOISSIS, 1998).

A modificação essencial da hidrólise alcalina consiste na remoção de grupos carboxamida de resíduos de asparagina e glutamina com a consequente formação de grupos carboxílicos. Essas modificações não alteram a estrutura da hélice tripla do colágeno e sim o padrão auto montado de suas microfibrilas e suas propriedades dielétricas. O ponto isoelétrico do colágeno é reduzido em comparação com colágeno nativo, carregando negativamente este biomaterial. Além disso, as matrizes aniônicas de colágeno usualmente não induzem uma resposta inflamatória indesejada, representando uma biocompatibilidade adequada (CUNHA et al., 2008; HORN; MARTINS; DE GUZZI PLEPIS, 2009).

Outra alternativa destacada tem sido o emprego de biomateriais de origem nos peptídeos e proteínas advindos da matriz extracelular (MEC), destacando-se a elastina, especialmente devido sua versatilidade molecular e ação na regeneração tecidual (DAAMEN et al., 2007; TEJEDA-MONTES et al., 2014; WISE; MITHIEUX; WEISS, 2009).

A importância da MEC como componente ativo na cicatrização tecidual é reconhecida. É notória a capacidade da elastina em influenciar a vitalidade e proliferação celular, além de modificar propriedades celulares em ferimentos. São utilizadas na atualidade como curativos bioativos, na engenharia de tecidos e no tratamento tópico de lesões de pele com índices crescentes de bons resultados (DAAMEN et al., 2007; ORYAN et al., 2014; TRACY; MINASIAN; CATERSON, 2016).

1.7 Elastina

A elastina é uma proteína polimérica que fornece elasticidade aos diversos tecidos e órgãos dos seres vivos, notadamente nos vasos sanguíneos, ligamentos, fígado e pele (DAAMEN et al., 2007; MITHIEUX; WEISS, 2005; WISE; MITHIEUX; WEISS, 2009; YEO et al., 2015).

Apresenta fibras orientadas em forma de favo, favorecendo a permeabilidade celular, sendo compostas por micro fibrilas, que agem como uma armação, onde a elastina amorfa é depositada através de ligações cruzadas, formando um arcabouço tridimensional (GROVER; CAMERON; BEST, 2012; MITHIEUX; WEISS, 2005).

Algumas propriedades desta proteína estrutural são especialmente notáveis, como a sua elasticidade e a sua capacidade fisiológica de conversão entre a elastina e sua precursora, a tromboelastina, a denominada automontagem (CUNHA, 2006; DAAMEN et al., 2007; YEO et al., 2015). Além disso, trata-se de uma proteína altamente estável (ALMINE et al., 2010; DAAMEN et al., 2007; YEO et al., 2015).

O uso da elastina como biomaterial ganha forte estímulo devido suas características de estabilidade estrutural, elasticidade, bioatividade e automontagem e ainda mais se for considerada a sua presença em numerosos tecidos nativos, sendo possível que atue como um arcabouço natural após uma lesão traumática (GROVER; CAMERON; BEST, 2012; YEO et al., 2015).

A elastina pode ser utilizada como enxerto biológico sob várias formas, incluindo as fibras de elastina insolúvel, elastina solúvel hidrolisada, tropoelastina recombinante, repetições de sequências de peptídeos sintéticos e de elastina e em combinação com outros polímeros (ALMINE et al., 2010; DAAMEN et al., 2007; GLASSMAN et al., 2016).

Polímeros à base de elastina podem ser sintéticos, recombinantes ou naturais. Os polipeptídeos sintéticos do tipo elastina (*Elastin-like Polypeptides*), apresentam uma sequência molecular modificada para alcançar propriedades específicas, como a melhora na afinidade por íons de cálcio ou aumento da resistência à biodegradação devido suas propriedades concomitantes de superfície hidrofóbica e hidrofílica (AMRUTHWAR; JANORKAR, 2013; URRY; PATTANAIK, 1997).

Um segundo método, emprega o ácido desoxirribonucleico (*DNA*) de tropoelastina humana recombinante em sistemas de bactérias *Escherichia Coli*, produzindo tropoelastina humana de alta pureza. No entanto, existe uma limitação nas quantidades produzidas (AMRUTHWAR; JANORKAR, 2013; MARTIN; VRHOVSKI; WEISS, 1995).

O terceiro método utilizado consiste na obtenção advinda da captação de tecidos em cadáveres. A dificuldade observada clinicamente foi a insolubilidade da tropoelastina em sua forma nativa (AMRUTHWAR; JANORKAR, 2013; MITHIEUX; WEISS, 2005).

Assim, alternativamente existe o método de captação de elastina em animais (xenoenxertos), devido a semelhança físico-química e preservação das principais sequências moleculares da tropoelastina quando transplantados em humanos (CHUNG et al., 2006; GARDIN et al., 2015; MUIZNIEKS et al., 2015).

Dentre as aplicações dos biomateriais do colágeno e elastina associados, estão o tratamento de falhas ósseas e o uso em válvulas e implantes cardíacos (CUNHA, 2006; GROVER; CAMERON; BEST, 2012; ROCHA et al., 2008).

No entanto, Daamen et al., 2007 relataram alguns problemas relacionados ao uso da elastina, incluindo descrições de calcificação em implantes protéticos cardíacos e vasculares de causas desconhecidas. A característica da propensão à calcificação já observada clinicamente pode se apresentar paradoxalmente como benéfica nas situações clínicas onde é necessária a reparação óssea (SILVA; MANO; REIS, 2010). A utilização da elastina também tem sido descrita em associação com biomateriais baseados em cerâmicas, a fim de aumentar suas propriedades estruturais (NYAN et al., 2010; TAMPIERI et al., 2012; YEO et al., 2015).

1.8 Substitutos ósseos baseados em cerâmica

Muitos dos biomateriais em uso atualmente contém cerâmica, incluindo sulfato de cálcio, vidro bioativo, fosfato de cálcio, a hidroxiapatita e o β -trifosfato de cálcio (β -TCP). A racionalidade da utilização destes materiais reside no fato de que o componente inorgânico primário do osso é a hidroxiapatita (HA). Dependendo da estrutura e porosidade dos biomateriais deste tipo, os mesmos podem mimetizar a matriz óssea natural (GROVER; CAMERON; BEST, 2012; JANICKI; SCHMIDMAIER, 2011; LAURECIN; JIANG, 2014).

Um dos elementos essenciais da regeneração óssea é a osteocondutividade, que se caracteriza em proporcionar um arcabouço que permite a diferenciação e proliferação celular em sua estrutura. Além desta propriedade, é necessária adequada biodegradabilidade com objetivo de auxiliar na remodelação do tecido ósseo neoformado. Salienta-se que a HA se enquadra tipicamente como um biomaterial osteocondutor, que proporciona arcabouço para osteorregeneração (GROVER; CAMERON; BEST, 2012; JANICKI; SCHMIDMAIER, 2011).

1.9 Hidroxiapatita

A hidroxiapatita é uma das formas mais estáveis de fosfato de cálcio, está presente naturalmente no osso como um dos seus principais componentes e tem sido utilizada como biomaterial de substituição óssea há mais de quatro décadas. A sua excelente biocompatibilidade está relacionada a composição química muito próxima à fase mineral do osso. Este aspecto estrutural fornece à hidroxiapatita características fundamentais no processo de auxiliar o reparo ósseo (COMPTON; LEE, 2014; HAK, 2007; SOPYAN et al., 2007).

Na engenharia de tecido ósseo, a HA é usada como material de preenchimento nos defeitos ósseos e como carreador de fatores de crescimento osteoindutivos e, além disso, reveste superfícies metálicas utilizadas em osteossínteses e em cirurgias de revisão de artroplastias (ORYAN et al., 2014; SOPYAN et al., 2007).

A hidroxiapatita pode ser obtida de forma natural dos corais, por desproteinização de tecidos ósseos de animais e ainda com produção sintética (HAK, 2007; SCARANO et al., 2007; SOPYAN et al., 2007). Apresenta uma vantagem na sua aplicabilidade, uma vez que pode ser utilizada sob diversas formas, sendo disponível em grânulos, cimentos, blocos e cunhas, sendo variável na densidade e porosidade (LEBRE et al., 2017; MONTGOMERY, 1991; SOPYAN et al., 2007).

Desperta grande interesse o aspecto da preparação desta biocerâmica, com atenção especial a morfologia e tamanho dos poros, uma vez que estes aspectos são fundamentais para que ocorra crescimento regenerativo e a osteointegração. (HANNINK; ARTS, 2011; MAUFFREY et al., 2011; SOPYAN et al., 2007). Além disso, a velocidade de biodegradação das cerâmicas deve favorecer o rápido crescimento ósseo, bem como as propriedades de cristalinidade e porosidade (LAURECIN; JIANG, 2014; SOPYAN et al., 2007).

Alguns aspectos negativos da HA estão relacionados a falta de capacidade mecânica de absorção de cargas e quanto ao custo elevado. É possível destacar que não apresenta capacidade osteoindutiva ou osteogênica por si própria, sendo sua principal característica servir como arcabouço para crescimento de tecido vascular e ósseo (SOPYAN et al., 2007; VITAL et al., 2006; ZIMMERMANN; MOGHADDAM, 2011).

Uma alternativa que visa minimizar estas limitações é a utilização de materiais associados, como a hidroxiapatita e determinados polímeros, permitindo a obtenção de um material biodegradável, com boas propriedades mecânicas, osteoindutivas e osteocondutoras, combinando as propriedades de cada família de materiais (CHANG; KO; DOUGLAS, 2003; VELASCO; NARVAEZ-TOVAR; GARZON-ALVARADO, 2015).

1.10 Biomateriais associados

Na literatura ainda é um desafio identificar qual é a melhor opção quando são utilizados biomateriais na área da medicina regenerativa. Esforços têm sido empreendidos no sentido de aperfeiçoar e alcançar melhores resultados (BUCHAIM et al., 2015; CUNHA et al., 2017; MACHADO et al., 2015; PRAKASAM et al., 2017).

No sentido de aumentar as propriedades mecânicas e físico-químicas, podem ser utilizados em associação diferentes tipos de biomateriais (AFFONSO, 1998; AMARAL, 2013; HIRATA et al., 2015; MUNHOZ, 2013; SILVA; MANO; REIS, 2010; VELASCO; NARVAEZ-TOVAR; GARZON-ALVARADO, 2015).

Dentre os biomateriais que apresentam capacidade regenerativa, destacam-se as matrizes poliméricas derivadas de elastina, a hidroxiapatita e a BMP pelas suas propriedades físico-químicas e arranjo estrutural. Notadamente fornecem arcabouço adequado para adesão, proliferação e crescimento de um novo tecido reparador. Entretanto, na literatura há vasta informação quanto ao uso isolado da BMP e hidroxiapatita, mas pouco sobre a elastina e a associação entre eles atuando na área da regeneração óssea (DAAMEN et al., 2007; HORN; MARTINS; PLEPIS, 2009; PRAKASAM et al., 2017; ROCHA et al., 2008; SOPYAN et al., 2007; WALSH et al., 2017; WANG; YEUNG, 2017).

2. OBJETIVOS

GERAL

- Analisar qualitativa e quantitativamente biomateriais derivados de membrana de elastina e sua associação com hidroxiapatita e proteína morfogenética humana no processo de neoformação óssea ocorrido durante o reparo de defeitos provocados experimentalmente no fêmur de ratos.

ESPECÍFICOS

- Avaliar a biocompatibilidade da membrana de elastina isolada e associada a hidroxiapatita e ao BMP em implantes nos defeitos ósseos femorais de ratos.
- Caracterizar a biorreabsorção do biomaterial utilizado, simultaneamente a neoformação tecidual adjacente.
- Avaliar a característica morfológica do osso neoformado e da matriz extracelular na área cirúrgica;
- Avaliar a capacidade osteogênica da membrana de elastina isolada e associada a hidroxiapatita e a BMP em atuar como arcabouço para o reparo ósseo;
- Avaliar a osteointegração das membranas utilizadas;
- Quantificar o volume ósseo relativo neoformado na área cirúrgica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Biomateriais

A elastina utilizada neste estudo foi obtida da cartilagem auricular de bovinos adultos. Esta cartilagem foi tratada por hidrólise alcalina em uma solução sulfatos, cloretos e hidróxidos de metais alcalinos e alcalinos terrosos com duas maneiras diferentes de confecção quanto ao tempo e a temperatura da preparação. Um processo realizado durante 24 horas de hidrólise e temperatura a 50°C e outro com 96 horas a temperatura de 37°C por adaptação da metodologia utilizada para obtenção de colágeno aniônico (HORN; MARTINS; DE GUZZI PLEPIS, 2009). Estes procedimentos assim como a síntese da hidroxiapatita foram realizados pelo grupo de pesquisa da professora Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis e Dra. Virginia da Conceição Amaro Martins, conforme descrito em ANEXO A.

A BMP utilizada foi a *recombinant human BMP-2 (R&D system inc., Minneapolis, MN, USA)*, (figura 1). A dose administrada localmente foi de 5µl aplicada sobre a membrana que foi utilizada para preenchimento da falha óssea provocada (ISSA et al., 2009, 2016; MACHADO, 2012).

Figura 1 – Mostra os biomateriais utilizados.

Membrana de elastina (a), hidroxiapatita (b) e a BMP (c).
Fonte: Próprio autor.

3.2 Animais e grupos experimentais

Foram utilizados 77 ratos machos (*Rattus norvegicus*, Wistar) com 4 meses de idade e peso médio de 320 gramas. Os animais foram fornecidos pelo Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (São Paulo-SP) e mantidos no biotério da Faculdade de Medicina de Jundiaí (FMJ). Todos os animais foram alojados em caixas com no máximo 3 animais em cada e receberam ração balanceada (Purina) e água *ad-libitum*. O ambiente foi mantido com temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e ciclo claro e escuro a cada 12 horas, sendo o início do período claro às 7 horas. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Jundiaí (CEUA/FMJ), protocolo 61/2015 (ANEXO B).

3.3 Planejamento experimental

Os animais foram divididos em 7 grupos com 11 animais com defeito crítico induzido no osso femoral direito e distribuídos da seguinte maneira:

Grupo 1 (G1-C): ratos com defeitos femorais sem implante (grupo controle);

Grupo 2 (G2-E24/50): defeitos preenchidos com membrana de elastina hidrolisadas durante 24h à 50°C ;

Grupo 3 (G3-E24/50/HA): defeitos preenchidos com membrana de elastina hidrolisadas durante 24h à 50°C e hidroxiapatita;

Grupo 4 (G4-E24/50/BMP): ratos com defeitos preenchidos com membrana de elastina hidrolisadas durante 24h à 50°C e BMP;

Grupo 5 (G5-E96/37): defeitos preenchidos com membrana de elastina hidrolisadas durante 96h a 37°C ;

Grupo 6 (G6-E96/37/HA): ratos com defeitos preenchidos com membrana de elastina hidrolisadas durante 96h a 37°C e hidroxiapatita;

Grupo 7 (G7-E96/37/BMP): ratos com defeitos preenchidos com membrana de elastina hidrolisadas durante 96h a 37°C e BMP.

3.4 Técnica cirúrgica para criação do defeito femoral

Os animais foram anestesiados com solução anestésica de Coopazine (Xylazina) como sedativo, analgésico e relaxante muscular e Dopalen (Ketamina) como anestésico geral, fornecido pela clínica Kamimura Comércio de produtos para animais LTDA, na proporção de 1:1 e na dose de 0,10 mg / 100 gramas de massa corpórea, via intramuscular na região glútea (CUNHA et al., 2008).

Em seguida foram colocados em decúbito ventral e realizada a tricotomia do membro inferior direito, seguida de assepsia com uma solução de Digliconato de Clorexidina a 2% com tensoativos e antisepsia com uma solução alcoólica de Digliconato de Clorexidina a 0,5%. Foi realizada incisão anterior mediana no joelho com acesso profundo para patelar medial e luxação lateral da patela e musculatura anterior da coxa, obtendo-se exposição direta da região metafisária anterior do fêmur distal. O perióstio foi incisado e afastado. Na região supracondiliana na sua superfície anterior foi realizado um defeito crítico de 3mm de diâmetro na metáfise anterior e distal do fêmur (BOSEMARK et al., 2013; HIRATA et al., 2015; KIDO et al., 2015; LI et al., 2015; MACHADO, 2012; MITHIEUX; WEISS, 2005; TIELINEN et al., 2001), utilizando uma broca cirúrgica do tipo trefina acoplada a um mini motor (BELTEC LB-100) com irrigação contínua a fim de evitar o aquecimento local. A falha óssea foi lavada com solução fisiológica e curetada o conteúdo medular e resto de material ósseo derivado do procedimento cirúrgico para que não restasse micro fragmentos que pudessem estimular a formação óssea. As membranas de elastina foram implantadas preenchendo completamente a falha provocada, exceto no grupo G1-C (figura 2). Em G3 e G6 a hidroxiapatita foi colocada sobre a membrana de elastina cobrindo completamente o defeito ósseo. Em G4 e G7 foi utilizada uma micropipeta para adicionar os 5µl BMP sobre a membrana de elastina locada na falha óssea, permitindo sua absorção completa antes do fechamento dos tecidos sobre a região femoral distal.

Figura 2 – Mostra os detalhes da técnica cirúrgica.

Acesso parapatelar medial (A). Luxação da patela e visualização da região distal do fêmur (B). Seta indicando o defeito ósseo realizado com trefina de 3mm (C). Seta apontando a membrana implantada (D).

Fonte: Próprio autor.

3.5 Sutura dos tecidos e medicação

Ao final dos procedimentos, foi realizada a sutura dos tecidos, sendo os músculos, periósteo e a pele reposicionados com fio de seda 5.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil). Em seguida, cada animal recebeu uma dose de 0,1 mg/100 g de peso do antibiótico Pentabiotic Veterinário Pequeno Porte (Fort Dodge®, Campinas, SP, Brasil). No local da ferida cutânea da região cirúrgica foi aplicado o antibiótico Rifamicina Spray. Foi fornecido o analgésico Paracetamol diluído na água do animal durante 2 semanas pós cirúrgico (LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2009).

3.6 Controle pós-operatório

Os animais operados ficaram isolados em gaiolas separadas, e receberam ração comum e água *ad libitum*. A limpeza das gaiolas foi realizada com troca da maravalha três ou até quatro vezes por semana e houve monitoração constante quanto a dor e comportamento do animal (LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2009).

3.7 Morte indolor induzida dos animais

Os animais tiveram a morte indolor induzida com 6 semanas de pós-operatório através de 0,3mg/100gr de anestésico via intraperitoneal (Xilazina e Ketamina) seguido de pneumotórax através da secção do músculo diafragma. Após constatada a morte dos animais, as áreas cirúrgicas do fêmur foram removidas e submetidas às análises macroscópicas, radiológicas, histomorfométricas e biomecânicas do reparo ósseo conforme as etapas padronizadas nessa pesquisa (figura 3).

Figura 3 - Modelo experimental utilizado no estudo.

Fonte: Próprio autor.

3.8 Métodos de análises do reparo ósseo das áreas cirúrgicas

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

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

Etapa 2: mineralização da matriz óssea e marcadores fluoro cromáticos da neoformação óssea através do microscópio de fluorescência. Nesta etapa, utilizaram-se 4 animais de cada grupo.

3.8.1 Etapa 1

- **Análise Macroscópica da área cirúrgica**

Para esta análise, realizou-se a desarticulação na região do quadril e do joelho, preservando o fêmur direito. As partes moles foram retiradas a fim de permitir visualização adequada do local operado na região distal do fêmur proporcionando a devida inspeção macroscópica e documentação fotográfica. Foram avaliadas as condições anatomopatológicas da área cirúrgica.

- **Análise Radiográfica**

As amostras foram radiografadas com aparelho Odel 300 miliamperes, foco com 100 miliamperes, tempo de 0,06 segundos e radiação de 40 kV. As imagens radiográficas foram digitalizadas pelo sistema Agfa e visualizadas com objetivo de avaliar a integridade da falha óssea e áreas adjacentes, bem como o reparo ósseo (CUNHA et al., 2011; VITAL et al., 2006).

- **Análise histológica por luz óptica e polarizada**

As amostras da área receptora do enxerto foram imersas no fixador de medula óssea (Allkimia®) por 10 dias e em seguida no descalcificador (Allkimia®). Após o período de descalcificação, que variou de 10 a 20 dias, a ação do ácido foi neutralizada por 24 horas em uma solução de sulfato de sódio a 5%. Em seguida, as amostras foram desidratadas em série crescente de álcoois: 70% (*overnight*), 80%, 85%, 90%, 95% e 100%. Feito isso, essas amostras foram colocadas em partes iguais de álcool e xilol (*overnight*) e diafanizados em xilol, com trocas a cada 2 horas, sendo executadas 3 trocas; e em seguida, incluídos em parafina. De cada amostra foram realizados cortes semi-seriados de 5µm de espessura e corados com os seguintes corantes:

- **Hematoxilina e Eosina**: para marcação do tecido ósseo original, osso neoformado e diferenciação das células ósseas;
- **Tricrômico de Masson**: para diferenciação do osso maturo original corado em vermelho e do osso neoformado jovem que se cora em azul. Esta técnica tradicional para tecido conjuntivo cora também fibras colágenas em azul, destacando-as dos outros elementos do tecido;
- **Método histoquímico de Picrosirius Red**: solução aquosa saturada de ácido pícrico adicionada de 0,1 g de vermelho da Síria F3b, Sírius red F3B-Bayer. Utilizada para avaliação dos constituintes fibrilares da matriz extracelular na área da lesão óssea com o uso da Luz Polarizada do Microscópico (BOHNING; DAVENPORT; JEANSONNE, 1999; BOSCH; MELSEN; VARGERVIK, 1998; ISSA et al., 2009; JUNQUEIRA et al., 1979).

- **Análise qualitativa e quantitativa do volume ósseo neoformado na área cirúrgica**

Para esta análise foram utilizados três cortes histológicos coletados em três regiões diferentes ao longo da área enxertada, (Figura 4).

Figura 4 – Mostra os níveis de corte histológico para análises em microscopia de luz.

Área cirúrgica (seta preta) e níveis dos cortes histológicos (linhas amarelas).
Fonte: Próprio autor.

A análise qualitativa dos cortes histológicos da área cirúrgica permite avaliar o processo do reparo da falha óssea através da observação das características do osso neoformado. Foi utilizado microscópio MOTIC BA310E e as imagens digitais foram analisadas com objetivas de 4, 10, 20 e 40 vezes de aumento. As imagens digitais capturadas com objetivas de 4 vezes de aumento, foram utilizadas posteriormente para a análise morfométrica do volume ósseo neoformado através do *software* Motic Images Plus 2.0ML.

- **Análise morfométrica em microscópio de luz**

A quantificação da neoformação óssea na área cirúrgica foi realizada através da identificação das bordas da lesão óssea, bem como sua espessura cortical. Em seguida foram demarcadas as seguintes áreas de quantificação: Área total da lesão; Área total de neoformação óssea; Lacunas com ausência de neoformação óssea.

Após a quantificação das áreas, obteve-se o percentual relativo de osso neoformado de cada nível de corte histológico, através de cálculo descrito na figura 5:

Figura 5 - Metodologia para cálculo morfométrico da neoformação óssea.

Área total da lesão óssea femoral e osso original (A). Marcação da área da falha óssea (B). Marcação em verde das áreas de neoformação óssea (C). Marcação em amarelo das áreas com ausência de neoformação óssea (D). Através de cálculo aritmético simples, obteve-se o percentual de osso neoformado de cada corte histológico (E). Fotomicrografia em objetivas de 4x.

Fonte: Próprio autor.

Os dados relativos ao percentual do volume da neoformação óssea da área cirúrgica de cada rato, foram transcritos para o software BioEstat 5.3, aplicando-se os testes ANOVA seguido de Tukey para avaliação estatística e obtenção das médias e desvios-padrão entre os grupos de estudo (CUNHA et al., 2017).

3.8.2 Etapa 2

- **Técnica da fluorescência óssea**: conforme proposto por König Jr. (2010) foram aplicados corantes em 3 períodos distintos do pós-operatório a fim de observar os estágios da regeneração óssea. **Primeiro período** do 0 ao 12º dia pós-cirúrgico com tecido neoformado corado por Alizarina; **segundo período** compreendido do 12º ao 24º dia de PO com tecido neoformado marcado por Calceína; **terceiro período** entre o 24º ao 36º dia de PO com tecido neoformado corado por Tetraciclina (KONIG JR., 2010). A metodologia de aplicação e concentração dos corantes fluoro cromáticos, está exemplificada abaixo (tabela 1):

Tabela 1 - Sequência de injeção de marcadores fluoro cromáticos.

Semanas	Marcador	Solução injetada (kg)
0	alizarina	30 mg + 1 mL soro + 20 mg de Na ₂ HPO ₄
1	alizarina	30 mg + 1 mL soro + 20 mg de Na ₂ HPO ₄
2	calceína	10 mg + 1 mL soro + 20 mg de Na ₂ HPO ₄
3	calceína	10 mg + 1 mL soro + 20 mg de Na ₂ HPO ₄
4	tetraciclina	60 mg + 1 mL soro + 20 mg de Na ₂ HPO ₄
5	tetraciclina	60 mg + 1 mL soro + 20 mg de Na ₂ HPO ₄
6	Morte induzida	

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

As soluções fluoro cromáticas de Alizarina e Calceína foram administradas via subcutânea no dorso dos animais, enquanto a solução fluoro cromática de Tetraciclina foi aplicada via intramuscular.

O padrão de cores visualizado ao microscópio segue os seguintes padrões:

- **Alizarina** apresenta-se na cor vermelha e utiliza-se um comprimento de onda de 543 nm para o feixe de luz do microscópio.
- **Calceína** na cor verde, sendo identificada com o comprimento de onda de 488nm.
- **Tetraciclina** em amarelo e tons castanhos. Utiliza o mesmo comprimento de onda da Alizarina.

• **Técnica de Von Kossa:** Permite a identificação de focos de mineralização em tecidos, através da marcação dos íons de cálcio por nitrato de prata. As amostras da área cirúrgica foram fixadas em formol 10% e incluídas em blocos de resina acrílica composta por glicolmetacrilato. Os blocos contendo as amostras foram cortados transversalmente com espessura de 300 µm em micrótomo e posteriormente, foram reduzidas em lixadeira automática até serem obtidos cortes seriados com 30 µm de espessura. Os cortes foram aderidos em lâminas histológicas para técnica histoquímica (KONIG JR., 2010). As amostras foram hidratadas em água corrente durante 5 minutos e lavadas 3 vezes em água destilada. Em seguida, foi depositada uma solução de nitrato de prata sobre as lâminas histológicas, composta por 5 g de nitrato de prata em 100 mL de água destilada. As lâminas foram expostas à luz ultravioleta durante 1 hora e lavadas em água destilada. Após este processo, foram mergulhadas em solução de tiosulfato de sódio 5 g diluído em 100 mL de água destilada e imediatamente, lavadas em água destilada. Este processo confere as colorações róseas e negras, referentes ao citoplasma e íons de cálcio respectivamente. Os núcleos celulares foram contra corados por imersão de 5 minutos em solução composta por 0,1 g de Safranina, 1,0 mL Ácido acético glacial e 99 mL de água destilada, atribuindo coloração avermelhada. Finalmente, as amostras em lâminas histológicas foram desidratadas, diafanizadas e montadas para posterior análise por microscopia de luz ótica transmitida (MORETTI et al., 2017).

4. RESULTADOS

4.1 Achados macroscópicos da área cirúrgica femoral após 6 semanas

Nas áreas cirúrgicas de todos os animais dos grupos estudados, ocorreu cicatrização adequada da pele sem sinais clínicos de complicações como edema, hiperemia ou secreção de aspecto infeccioso. Após a remoção dos tecidos moles circunjacentes ao defeito ósseo, observou-se na camada mais profunda que não ocorreram distúrbios na área óssea como microfissuras adjacentes, coloração anormal do tecido ósseo que pudesse indicar necrose ou osteíte, periostite, neoformação tumoral óssea, proliferação neoplásica de tecido fibroso desmoide e a formação de coágulos sanguíneos na área cirúrgica. Foi possível ainda observar a integridade das margens da lesão óssea. Na totalidade das amostras não foi possível a identificação nítida dos resquícios dos biomateriais devido a proliferação superficial de tecidos conjuntivos e hematopoiético. A integridade longitudinal do fêmur foi mantida, não evidenciando presença de fraturas ou deformidades associadas a casos de não-união ou consolidação viciosa na metáfise distal e região supracondiliana femoral (figura 6).

Figura 6 - Fotografia das peças anatômicas femorais.

As setas indicam o local da falha óssea na região supracondiliana do fêmur distal, sem indicação de processos infecciosos.

Fonte: Próprio autor.

4.2 Achados radiográficos da área cirúrgica após 6 semanas

Nas peças radiografadas dos fêmures dos ratos notou-se a permanência da lesão óssea produzida experimentalmente, com bordas regulares e o centro com imagem radiolúcida. Não foram observadas complicações radiográficas como rarefação óssea de áreas adjacentes, presença de migração de fragmentos, sinais indicativos de necrose óssea, reações periosteais sugestivas de processo infeccioso ou tumoral e não união. Nos animais dos grupos enxertados com os biomateriais, notou-se imagens radiopacas no interior da falha óssea indicando resquícios dos biomateriais utilizados e/ou tecido ósseo neoformado. O fêmur manteve seu formato característico de osso longo, com bordas corticais longitudinais medial e lateral em imagem radiopaca e entre essas, uma imagem mais radiolúcida pela presença do canal medular de conteúdo hematopoiético. O contorno do defeito na região da metáfise proximal ficou evidente e radiopaco. Os ângulos metafisários, na região próxima ao local do defeito ósseo permaneceram com aspecto usual (figura 7).

Figura 7 - Radiografias das peças anatômicas femorais.

As setas indicam o local da falha óssea no fêmur distal sem alterações morfológicas.
Fonte: Próprio autor.

4.3 Achados histológicos da área cirúrgica femoral

4.3.1 Achados histológicos comuns a todos os grupos

Os achados histológicos evidenciaram uma formação de tecido ósseo subperiosteal projetado do osso original em direção ao defeito provocado experimentalmente atingindo a extremidade oposta, configurando uma ponte óssea. No entanto, houve variação entre os grupos na proporcionalidade de osso neoformado de aspecto maduro ou imaturo. O osso neoformado apresentou trabéculas com migração central para o canal medular de geometria irregular. Na técnica de Masson, foram observadas áreas ósseas imaturas em azul com lacunas de osteócitos mais desorganizadas, bem como áreas lamelares coradas em vermelho contendo lacunas orientadas, indicando um processo de remodelação com osso maduro. Na matriz extracelular da área do defeito ósseo, não foi notada a presença de formações fibróticas ou infiltrado inflamatório, especialmente nos grupos que receberam os biomateriais. Nas lâminas que foram coradas pela técnica de *Picrosirius Red* (PSR) a densidade óptica da área da falha óssea apresentou predomínio de cores no gradiente do vermelho ao amarelo, indicando a expressão do colágeno pela birrefringência local (figura 8).

Figura 8 - Fotomicrografia da área central da lesão femoral de todos os grupos.

Notou-se tecido conectivo (TC), neoformação óssea (*), o osso original (O), a hidroxiapatita (HA) e resquícios da membrana (M) nos grupos de animais enxertados.

Fonte: Próprio autor.

4.3.2 Achados histológicos de G1-C

Ficou evidente a neoformação óssea nas áreas próximas ao osso original e na região central do defeito provocado. Na margem superior da área cirúrgica, a formação óssea ocorreu de forma mais contínua e compacta enquanto que na área mais profunda da falha foi em forma de trabéculas e com espaçamentos entre elas. O canal medular ficou preservado (figura 9). O osso neoformado apresentou-se com birrefringência de suas fibras colágenas em tons alaranjados e avermelhados (figura 10). Foi observado no teste da fluorescência que a osteogênese ocorreu de forma contínua em todas as fases com ênfase no segundo período da regeneração, devido a presença marcante da calceína (figura 11). Na técnica de Von Kossa foi observada a formação de trabéculas ósseas com múltiplas lacunas na cor preta indicando a mineralização óssea (figura 12).

Figura 9 - Fotomicrografia da área cirúrgica no Tricrômico de Masson de G1-C.

A. neoformação óssea de aspecto maduro (seta) e a borda do osso original (O). B. osso de aspecto maduro (seta). C. osso de aspecto imaturo em azul (seta). D. lacuna com osteócito (seta). Aumentos de 4 (A), 10 (B), 20 (C) e 40 vezes (D).

Fonte: Próprio autor.

Figura 10 - Fotomicrografia da área cirúrgica no Picrossírius Red de G1-C.

Neoformação óssea (seta) e a borda do osso original (O) sem luz polarizada em (A) e (C). Birrefringência das fibras colágenas em tons vermelho e alaranjado (seta) e a borda do osso original (O) com luz polarizada em (B) e (D). Aumentos de 4 (A e B) e 10 vezes (C e D).
Fonte: Próprio autor.

Figura 11 - Fotomicrografia da área cirúrgica na fluorescência de G1-C.

Observou-se a neoformação óssea corada em vermelho pela Alizarina (Alz), em verde pela Calceína (Ca) e o osso original (O). Aumento de 50 vezes.
Fonte: Próprio autor.

Figura 12 - Fotomicrografia da área cirúrgica no método Von Kossa de G1-C.

Notou-se a presença de osso neoformado (setas vermelhas) e a presença do osso original nas bordas lesão (O). Aumentos de 40 e 100 vezes.
Fonte: Próprio autor.

4.3.3 Achados histológicos de G2-E24/50

Foi observada a formação de ponte óssea desorganizada unindo as bordas do osso original com tecido ósseo neoformado de aspecto compacto, mas com trabéculas organizadas e bem próximas entre si. Ficou evidente também a presença de osso imaturo na cor azul e maduro na cor vermelha e destacou-se a presença de osteócitos na área de neoformação óssea. Os resquícios da membrana foram raramente observados (figura 13). A área cirúrgica apresentou-se com birrefringência de fibras colágenas em tons avermelhados e de maneira desorientada (figura 14). Foi observado no teste da fluorescência que a osteogênese ocorreu de forma contínua principalmente a partir os períodos iniciais da regeneração tecidual devido à presença marcante da alizarina e calceína (figura 15). Na técnica de Von Kossa, foi observada a formação óssea superficial invaginando profundamente ao interior da membrana na cor preta de forma uniforme e contínua ao longo da área implantada, devido ao processo de mineralização (figura 16).

Figura 13 - Fotomicrografia da área cirúrgica no Tricrômico de Masson de G2E24/50.

A. neoformação óssea de aspecto maduro (seta) e a borda do osso original (O) e resquícios da membrana (E24/50). B. osso de aspecto imaturo (seta) e resquícios da membrana (E24/50). C. lacuna com osteócito (seta). D. osso de aspecto imaturo em azul (seta). Aumentos de 4 (A), 10 (B), 20 (C) e 40 vezes (D).

Fonte: Próprio autor.

Figura 14 - Fotomicrografia da área cirúrgica no Picrossírius Red de G2-E24/50.

Neoformação óssea (seta preta), a borda do osso original (O) e resquícios da membrana E24/50 (seta amarela) sem luz polarizada em (A) e (C). Neoformação óssea (seta branca), a borda do osso original (O) e resquícios da membrana (E24/50) com luz polarizada em (B) e (D). Aumentos de 4 (A e B) e 10 vezes (C e D).
 Fonte: Próprio autor.

Figura 15 - Fotomicrografia da área cirúrgica na fluorescência de G2-E24/50.

Observou-se a neoformação óssea corada em vermelho pela Alizarina (Alz), em verde pela Calceína (Ca) e o osso original (O). Aumento de 50 vezes.

Fonte: Próprio autor.

Figura 16 - Fotomicrografia da área cirúrgica no método Von Kossa de G2-E24/50.

Notou-se a presença de osso neoformado (setas vermelhas) nas bordas lesão (O) e sobre o biomaterial de elastina (E24/50). Aumentos de 40 e 100 vezes.
Fonte: Próprio autor.

4.3.4 Achados histológicos de G3-E24/50/HA

Notou-se a formação de ponte óssea trabeculada entre as bordas do defeito com a alternância proporcional de tecido ósseo neoformado de aspecto imaturo e maduro, além de frequentes osteócitos em lacunas ósseas. Os resquícios da membrana foram notados frequentemente na região central da falha óssea profundamente ao tecido ósseo neoformado. No interior do osso neoformado notou-se espaços correspondentes a presença dos grânulos de hidroxiapatita circundados e em contato direto com o osso formado (figura 17). O osso neoformado apresentou-se com birrefringência de suas fibras colágenas em tons avermelhados e contornando os grânulos de hidroxiapatita, além de resquícios da matriz na região central do defeito (figura 18). Foi observado no teste da fluorescência que a osteogênese ocorreu de forma contínua a partir do osso original e com predominância do segundo período de regeneração, devido a presença mais evidente da calceína (figura 19). Na técnica de Von Kossa foi observada a mineralização com osso neoformado de forma marcante na região profunda da membrana implantada e nas proximidades da borda do osso original (figura 20).

Figura 17 - Fotomicrografia da área cirúrgica no Tricrômico de Masson de G3E24/50/HA.

A. Neoformação óssea de aspecto maduro e imaturo (seta) e a borda do osso original (O). B. osso de aspecto imaturo (seta) e resquícios da membrana (E24/50/HA). C. lacuna com osteócito (seta) e resquícios da membrana com a hidroxiapatita (E24/50/HA). D. lacuna com osteócito (seta). Aumentos de 4 (A), 10 (B), 20 (C) e 40 vezes (D).
 Fonte: Próprio autor.

Figura 18 - Fotomicrografia da área cirúrgica no Picrossírius Red de G3-E24/50/HA.

Neoformação óssea (seta preta), a borda do osso original (O), tecido conectivo (TC) e resquícios da membrana e hidroxiapatita E24/50/HA (seta amarela) sem luz polarizada em (A) e (C). Neoformação óssea (seta branca), a borda do osso original (O) e resquícios da membrana e hidroxiapatita E24/50/HA com luz polarizada em (B) e (D). Aumentos de 4 (A e B) e 10 vezes (C e D).

Fonte: Próprio autor.

Figura 19 - Fotomicrografia da área cirúrgica na fluorescência de G3-E24/50/HA.

Observou-se a neoformação óssea corada em vermelho pela Alizarina (Alz), em verde pela Calceína (Ca) e o osso original (O). Aumento de 50 vezes.
 Fonte: Próprio autor.

Figura 20 - Fotomicrografia da área cirúrgica no método Von Kossa de G3E24/50/HA.

O osso neoformado (setas vermelhas), originou-se a partir da cortical interna do osso original (O) e percorreu a região inferior do biomaterial (E24/50/HA). Aumentos de 40 e 100 vezes.
Fonte: Próprio autor.

4.3.5 Achados histológicos de G4-E24/50/BMP

Ficou evidenciada a presença de uma ponte óssea unindo as bordas do osso original ao longo do defeito ósseo. Notou-se a presença de tecido ósseo neoformado de aspecto imaturo e maduro de forma proporcional. O osso neoformado recobriu superficialmente a membrana em posição subperiosteal e algumas projeções de trabéculas contornaram e penetraram no resquício do biomaterial (figura 21). Nas bordas o osso neoformado tinha espessura mais acentuada quando comparado ao osso formado no centro da lesão óssea. O osso neoformado apresentou-se com birrefringência de suas fibras colágenas em tom avermelhado (figura 22). Foi observado no teste da fluorescência que a osteogênese ocorreu de forma contínua predominantemente nos períodos iniciais, uma vez que ficou evidente a presença da alizarina e da calceína (figura 23). Na técnica de Von Kossa foi observada a mineralização óssea da matriz na cor preta, principalmente nas áreas próximas as bordas do osso original e profundamente ao implante (figura 24).

Figura 21 - Fotomicrografia da área cirúrgica no Tricrômico de Masson de G4E24/50/BMP.

A. Neoformação óssea de aspecto maduro e imaturo (seta) e a borda do osso original (O) e resquícios da membrana (E24/50/BMP). B. osso de aspecto imaturo e maduro (seta) e resquícios da membrana (E24/50/BMP). C. lacuna com osteócito (seta) e a borda do osso original. D. lacuna com osteócito (seta). Aumentos de 4 (A), 10 (B), 20 (C) e 40 vezes (D).
Fonte: Próprio autor.

Figura 22 - Fotomicrografia da área cirúrgica no Picrossírius Red de G4E24/50/BMP.

Neoformação óssea (seta preta), a borda do osso original (O), tecido conectivo (TC) e resquícios da membrana E24/50/BMP (seta amarela) sem luz polarizada em (A) e (C). Neoformação óssea (seta branca), a borda do osso original (O) e resquícios da membrana E24/50/BMP com luz polarizada em (B) e (D). Aumentos de 4 (A e B) e 10 vezes (C e D).
Fonte: Próprio autor.

Figura 23 - Fotomicrografia da área cirúrgica na fluorescência de G4E24/50/BMP.

Observou-se a neoformação óssea corada em vermelho pela Alizarina (Alz), em verde pela Calceína (Ca) e o original (O). Aumento de 50 vezes.
Fonte: Próprio autor.

Figura 24 - Fotomicrografia da área cirúrgica no método Von Kossa de G4E24/50/BMP.

O osso neoformado (setas vermelhas), originou-se a partir das bordas do osso original (O) e percorreu a região inferior do biomaterial (E24/50/BMP). Aumentos de 40 e 100 vezes.
Fonte: Próprio autor.

4.3.6 Achados histológicos de G5-E96/37

Notou-se a presença de uma ponte óssea na região central e descontinuidade na proximidade das bordas da lesão. Houve algumas trabéculas mais alongadas e dispostas no sentido horizontal e profundo. Ficou evidente o tecido ósseo neoformado de aspecto imaturo predominantemente e maduro em menor proporção na região central e profunda. Foram observados resquícios da membrana de elastina na área profunda da falha óssea. Foi notada a presença de tecido conectivo na região superficial do defeito (figura 25). O osso neoformado apresentou-se com birrefringência de suas fibras colágenas em tons avermelhados e alaranjados, além de tecido conectivo superficialmente e resquícios da membrana na região central (figura 26). Foi observado no teste da fluorescência que a osteogênese ocorreu de forma contínua a partir da borda do osso original devido a presença da alizarina no período inicial da neoformação óssea e na região central no segundo período, devido a evidência de predomínio da calceína (figura 27). Na técnica de Von Kossa foi observada a formação de trabéculas ósseas mineralizadas com múltiplas lacunas com maior frequência nas áreas próximas ao osso original e profundamente aos implantes (figura 28).

Figura 25 - Fotomicrografia da área cirúrgica no Tricrômico de Masson de G5E96/37.

A. Neoformação óssea de aspecto imaturo (seta), a borda do osso original (O) e resquícios da membrana (E96/37). B. osso de aspecto imaturo e maduro (seta), resquícios da membrana (E96/37) e tecido conectivo (TC). C. lacuna com osteócito (seta). D. detalhe da neoformação óssea com osteócito em lacuna (seta). Aumentos de 4 (A), 10 (B), 20 (C) e 40 vezes (D).
Fonte: Próprio autor.

Figura 26 - Fotomicrografia da área cirúrgica no Picrossírius Red de G5-E96/37.

Neoformação óssea (seta preta), a borda do osso original (O), tecido conectivo (TC) e a área com resquícios da membrana (E96/37) sem luz polarizada em (A) e (C). Neoformação óssea (seta branca), a borda do osso original (O) e a área com resquícios da membrana (E96/37) com luz polarizada em (B) e (D). Aumentos de 4 (A e B) e 10 vezes (C e D).
Fonte: Próprio autor.

Figura 27 - Fotomicrografia da área cirúrgica com a fluorescência de G5-E96/37.

Observou-se a neoformação óssea corada em vermelho pela Alizarina (Alz), em verde pela Calceína (Ca) e o osso original (O). Aumento de 50 vezes.
 Fonte: Próprio autor.

Figura 28 - Fotomicrografia da área cirúrgica no método Von Kossa de G5-E96/37.

O osso neoformado (setas vermelhas), originou-se a partir das bordas do osso original (O) e migrou ao longo de toda a interface entre a área receptora e o biomaterial (E96/37). Aumentos de 40 e 100 vezes.

Fonte: Próprio autor.

4.3.7 Achados histológicos de G6-E96/37/HA

Observou-se a formação óssea unindo as bordas do osso original em continuidade com a região central da falha. Predominou tecido ósseo neoformado de aspecto maduro predominantemente e imaturo em menor proporção e de espessura semelhante a cortical óssea preservada, mas com lacunas no interior pela presença da disposição das trabéculas horizontais. No interior do osso neoformado notou-se a presença dos grânulos de hidroxiapatita circundados e em contato direto com o osso formado. Os resquícios da membrana foram observados na região central do defeito ósseo preenchido e tecido conectivo superficialmente (figura 29). O osso neoformado apresentou-se com birrefringência de suas fibras colágenas em tons avermelhados e alaranjados e foi observada presença de tecido conectivo superficialmente (figura 30). Foi observado no teste da fluorescência que a osteogênese ocorreu de forma contínua principalmente nos períodos iniciais da regeneração, devido a presença marcante da alizarina e calceína nas áreas próximas ao osso original e no centro do defeito (figura 31). Na técnica de Von Kossa foi observada a formação de trabéculas ósseas com múltiplas lacunas na cor preta, indicando a mineralização óssea da matriz distribuídas uniformemente próximas das bordas do osso original e na região central do defeito (figura 32).

Figura 29 - Fotomicrografia da área cirúrgica no Tricrômico de Masson de G6E96/37/HA.

A. Neoformação óssea de aspecto maduro (seta), a borda do osso original (O) e resquícios da membrana (E96/37/HA). B. osso de aspecto maduro (seta) e tecido conectivo (TC). C. lacuna com osteócito (seta) D. detalhe da neoformação óssea com osteócito em lacuna (seta preta) e a hidroxiapatita (HA) indicada na seta amarela. Aumentos de 4 (A), 10 (B), 20 (C) e 40 vezes (D).

Fonte: Próprio autor.

Figura 30 - Fotomicrografia da área cirúrgica no Picrossírius Red de G6-E96/37/HA.

Neoformação óssea (seta preta), a borda do osso original (O), tecido conectivo (TC) e a área com resquícios da membrana e hidroxiapatita E96/37/HA (seta amarela) sem luz polarizada em (A) e (C). Neoformação óssea (seta branca), a borda do osso original (O) e a área com resquícios da membrana e hidroxiapatita (E96/37/HA) com luz polarizada em (B) e (D). Aumentos de 4 (A e B) e 10 vezes (C e D).
 Fonte: Próprio autor.

Figura 31 - Fotomicrografia da área cirúrgica na fluorescência de G6E96/37/HA.

Observou-se a neoformação óssea corada em vermelho pela Alizarina (Alz), em verde pela Calceína (Ca) e o original (O). Aumento de 50 vezes.
Fonte: Próprio autor.

Figura 32 - Fotomicrografia da área cirúrgica no método Von Kossa de G6E96/37/HA.

Observou-se o osso neoformado (setas vermelhas), as bordas do osso original (O) e o biomaterial entremeado com trabéculas ósseas (E96/37/HA). Aumentos de 40 e 100 vezes.
Fonte: Próprio autor.

4.3.8 Achados histológicos do G7-E96/37/BMP

Foi possível observar tecido ósseo neoformado de aspecto maduro e imaturo unindo as bordas do defeito através de uma ponte óssea fina e subperiostal. Na parte mais profunda, houve a presença de trabéculas ósseas jovens bem dispersas na área cirúrgica circundadas pelos resquícios da membrana enxertada (figura 33). O osso neoformado apresentou-se com birrefringência de suas fibras colágenas em tons avermelhados e alaranjados, com resquícios da matriz na região central (figura 34). Notou-se sob o teste da fluorescência que a osteogênese ocorreu de forma contínua em todas as fases da regeneração principalmente nas quatro primeiras semanas da neoformação, salientadas pela presença marcante da alizarina e calceína (figura 35). Na técnica de Von Kossa foi observada a formação de trabéculas ósseas com múltiplas lacunas indicando a mineralização óssea da matriz, sobretudo nas bordas próximas ao osso original e a região central da falha óssea (figura 36).

Figura 33 - Fotomicrografia da área cirúrgica no Tricrômico de Masson de G7E96/37/BMP.

A. Neoformação óssea de aspecto maduro (seta), a borda do osso original (O) e resquícios da membrana (E96/37/BMP). B. osso de aspecto maduro (seta) e a borda do osso original (O). C. neoformação óssea de aspecto imaturo (seta) e a borda do osso original (O) D. detalhe da neoformação óssea com osteócito em lacuna (seta). Aumentos de 4 (A), 10 (B), 20 (C) e 40 vezes (D).

Fonte: Próprio autor.

Figura 34 - Fotomicrografia da área cirúrgica no Picrossírius Red de G7E96/37/BMP.

Neoformação óssea (seta preta), a borda do osso original (O), tecido conectivo (TC) e os resquícios da membrana (E96/37/BMP) sem luz polarizada em (A) e (C). Neoformação óssea (seta branca), a borda do osso original (O) e a área com resquícios da membrana (E96/37/BMP) com luz polarizada em (B) e (D). Aumentos de 4 (A e B) e 10 vezes (C e D).
 Fonte: Próprio autor.

Figura 35 - Fotomicrografia da área cirúrgica na fluorescência de G7-E96/37/BMP.

Observou-se a neoformação óssea corada em vermelho pela Alizarina (Alz), em verde pela Calceína (Ca) e o osso original (O). Aumento de 50 vezes.
Fonte: Próprio autor.

Figura 36 - Fotomicrografia da área cirúrgica no método Von Kossa de G7E96/37/BMP.

O osso neoformado (setas vermelhas), originou-se a partir das bordas do osso original (O). Observou-se resposta osteogênica abundante e a permeabilidade do biomaterial (E96/37/BMP). Aumentos de 40 e 100 vezes.
Fonte: Próprio autor.

4.4 Achados Morfométricos

As médias e desvios-padrão do volume percentual relativo de osso neoformado no defeito femoral de G1 a G7, foram respectivamente: $36,39 \pm 3,86$ (G1-C); $66,40 \pm 3,69$ (G2-E24/50); $55,12 \pm 2,23$ (G3-E24/50/HA); $58,46 \pm 1,79$ (G4-E24/50/BMP); $51,36 \pm 3,15$ (G5-E96/37); $71,28 \pm 4,26$ (G6-E96/37/HA); $45,54 \pm 3,98$ (G7-E96/37/BMP), conforme o gráfico (figura 37):

Figura 37 - Gráfico da análise morfométrica de todos os grupos.

Demonstração do percentual de osso neoformado de cada grupo.
Fonte: Próprio autor.

4.5 Achados da análise estatística

A análise estatística comparativa entre os grupos de estudo, revelou que todos os grupos enxertados com polímeros de elastina (G2 a G7), apresentaram diferença significativa superior de volume ósseo neoformado ao grupo controle ($p < 0.01$).

Em relação ao tempo e temperatura do processo de hidrólise alcalina das membranas, observou-se valor superior de osso neoformado do grupo que recebeu membrana confeccionada por 24 h à 50°C (G2) em relação à G5 com membrana tratada por 96 h à 37°C ($p < 0.01$). Resultado semelhante foi observado ao comparar G4 (24 h e 50°C) com G7 (96 h e 37°C) onde ambos receberam a BMP na lesão óssea junto com as membranas ($p < 0.01$). Porém, o contrário foi observado ao analisar o grupo G6 (96 h e 37°C) que teve valor superior ao encontrado no G3 (24 h e 50°C), sendo que ambos receberam grânulos de hidroxiapatita na lesão óssea ($p < 0.01$).

Em relação aos biomateriais associados (BMP e hidroxiapatita), o valor para G6 (HA) foi maior que G7 (BMP), ambos com membranas tratadas por 96 horas em meio alcalino ($p < 0.01$). Entretanto, a hidroxiapatita associada a membrana tratada por 24 h (G3) apresentou capacidade osteogênica semelhante a membrana de 24 h associada a BMP (G4), conforme o ANEXO C.

5. DISCUSSÃO

A engenharia de tecidos é uma área de atuação multidisciplinar que desperta interesse crescente e abrange a pesquisa biológica básica com objetivo de auxiliar na reparação de tecidos lesados com a ajuda de biomateriais. O conceito fundamental está centrado na utilização de substitutos que promovam a migração, proliferação e diferenciação de células a fim de se obter a regeneração tecidual (BILLSTRÖM et al., 2013; DIMITRIOU et al., 2012; GROVER; CAMERON; BEST, 2012; JANICKI; SCHMIDMAIER, 2011; LAURECIN; JIANG, 2014; LEBRE et al., 2017; MIJIRITSKY et al., 2017; RATNAYAKE; MUCALO; DIAS, 2017).

O sucesso de um implante ósseo depende da presença de vários fatores concomitantes, destacando-se as suas características estruturais, a estabilidade local na interface da área receptora e o enxerto, a porosidade e a interconectividade dos poros do material (BILLSTRÖM et al., 2013; DUBOIS et al., 1999; RICCIARDI; BOSTROM, 2013).

Além destas, algumas características dos materiais são fundamentais para que o processo de osteointegração ocorra de forma adequada e contínua, destacando-se a biocompatibilidade e biodegradabilidade (CHUG et al., 2013; LAKSHMI; LAURENCIN, 2007; ORYAN et al., 2014; VELASCO; NARVAEZ-TOVAR; GARZON-ALVARADO, 2015).

5.1 Sobre a biocompatibilidade

Biocompatibilidade é a capacidade de suportar a atividade celular normal, incluindo sistemas de sinalização molecular, sem induzir ou provocar os efeitos adversos locais ou sistêmicos ao hospedeiro. Entre os efeitos indesejáveis que devem ser evitados ou controlados após a implantação do material estão a citotoxicidade, a imunogenicidade, a mutagenicidade e a trombogenicidade. Notadamente, a reação inflamatória deve ser evitada, pois pode comprometer a regeneração e promover a rejeição tecidual (PRAKASAM et al., 2017; RATNER et al., 2013; SABER-SAMANDARI; SABER-SAMANDARI, 2017; VELASCO; NARVAEZ-TOVAR; GARZON-ALVARADO, 2015).

Gardin et al. (2015) destacaram que a integração apropriada com o tecido circundante é o objetivo final de todas as técnicas de regeneração tecidual, pois é essencial que o enxerto se integre com o tecido hospedeiro. Os autores utilizaram um modelo experimental de implantação subcutânea de biomateriais originados de pericárdio e osso epifisário bovino em ratos para avaliar reações locais do tecido comparando métodos de descelularização das matrizes com amostras nativas. Observaram respostas teciduais distintas com melhores resultados nos implantes descelularizados, sem a presença de evento inflamatório. Ao contrário, nas membranas nativas foram evidenciadas células gigantes mono e multinucleadas profundamente aos enxertos, caracterizando uma reação imunológica de rejeição. Estas características foram ressaltadas por Ratner et al. (2013), que consideraram a presença de células inflamatórias e células gigantes multinucleadas como indicativas de reação de corpo estranho características de incompatibilidade biológica do enxerto.

Da mesma forma, nesta pesquisa escolheu-se como fonte de produção da membrana de elastina, a origem bovina. As membranas foram modificadas através de um processo de preparação com hidrólise alcalina. Este método promove a remoção das células teciduais que poderiam provocar rejeição imunológica melhorando a biocompatibilidade do material e ainda transforma a matriz nativa em uma estrutura porosa, conforme descrito previamente em biomateriais de colágeno (GOISSIS; PICCIRILLI; PLEPIS, 1999; HORN; MARTINS; PLEPIS, 2009; LACERDA; PLEPIS; GOISSIS, 1998; MOREIRA et al., 2013).

Os aspectos macroscópicos nesta pesquisa não evidenciaram sinais clínicos inflamatórios ou infecciosos dos tecidos moles circunjacentes ou do tecido ósseo. Também não foram observados distúrbios macroscópicos na área do defeito como microfissuras adjacentes, coloração anormal do tecido com aspecto de necrose ou osteíte, periostite, neoformação tumoral óssea, proliferação neoplásica de tecido fibroso desmoide e a formação de coágulos sanguíneos na área cirúrgica.

Estes resultados estão em acordo com outros estudos previamente publicados na literatura, evidenciando adequada biocompatibilidade dos aloenxertos baseados na matriz extracelular e de origem bovina submetidos a hidrólise alcalina (HIRATA et al., 2015; MORAES, 2017; MUNHOZ, 2013). Estes resultados devem estar relacionados a baixa imunogenicidade das membranas obtidas pela remoção das células através deste tipo de tratamento químico das matrizes.

Além destes achados, na análise radiográfica de G2 a G7 notou-se a permanência da lesão óssea produzida experimentalmente, com bordas regulares, sem áreas de rarefação, e o centro com imagem radiolúcida e linhas radiopacas esparsas. Este aspecto pode ser indicativo de presença de tecido ósseo neoformado ou resquícios dos biomateriais implantados, cuja radiopacidade é insuficiente para ser perceptível ao exame radiográfico conforme descrito na literatura (CUNHA et al., 2011; FEHLBERG, 2001; VITAL et al., 2006). Estes achados indicaram a ausência de sinais radiológicos típicos sinalizadores de rejeição imunológica, além da manutenção da integridade de diáfise e epífise femorais.

Comprovando a ausência de imunogenicidade das membranas deste estudo, os achados histológicos não evidenciaram áreas de necrose tecidual, infiltração de células inflamatórias e formações fibróticas na interface entre os implantes e o osso original nas áreas receptoras de G2 a G7, além de um processo contínuo de mineralização e degradação concomitantes dos materiais.

5.2 Sobre a biodegradabilidade

Os biomateriais utilizados na regeneração tecidual devem proporcionar um substrato provisório para a migração e diferenciação celular e deposição de uma nova matriz extracelular. É desejável que o biomaterial apresente uma velocidade de degradação contínua, proporcione um novo ambiente para a infiltração e proliferação celular tecidual regenerativa. Além disso, os produtos da degradação devem ser metabolizados e eliminados sem causar toxicidade local ou sistêmica (LAURECIN; JIANG, 2014; LAVRADOR, 2009; MARSELL; EINHORN, 2010; ORYAN et al., 2014; VELASCO; NARVAEZ-TOVAR; GARZON-ALVARADO, 2015; PRAKASAM et al., 2017).

Destacam-se na engenharia de tecidos os substitutos originados dos polímeros, que podem ser de origem sintética, como o ácido poliglicólico (PGA) e o ácido polilático (PLA). Estes são degradados com reações hidrolíticas, ocasionando frequentemente a criação de um meio ácido no local do implante, evoluindo com formação de respostas indesejadas de reabsorção, toxicidade e inflamação crônica no sítio receptor. De outra forma, os polímeros de origem natural como a elastina, originados de componentes da matriz extracelular, são metabolizados com vias fisiológicas enzimáticas de degradação e consequentemente ocasionando menor reação na área receptora (KIDO et al., 2015; LAURECIN; JIANG, 2014; PRAKASAM et al., 2017; VELASCO; NARVAEZ-TOVAR; GARZON-ALVARADO, 2015).

Lakshmi e Laurencin (2007), revisaram e confirmaram as características de biodegradabilidade de polímeros e salientaram que a elastina e os peptídeos do tipo elastina possuem excelente biocompatibilidade, propriedades não imunogênicas e se degradam produzindo compostos de aminoácidos naturais sem toxicidade .

Notou-se da mesma forma no presente estudo, características de baixa imunogenicidade e toxicidade dos produtos da degradação das membranas, uma vez que não foram evidenciadas áreas de reabsorção óssea nas bordas dos defeitos ósseos enxertados, devido aos achados das análises macroscópicas, radiográficas e histológicas.

Além disso, a tropoelastina, o monômero precursor da elastina, alterna sítios hidrofílicos e hidrofóbicos em sua estrutura. Diversos trabalhos sugeriram que a propriedade hidrofóbica da superfície do material diminuiria a velocidade de degradação, melhorando a sua capacidade regenerativa (AMRUTHWAR; JANORKAR, 2013; DAAMEN et al., 2007; GURUMURTHY; BIERDEMAN; JANORKAR, 2016; YEO et al., 2015).

Da mesma forma, nos achados histológicos do presente estudo as membranas foram degradadas em tempo adequado com neoformação óssea concomitante, devido a presença de alguns resquícios de membrana em G3-E24/50/HA, G4-E24/50/BMP, G5-E96/37 e G7-E96/37/BMP e degradação quase total das membranas em G2-E24/50 e G6-E96/37/HA. Ficou evidente a presença da regeneração óssea concomitante com presença de osteócitos em lacunas de forma frequente, estando de acordo com Prakasam et al. (2017), que reafirmou a necessidade da biodegradabilidade dos materiais, como um processo ao longo de um período de tempo suficiente para auxiliar a regeneração tecidual.

A biodegradabilidade observada nesta pesquisa está de acordo com os resultados esperados quanto a boa qualidade do material enxertado, podendo ser comprovada ao notar-se o maior volume neoformado nos grupos enxertados (G2 a G7) em relação ao grupo controle (G1).

Além das propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade presentes em um material utilizado na engenharia de tecidos, destaca-se a necessidade de avaliar a estabilidade do implante no sítio receptor, as características estruturais das membranas e a concentração de elementos da MEC presentes nas matrizes, como o colágeno e a elastina. Além disso, é importante avaliar a real necessidade de se utilizar compósitos, como por exemplo a hidroxiapatita e a BMP (BÁRTOLO et al., 2011; PRAKASAM et al., 2017; VELASCO; NARVAEZ-TOVAR; GARZON-ALVARADO, 2015).

5.3 Sobre a osteorregeneração

5.3.1 Capacidade osteogênica dos biomateriais no local receptor

A ligação da célula de ancoragem ao substrato é o primeiro passo nos processos de interação entre célula e superfície do material implantado. No caso dos biomateriais ortopédicos, a interação entre osteoblastos formadores de osso e o substrato pode influenciar a natureza da interface entre implante e osso neoformado (DUBOIS et al., 1999; ORYAN et al., 2014; SCHROEDER; MOSHEIFF, 2011).

De acordo com estes relatos, no presente estudo ficou evidente a estabilidade dos implantes nos locais receptores de G2 a G7, principalmente através das análises macroscópicas e histológicas, devido a observação da permanência do enxerto no centro do defeito. Além disso, nos achados histológicos foi possível observar a neoformação óssea contínua ao longo do tempo através dos marcadores fluorocromáticos (alizarina e calceína), que demonstraram a presença de uma ponte óssea unindo as bordas dos defeitos nos grupos enxertados, com a ausência de tecido fibrótico na interface do osso original e o material implantado, indicando assim o processo de osteointegração.

Nesta pesquisa, observou-se que todas as membranas dos grupos enxertados (G2 a G7) apresentaram capacidade osteorregenerativa visto que o volume ósseo neoformado foi maior que o controle (G1), neste caso deve ser avaliado o tamanho dos poros, porosidade, rugosidade, composição estrutural, além da capacidade osteogênica dos materiais sob forma de blenda ou compósito (FINKEMEIER, 2002; KIDO et al., 2015; KURIEN; PEARSON; SCAMMELL, 2013; ORYAN et al., 2014; VELASCO; NARVAEZ-TOVAR; GARZON-ALVARADO, 2015).

5.3.2 Porosidade e tamanho dos poros

Biomateriais porosos facilitam a migração, proliferação e diferenciação celular, permitindo o transporte de nutrientes e oxigênio dentro da estrutura. Os *scaffolds* devem apresentar uma estrutura de organização tridimensional e proporcionar uma grande área de superfície interna com porosidade e tamanho dos poros adequados (BÁRTOLO et al., 2011; CUNHA, 2001; HANNINK; ARTS, 2011; MOORE et al., 2004; ZIMMERMANN; MOGHADDAM, 2011).

Diversos autores têm estudado o tamanho dos poros, destacando sua importância em proporcionar um arcabouço que permita o crescimento ósseo. No entanto, não existe um consenso sobre o valor ideal para que ocorra a reparação adequada, pois existem relatos de osteorregeneração com poros variando em valores mínimos de 50 μm e máximo de até 500 μm (BÁRTOLO et al., 2011; MAUFFREY et al., 2011; ORYAN et al., 2014; SOPYAN et al., 2007; VELASCO; NARVAEZ-TOVAR; GARZON-ALVARADO, 2015; PRAKASAM et al., 2017).

Embora menos enfatizada na literatura, a microporosidade presente no enxerto (0,5 a 10 μm) auxilia no processo regenerativo e alguns autores observaram que uma combinação de macroporos e microporos interconectados seja a característica mais importante de um biomaterial em proporcionar um ambiente adequado à neoformação óssea (BILLSTRÖM et al., 2013; HOLLISTER; MURPHY, 2011).

Dahabreh et al. (2014) compararam as características de micro e macroporosidade de sete tipos de substitutos de enxertos ósseos. Concluíram que o β -trifosfato de cálcio conseguiu manter a viabilidade das células osteoprogenitoras, permitiu a proliferação e a diferenciação celular com melhores resultados. A macroporosidade teria fornecido um espaço no qual o crescimento ósseo ocorreu por osteocondução. Os poros pequenos de 1 a 100 μm estariam menos disponíveis para o crescimento ósseo, mas poderiam aumentar a difusão, melhorando assim o ambiente metabólico dentro da matriz. Sugeriram que a macroporosidade ideal para infiltração celular tem uma faixa de 150 a 500 μm . Os autores salientaram ainda que o tamanho ideal dos poros para crescimento nas regiões mais profundas, cerca de 3 a 4 mm das superfícies dos biomateriais, ainda não havia sido bem estabelecido em estudos sistemáticos.

Notou-se na presente pesquisa que os poros apresentaram tamanhos médios de $26,41 \mu\text{m} \pm 9,55$ nas membranas de elastina tratadas com hidrólise alcalina por 24 h à 50°C e $36,50 \mu\text{m} \pm 11,25$ nas preparadas por 96 h à 37°C (tabela 1, anexo A). Apesar de não estarem na faixa sugerida como ideal descrita na literatura, evidenciou-se maior formação de volume ósseo relativo em todos os grupos enxertados (G2 a G7) em relação ao grupo controle.

Uma vantagem em utilizar polímeros naturais como a elastina, é a possibilidade de realizar modificações estruturais que melhorem sua bioatividade, como a hidrólise alcalina (LACERDA; PLEPIS; GOISSIS, 1998; MOREIRA et al., 2004; PLEPIS; GOISSIS; DAS-GUPTA, 1996).

Horn, Martins e Plepis (2009) estudaram os efeitos termais e morfológicos em biomateriais de colágeno aniônico submetidos a hidrólise alcalina em diferentes tempos de processamento. Observaram que as esponjas de colágeno apresentaram uma estrutura porosa com um tamanho médio de poro diminuindo com o tempo de hidrólise alcalina, que variava de $163,9 \mu\text{m} \pm 12,4$ (hidrólise por 24 h) para $117,7 \mu\text{m} \pm 9,4$ (hidrólise por 96 h). A presença de quitosana em associação com o colágeno aniônico induzia uma grande redução de tamanho de poro com valores médios de $88.5 \mu\text{m} \pm 7.4$.

Ao contrário, foi possível observar no presente estudo que as membranas de elastina com um menor tempo de hidrólise, mas com uma temperatura maior (E24/50), possuíam poros com tamanhos médios menores do que os encontrados para as

matrizes que foram submetidas a um tempo mais longo de hidrólise, mas com uma temperatura menor (E96/37). No entanto, ao contrário do que se poderia esperar, na comparação de volume ósseo neoformado entre G2-E24/50 e G5-E96/37 e também observado entre G4-E24/50/BMP e G7-E24/50/BMP, houve uma maior formação no grupo que apresentou poros com tamanhos médios menores, que são aquelas membranas tratadas por 24 h a 50°C (G2 e G4). Entretanto, observou-se o contrário ao comparar G3-E24/50/HA com G6-E96/37/HA havendo neste caso maior volume ósseo nas membranas com maior porosidade, porém associado com a HA. Desta maneira sugere-se que outros fatores influenciam decisivamente na osteorregeneração, como por exemplo a interconectividade entre os poros, bem como os tipos de compósitos associados.

A relevância da interconectividade dos poros foi relatada por vários autores, destacando a necessidade que estas conexões permitam a troca de fluidos corporais, adição de íons e proliferação vascular e angiogênica. Os poros não conectados não participam desses eventos fisiológicos fundamentais para a regeneração tecidual (CUNHA et al., 2017; MOORE et al., 2004; VELASCO; NARVAEZ-TOVAR; GARZON-ALVARADO, 2015). Entretanto, não foi possível realizar a análise ultraestrutural da conexão entre os poros no presente estudo, sendo este um achado essencial para a continuação dos estudos na engenharia de tecidual sobre biomateriais, implantologia e osteointegração.

5.3.3 Influência da composição e da superfície do biomaterial

Entre os biomateriais que procuram mimetizar a MEC, se destacam aqueles compostos por colágeno e a elastina, devido suas propriedades favoráveis de reparo tecidual e na capacidade de serem submetidas a modificações estruturais que melhorem a sua bioatividade (GURUMURTHY; BIERDEMAN; JANORKAR, 2016; KHAN et al., 2008; KRISHNAKUMAR et al., 2018).

Baseados nestes conceitos, no presente estudo foram utilizados materiais originados na matriz extracelular modificados com hidrólise alcalina. Foi observado na caracterização físico-química do material, que não restou a presença de colágeno aniônico nas matrizes, tanto na preparação de hidrólise alcalina por longo período de tempo (96h) e temperatura de 37°C como no intervalo curto (24h), mas com uma temperatura elevada de 50°C (figura 1, anexo A). Notou-se que mesmo com a ausência do colágeno aniônico nas matrizes, que poderia auxiliar o processo de reparação, ocorreu a reparação óssea devido ao aumento de volume ósseo neoformado observados nos grupos implantados de G2 a G7 em comparação ao grupo controle (G1). Desta maneira, pode-se comprovar que a elastina apresentou capacidade osteorregenerativa favorável.

Outro fator que pode ter contribuído para a regeneração óssea observada na atual pesquisa, foi a presença da rugosidade na superfície das membranas de elastina modificadas, conforme mostrado nas análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das membranas (figuras 2 e 3, anexo A). Em acordo, Khan et al. (2008) enfatizaram que as células se ligam, migram, proliferam e se diferenciam de acordo com as superfícies às quais estão ligadas. Bártolo et al. (2011) destacaram que a geometria estrutural do material e as características da superfície são relevantes, enfatizando que a rugosidade pode ter um papel importante na regeneração tecidual e na viabilidade do biomaterial.

Alternativamente, os materiais baseados na mimetização da MEC podem ser utilizados sob a forma de compósitos em procedimentos na engenharia de tecidos.

5.3.4 Biomateriais associados como estimuladores da osteogênese

Os grupos de biomateriais associados do presente estudo (G3-E24/50/HA, G4-E24/50/BMP, G6-E96/37/HA e G7-E96/37/BMP) apresentaram maior volume de osso formado em relação grupo controle (G1) demonstrando a sua capacidade osteorregenerativa.

Estes achados estão de acordo com vários estudos publicados desde a década de 60 sobre a capacidade regenerativa das BMPs, que evidenciaram resultados com taxas de regeneração tecidual favoráveis (BUZA III; EINHORN, 2016; COLE et al., 2014; ISSA, et al., 2016; MIGLIORINI et al., 2016; SHEIKH et al., 2015).

Outro aspecto relevante relaciona-se com a maneira de aplicar a BMP no local receptor, embora tenha sido demonstrado que as BMPs podem estimular a formação de tecido ósseo quando utilizadas na forma de solução diretamente no sítio receptor, a dose necessária para induzir a formação óssea pode ser dramaticamente reduzida se forem implantadas com auxílio de um carreador apropriado (AGRAWAL; SINHA, 2017; GIANNOUDIS; DINOPOULOS, 2010; ISSA, et al., 2008; KAITO et al., 2013), assim como usada no presente estudo nas membranas de elastina.

Assim como a BMP, a hidroxiapatita tem sido utilizada isoladamente ou em compósitos na engenharia de tecidos, devido principalmente a capacidade de promover a função e a expressão celular, além de formar uma ligação forte entre o osso e a interface do biomaterial. Além disso, estes biomateriais osteocondutores são semelhantes a parte inorgânica do osso, favorecendo a osteointegração (RATNAYAKE; MUCALO; DIAS, 2017; VITAL et al., 2006; ZIMMERMANN; MOGHADDAM, 2011). Quando atuam em compósitos porosos, contribuem decisivamente no processo de regeneração dos defeitos ósseos (DAHABREH et al., 2014; KURIEN; PEARSON; SCAMMELL, 2013; PRAKASAM et al., 2017; VELASCO; NARVAEZ-TOVAR; GARZON-ALVARADO, 2015), como observado no presente estudo em G6-E96/37/HA devido ao maior volume neoformado.

Ao comparar os grupos com BMP (G4 e G7) notou-se maior volume ósseo para aquela membrana com menor tamanho do poro (G4), estando de acordo com a afirmativa de Dahabreh et al. (2014) que poros menores favoreceriam a difusão celular, como no caso da osteoindução pela BMP. No entanto, o comportamento da hidroxiapatita quando associada a elastina ocorreu de maneira contrária. O volume ósseo neoformado foi maior em G6-E96/37/HA que tem poros maiores em relação a G3-E24/50/HA, provavelmente devido a obstrução dos poros menores pela hidroxiapatita em G3 e uma melhor bioatividade em G6. Estes achados estão de acordo com as afirmativas publicadas por outros autores, que enfatizaram a necessidade de utilização da hidroxiapatita com polímeros portadores de poros maiores (RATNAYAKE; MUCALO; DIAS, 2017; VELASCO; NARVAEZ-TOVAR; GARZON-ALVARADO, 2015).

Diversos autores questionam a utilização da hidroxiapatita isolada devido a sua baixa resistência mecânica proporcionada na área receptora (BILLSTRÖM et al., 2013; FINKEMEIER, 2002; KURIEN; PEARSON; SCAMMELL, 2013). Outro fator fundamental no uso dos biomateriais em defeitos ósseos é que o resultado final do reparo imite o mais próximo possível as propriedades mecânicas teciduais originais, proporcionando um suporte definitivo para estabilidade do segmento afetado (BÁRTOLO et al., 2011; LAURECIN; JIANG, 2014; MATHAVAN; TAGIL; ISAKSSON, 2017; RAUH et al., 2014).

Portanto, salienta-se a necessidade da realização novas pesquisas a fim de avançar os conhecimentos sobre as diversas variáveis envolvidas na capacidade osteorregenerativa dos biomateriais. A busca de padronização da estrutura tridimensional do enxerto, porosidade, interconectividade e tamanho dos poros ideais, permanece como um objetivo a ser alcançado num futuro próximo.

6. CONCLUSÕES

- As matrizes de elastina isoladas e associadas a hidroxiapatita e BMP apresentaram biocompatibilidade no tecido ósseo receptor do fêmur de ratos;
- Todas as membranas apresentaram reabsorção biológica simultânea a neoformação óssea do reparo do defeito;
- O osso formado apresentou características predominantemente imaturas e maduras em proporção variada em todos os grupos, indicando o processo constante de remodelação óssea;
- Todas as membranas estimularam o crescimento ósseo em forma de ponte para o reparo da área lesada no fêmur dos ratos, demonstrando sua capacidade osteogênica;
- Foi observada a osteointegração das membranas utilizadas devido a ausência de tecido fibrótico na interface osso/implante;
- O volume ósseo relativo neoformado na área cirúrgica dos grupos implantados foi superior ao grupo controle.

REFERÊNCIAS¹

ABDEL-AAL, A. M. Ilizarov bone transport for massive tibial bone defects. **Orthopedics**, v. 29, n. 1, p. 70-74, 2006.

AFFONSO, A. S. **Interação entre biomateriais e tecido ósseo**. 1998. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Dentária, Universidade do Porto, Porto, 1998.

AGRAWAL, V.; SINHA, M. A Review on carrier systems for bone morphogenetic protein-2. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: applied biomaterials**, v. 105, n. 4, p. 904-925, 2017.

ALLEN, T. **Particle size measurement- powder sampling and particle size measurement**. London: Chapman & Hall, 1997.

ALMINE, J. F. et al. Elastin-based materials. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 9, p. 3371-3379, 2010.

ALT, V. et al. Treatment of a double nonunion of the femur by rhBMP-2. **Journal of Orthopedic Trauma**, v. 21, n. 10, p. 734-737, 2007.

AMARAL, M. B. **Capacidade de regeneração óssea de biomateriais em defeito crítico de calvária: análise histológica e microtomografia computadorizada**. São Carlos: Bioengenharia/USP, 2013.

AMRUTHWAR, S. S.; JANORKAR, A. V. In Vitro evaluation of elastin-like polypeptide-collagen composite scaffold for bone tissue engineering. **Dental Materials**, v. 29, n. 2, p. 211-220, 2013.

BÁRTOLO, P. J. Biofabrication strategies for tissue engineering. In: FERNANDES, P.; BÁRTOLO, P. (Ed.). **Advances on modeling in tissue engineering**. Dordrecht: Springer, 2011. p.137-176. (Computational Methods in Applied Sciences, 20).

BIGHAM-SADEGH, A.; ORYAN, A. Basic concepts regarding fracture healing and the current options and future directions in managing bone fractures. **International Wound Journal**, v. 12, n. 3, p. 238-247, 2015.

BILLSTRÖM, G. H. et al. Application of scaffolds for bone regeneration strategies: current trends and future directions. **Injury: international journal of the care of the injured**, v. 44, Suppl. 1, p. S28-S33, 2013.

BISHOP, J. A. et al. Assessment of compromised fracture healing. **Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 20, n. 5, p. 273-282, 2012.

BLOKHUIS, T. J.; LINDNER, T. Allograft and bone morphogenetic proteins: an overview. **Injury: international journal of the care of the injured**, v. 39 Suppl. 2, p. S33-S36, 2008.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

BLOKHUIS, T. J.; ARTS, J. J. Bioactive and osteoinductive bone graft substitutes: definitions, facts and myths. **Injury: international journal of the care of the injured**, v. 42, Suppl. 2, p. S26-S29, 2011.

BLOKHUIS, T. J.; CALORI, G. M.; SCHMIDMAIER, G. Autograft versus BMPs for the treatment of non-unions: what is the evidence?. **Injury: international journal of the care of the injured**, v. 44, Suppl. 1, p. S40-S42, 2013.

BOHNING, B. P.; DAVENPORT, W. D.; JEANSONNE, B. G. The Effect of guided tissue regeneration on the healing of osseous defects in rat calvaria. **Journal of Endodontics**, v. 25, n. 2, p. 81-84, 1999.

BOSCH, C.; MELSEN, B.; VARGERVIK, K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 9, n. 4, p. 310-316, 1998.

BOSEMARK, P. et al. Augmentation of autologous bone graft by a combination of bone morphogenetic protein and bisphosphonate increased both callus volume and strength. **Acta Orthopaedica**, v. 84, n. 1, p. 106-111, 2013.

BUCHAIM, R. et al. A New anionic bovine tendon as scaffold for the repair of bone defects: a morphological, histomorphometric and immunohistochemical study. **British Journal of Medicine and Medical Research**, v. 10, n. 8, p. 1-11, 2015.

BUZA III, J. A.; EINHORN, T. Bone healing in 2016. **Clinical Cases in Mineral Bone Metabolism**, v. 13, n. 2, p. 101-105, 2016.

CALORI, G. M. et al. The Use of bone-graft substitutes in large bone defects: any specific needs?. **Injury: international journal of the care of the injured**, v. 42, Suppl. 2, p. S56-S63, 2011.

_____. Incidence of donor site morbidity following harvesting from iliac crest or RIA graft. **Injury: international journal of the care of the injured**, v. 45, Suppl. 6, p. S116-S120, 2014.

CHANG, M. C.; KO, C.-C.; DOUGLAS, W. H. Preparation of hydroxyapatite-gelatin nanocomposite. **Biomaterials**, v. 24, n. 17, p. 2853-2862, 2003.

CHUG, A. et al. Osseointegration—molecular events at the bone–implant interface: a review. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology**, v. 25, n. 1, p. 1-4, 2013.

CHUNG, M. I. et al. Sequences and domain structures of mammalian, avian, amphibian and teleost tropoelastins: clues to the evolutionary history of elastins. **Matrix Biology**, v. 25, n. 8, p. 492-504, 2006.

COLE, T. et al. Usage of recombinant human bone morphogenetic protein in cervical spine procedures: analysis of the MarketScan longitudinal database. **The Journal of Bone and Joint Surgery**. American volume, v. 96, n. 17, p. 1409-1416, 2014.

COMPTON, J. T.; LEE, F. Y. A Review of osteocyte function and the emerging importance of sclerostin. **The Journal of Bone and Joint Surgery**. American volume, v. 96, n. 19, p. 1659-1668, 2014.

COSTA, J. B. et al. Tissue engineering in orthopaedic sports medicine: current concepts. **Journal of ISAKOS: joint disorders & orthopaedic sports medicine**, v. 2, n. 2, p. 60-66, 2017.

CUNHA, M. R. **Implantes subperiosteais de hidroxiapatita em ratos submetidos à ingestão crônica de álcool**. 2001. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

_____. **Implantes tridimensionais de colágeno polianiónico em falhas ósseas produzidas no fêmur de ratas ovariectomizadas**. 2006. Tese (Doutorado) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

CUNHA, M. R. et al. Implants of polyanionic collagen matrix in bone defects of ovariectomized rats. **Journal of Materials Science: materials medicine**, v. 19, n. 3, p. 1341-1348, 2008.

_____. Osteoconductive capacity of hydroxyapatite implanted into the skull of diabetics. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 22, n. 6, p. 2048-2052, 2011.

_____. In Vivo study of the osteoregenerative potential of polymer membranes consisting of chitosan and carbon nanotubes. **Materials Research**, v. 20, n. 3, p. 819-825, 2017.

DAAMEN, W. F. et al. Elastin as a biomaterial for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 28, n. 30, p. 4378-4398, 2007.

DAHABREH, Z. et al. Ability of bone graft substitutes to support the osteoprogenitor cells: an in-vitro study. **World Journal of Stem Cells**, v. 6, n. 4, p. 497-504, 2014.

DE LONG, J.M. et al. Update on platelet-rich plasma. **Current Orthopaedic Practice**, v. 22, n. 6, p. 514-523, 2011.

DIMITRIOU, R.; TSIRIDIS, E.; GIANNOUDIS, P. V. Current concepts of molecular aspects of bone healing. **Injury: international journal of the care of the injured**, v. 36, n. 12, p. 1392-1404, 2005.

DIMITRIOU, R. et al. Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: a systematic review. **Injury: international journal of the care of the injured**, v. 42, Suppl. 2, p. S3-S15, 2011.

_____. The Role of barrier membranes for guided bone regeneration and restoration of large bone defects: current experimental and clinical evidence. **BMC Medicine**, v. 10, n., p. 81, 2012.

DUBOIS, J. C. et al. An Image analysis method for the study of cell adhesion to biomaterials. **Biomaterials**, v. 20, n. 19, p. 1841-1849, 1999.

EINHORN, T. A. Science of bone healing. **Journal of Orthopedic Trauma**, v. 19, n. 10, p.S4-S6, 2005, suplement.

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

FEHLBERG, A. F. **Hidroxiapatita sintética na regeneração da falha óssea provocada em fratura completa de terço intermédio de tíbia imobilizada pela fixação percutânea em cães**. 2001. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

FINKEMEIER, C. G. Bone-grafting and bone-graft substitutes. **The Journal of Bone and Joint Surgery**. American volume, v. 84, n. 3, p. 454-464, 2002.

FLIERL, M. A. et al. Outcomes and complication rates of different bone grafting modalities in long bone fracture nonunions: a retrospective cohort study in 182 patients. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 8, p. 33-42, 2013.

GARDIN, C. et al. Decellularization and delipidation protocols of bovine bone and pericardium for bone grafting and guided bone regeneration procedures. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0132344, 2015. Doi: 10.1371/journal.pone.0132344.

GARRISON, K. R. et al. Bone morphogenetic protein (BMP) for fracture healing in adults. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 6, p. CD006950, 2010. Doi: 10.1002/14651858.CD006950.pub2.

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

GIANNOUDIS, P. V.; DINOPOULOS, H. T. BMPs: options, indications, and effectiveness. **Journal of Orthopedic Trauma**, v. 24 Suppl. 1, p. S9-S16, 2010.

GIANNOUDIS, P. V.; DINOPOULOS, H.; TSIRIDIS, E. Bone substitutes: an update. **Injury: international journal of the care of the injured**, v. 36, Suppl. 3, p. S20-S27, 2005.

GIANNOUDIS, P. V.; EINHORN, T. A.; MARSH, D. Fracture healing: the diamond concept. **Injury: international journal of the care of the injured**, v. 38, p. S3-S6, 2007.

GIANNOUDIS, P. V. et al. Inflammation, bone healing, and anti-inflammatory drugs: an update. **Journal of Orthopedic Trauma**, v. 29, Suppl. 12, p. S6-S9, 2015.

GLASSMAN, M. J. et al. Toughening of thermoresponsive arrested networks of elastin-like polypeptides to engineer cytocompatible tissue scaffolds. **Biomacromolecules**, v. 17, n. 2, p. 415-426, 2016.

GOISSIS, G. et al. Preparation and carachterization of anionic collagen. **Polymer Engeneerring and Science**, v. 39, n. 3, p. 474-482, 1999.

GROSS, R. H. The Use of bone grafts and bone graft substitutes in pediatric orthopaedics: an overview. **Journal of Pediatric Orthopaedics**, v. 32, n. 1, p. 100-105, 2012.

GROVER, C. N.; CAMERON, R. E.; BEST, S. M. Investigating the morphological, mechanical and degradation properties of scaffolds comprising collagen, gelatin and elastin for use in soft tissue engineering. **Journal of Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 10, p. 62-74, 2012.

GURUMURTHY, B.; BIERDEMAN, P. C.; JANORKAR, A. V. Composition of elastin like polypeptide-collagen composite scaffold influences in vitro osteogenic activity of human adipose derived stem cells. **Dental Materials**, v. 32, n. 10, p. 1270-1280, 2016.

HAFFNER-LUNTZER, M. et al. In Vivo evaluation of fracture callus development during bone healing in mice using an MRI-compatible osteosynthesis device for the mouse femur. **Journal of Visualized Experiments**, n. 129, 2017. Doi: 10.3791/56679.

HAIDER, A. et al. BMP-2 grafted nHA/PLGA hybrid nanofiber scaffold stimulates osteoblastic cells growth. **BioMed Research International**, v. 2015, ID: 281909, 2015. Doi: 10.1155/2015/281909.

HAK, D. J. The Use of osteoconductive bone graft substitutes in orthopaedic trauma. **Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 15, n. 9, p. 525-536, 2007.

HANKENSON, K. D.; ZIMMERMAN, G.; MARCUCIO, R. Biological perspectives of delayed fracture healing. **Injury: international journal of the care of the injured**, v. 45, Suppl. 2, p. S8-S15, 2014.

HANNINK, G.; ARTS, J. J. Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: what is optimal for bone regeneration?. **Injury: international journal of the care of the injured**, v. 42, Suppl. 2, p. S22-S25, 2011.

HIRATA, H. H. et al. Feasibility study of collagen membranes derived from bovine pericardium and intestinal serosa for the repair of cranial defects in ovariectomised rats. **Injury: international journal of the care of the injured**, v. 46, n. 7, p. 1215-1222, 2015.

HOLLISTER, S. J.; MURPHY, W. L. Scaffold translation: barriers between concept and clinic. **Tissue Engineering Part B: reviews**, v. 17, n. 6, p. 459-474, 2011.

HORN, M. M.; MARTINS, V. C. A.; PLEPIS, A. M. G. Interaction of anionic collagen with chitosan: effect on thermal and morphological characteristics. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 2, p. 239-243, 2009.

HOSAKA, K. et al. Union, knee alignment, and clinical outcomes of patients treated with autologous bone grafting for medial tibial defects in primary total knee arthroplasty. **Orthopedics**, v. 40, n. 4, p. e604-e608, 2017.

ISSA, J. et al. Sustained release carriers used to delivery bone morphogenetic proteins in the bone healing process. **Anatomia, histologia, embryologia**, v. 37, n. 3, p. 181-187, 2008.

ISSA, J. P. et al. Collagen fibers evaluation after rhBMP-2 insertion in critical-sized defects. **Micron**, v. 40, n. 5/6, p. 560-562, 2009.

_____. Bone repair of critical size defects treated with autogenic, allogenic, or xenogenic bone grafts alone or in combination with rhBMP-2. **Clinical Oral Implants Research**, v. 27, n. 5, p. 558-566, 2016.

JAHAN, K.; TABRIZIAN, M. Composite biopolymers for bone regeneration enhancement in bony defects. **Biomaterials Science**, v. 4, n. 1, p. 25-39, 2016.

JANICKI, P.; SCHMIDMAIER, G. What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. **Injury: international journal of the care of the injured**, v. 42, Suppl. 2, p. S77-S81, 2011.

JARCHO, M. et al. Hydroxyapatite synthesis and characterization in dense polycrystalline form. **Journal Materials Science**, v. 11, n. 11, p. 2027-2035, 1976.

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

KAITO, T. et al. Synergistic effect of bone morphogenetic proteins 2 and 7 by ex vivo gene therapy in a rat spinal fusion model. **The Journal of Bone and Joint Surgery. American volume**, v. 95, n. 17, p. 1612-1619, 2013.

KHAN, Y. et al. Tissue engineering of bone: material and matrix considerations. **The Journal of Bone and Joint Surgery. American volume**, v. 90, Suppl. 1, p. 36-42, 2008.

KIDO, H. W. et al. Porous poly (D,L-lactide-co-glycolide) acid/biosilicate((R)) composite scaffolds for bone tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: applied biomaterials**, v. 105, n. 1, p. 63-71, 2015.

KIRKER-HEAD, C. et al. BMP-silk composite matrices heal critically sized femoral defects. **Bone**, v. 41, n. 2, p. 247-255, 2007.

KONIG JR., B. **Implantologia e osteointegração**: quanto à pesquisa em cerâmicas, aplicações clínicas e outros materiais. São Paulo: Rocca, 2010.

KRISHNAKUMAR, G. S. et al. Evaluation of different crosslinking agents on hybrid biomimetic collagen-hydroxyapatite composites for regenerative medicine.

International Journal of Biological Macromolecules, v. 106, p. 739-748, 2018.

KURIEN, T.; PEARSON, R. G.; SCAMMELL, B. E. Bone graft substitutes currently available in orthopaedic practice: the evidence for their use. **The Bone & Joint Journal**, v. 95-B, n. 5, p. 583-597, 2013.

KWONG, F. N.; HARRIS, M. B. Recent developments in the biology of fracture repair. **Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 16, n. 11, p. 619-625, 2008.

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. **Química Nova**, v. 3, n. 21, p. 267-271, 1998.

LAKSHMI, N. S.; LAURENCIN, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 8/9, p. 762-798, 2007.

LANZETTI, R. M. et al. The Role of diabetes mellitus and BMI in the surgical treatment of ankle fractures. **Diabetes / Metabolism Research and Reviews**, v.34, n.2, p.e2954, 2017.

LAPCHIK, V. B.; MATTARAIA, V. G. M.; KO, G. M. **Cuidados e manejo de animais de laboratório**. São Paulo: Atheneu, 2009.

LAURECIN, C. T.; JIANG, T. **Bone graft substitutes and bone regenerative engineering**. 2nded. West Conshohocken: ASTM International, 2014.

LAVRADOR, C. F. T. V. B. **Redução da morbidade iatrigênica no local doador de enxerto ósseo**. Estudo de alternativas cirúrgicas em modelo ovino. Évora: Universidade de Évora, 2009.

LEAO, M. G. S. et al. Quality-of-life assessment among patients undergoing total knee arthroplasty in Manaus. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 49, n. 2, p. 194-201, 2014.

LEBRE, F. et al. The Shape and size of hydroxyapatite particles dictate inflammatory responses following implantation. **Scientific Reports**, v. 7, n. 2922, 2017. Doi: 10.1038/s41598-017-03086-0.

LEGEROS, R. Z.; CRAIG, R. G. Strategies to affect bone remodeling: osteointegration. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 8, Suppl. 2, p. S583-S596, 1993.

LI, J. J. et al. Current approaches to bone tissue engineering: the interface between biology and engineering. **Advances Healthcare Materials**, v. 7, n. 6, e1701061, 2018. Doi: 10.1002/adhm.201701061.

LI, X. et al. Effects of sequentially released BMP-2 and BMP-7 from PELA microcapsule-based scaffolds on the bone regeneration. **American Journal of Translation Research**, v. 7, n. 8, p. 1417-1428, 2015.

LI, Y. et al. Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials. **Journal of Orthopaedic Translation**, v. 3, n. 3, p. 95-104, 2015.

LIEBERMAN, J. R.; DALUISKI, A.; EINHORN, T. A. The Role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. **The Journal of Bone and Joint Surgery**. American volume, v. 84, n. 6, p. 1032-1044, 2002.

MACHADO, E. G. **Aplicação de um novo selante de fibrina combinado com as proteínas rhBMP-2 ou P-1 no reparo de defeitos na tíbia de ratos**. 2012. 61p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação, Faculdade de Medicina de Jundiaí, Jundiaí, 2012.

MACHADO, E. G. et al. A New heterologous fibrin sealant as scaffold to recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) and natural latex proteins for the repair of tibial bone defects. **Acta Histochemica**, v. 117, n. 3, p. 288-296, 2015.

MARSELL, R.; EINHORN, T. A. Emerging bone healing therapies. **Journal of Orthopedic Trauma**, v. 24 n. 3, p. S4-S8, 2010, Suppl.1.

MARSELL, R.; EINHORN, T. A. The Biology of fracture healing. **Injury: international journal of the care of the injured**, v. 42, n. 6, p. 551-555, 2011.

MARTIN, S. L.; VRHOVSKI, B.; WEISS, A. S. Total synthesis and expression in Escherichia coli of a gene encoding human tropoelastin. **Gene**, v. 154, n. 2, p. 159-166, 1995.

MATHAVAN, N.; TAGIL, M.; ISAKSSON, H. Do Osteoporotic fractures constitute a greater recalcitrant challenge for skeletal regeneration?. Investigating the efficacy of BMP-7 and zoledronate treatment of diaphyseal fractures in an open fracture osteoporotic rat model. **Osteoporosis International**, v. 28, n. 2, p. 697-707, 2017.

MAUFFREY, C.; BARLOW, B. T.; SMITH, W. Management of segmental bone defects. **Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 23, n. 3, p. 143-153, 2015.

MAUFFREY, C. et al. Bone graft substitutes for articular support and metaphyseal comminution: what are the options?. **Injury: international journal of the care of the injured**, v. 42, Suppl. 2, p. S35-S39, 2011.

MEHTA, S.; WATSON, J. T. Platelet rich concentrate: basic science and current clinical applications. **Journal of Orthopedic Trauma**, v. 22, n. 6, p. 432-438, 2008.

MIGLIORINI, E. et al. Tuning cellular responses to BMP-2 with material surfaces. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 27, p. 43-54, 2016.

MIJIRITSKY, E. et al. Porcine bone scaffolds adsorb growth factors secreted by MSCs and improve bone tissue repair. **Materials (Basel)**, v. 10, n. 9, p. 1054, 2017. Doi: 10.3390/ma10091054.

MILLER, C. P.; CHIODO, C. P. Autologous bone graft in foot and ankle surgery. **Foot and Ankle Clinics**, v. 21, n. 4, p. 825-837, 2016.

MITHIEUX, S. M.; WEISS, A. S. Elastin. **Advances in Protein Chemistry**, v. 70, p. 437-461, 2005.

MONTGOMERY, D. **Desing and analysis of experiments**. Canada: John Wiley, 1991. v.3.

MOORE, M. J. et al. Quantitative analysis of interconnectivity of porous biodegradable scaffolds with micro-computed tomography. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 71, n. 2, p. 258-267, 2004.

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

MOREIRA, P. L. et al. In Vitro analysis of anionic collagen scaffolds for bone repair. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: applied biomaterials**, v. 71, n. 2, p. 229-237, 2004.

_____. Bovine osteoblasts cultured on polyanionic collagen scaffolds: an ultrastructural and immunocytochemical study. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: applied biomaterials**, v. 101, n. 1, p. 18-27, 2013.

MORETTI, R. D. C. et al. Osteoinductive effects of preoperative dexamethasone in human dental pulp stem cells primary culture. **Future Science OA**, v. 3, n. 3, p. Fso184, 2017.

MUIZNIEKS, L. D. et al. Proline-poor hydrophobic domains modulate the assembly and material properties of polymeric elastin. **Biopolymers**, v. 103, n. 10, p. 563-573, 2015.

MUNHOZ, M. A. S. **Utilização de blendas poliméricas no reparo de defeitos cranianos de ratos**. 2013. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia, Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

NAUTH, A. et al. Bone graft substitution and augmentation. **Journal of Orthopedic Trauma**, v. 29 Suppl. 12, p. S34-S38, 2015.

NYAN, M. et al. Molecular and tissue responses in the healing of rat calvarial defects after local application of simvastatin combined with alpha tricalcium phosphate. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: applied biomaterials**, v. 93, n. 1, p. 65-73, 2010.

OFTADEH, R. et al. Biomechanics and mechanobiology of trabecular bone: a review. **Journal of Biomechanical Engineering**, v. 137, n. 1, p.1-15, 2015.

ORYAN, A.; MONAZZAH, S.; BIGHAM-SADEGH, A. Bone injury and fracture healing biology. **Biomedical Environmental Sciences**, v. 28, n. 1, p. 57-71, 2015.

ORYAN, A. et al. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 9, n. 1, p. 18-44, 2014.

PAPANAGIOTOU, M. et al. RhBMP-7 for the treatment of nonunion of fractures of long bones. **The Bone & Joint Journal**, v. 97-B, n. 7, p. 997-1003, 2015.

PLEPIS, A. M. G.; GOISSIS, G.; DAS-GUPTA, D. K. Dielectric and pyroelectric characterization of anionic and native collagen. **Polymer Engineering and Science**, v. 36, n. 24, p. 2932-2938, 1996.

PRAKASAM, M. et al. Biodegradable materials and metallic implants - a review. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 8, n. 4, 2017. Doi: 10.3390/jfb8040044.

QUINNAN, S. M. Segmental bone loss reconstruction using ring fixation. **Journal of Orthopedic Trauma**, v. 31 Suppl. 5, p. S42-S46, 2017.

RAHMAN, M. S. et al. TGF-beta/BMP signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation. **Bone Research**, v. 3, Article number 15005, 2015. Doi: 10.1038/boneres.2015.5.

RATNAYAKE, J. T. B.; MUCALO, M.; DIAS, G. J. Substituted hydroxyapatites for bone regeneration: a review of current trends. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: applied biomaterials**, v. 105, n. 5, p. 1285-1299, 2017.

RATNER, B. D. et al. **Biomaterials science**: an introduction to materials in medicine. Canada: Elsevier, 2013.

RAUH, J. et al. Comparative biomechanical and microstructural analysis of native versus peracetic acid-ethanol treated cancellous bone graft. **BioMed Research International**, v. 2014, ID: 784702, 2014. Doi: 10.1155/2014/784702.

RIBEIRO, C. et al. Piezoelectric poly(vinylidene fluoride) microstructure and poling state in active tissue engineering. **Engineering in Life Sciences**, v. 15, n. 4, p. 351-356, 2015.

RICCIARDI, B. F.; BOSTROM, M. P. Bone graft substitutes: claims and credibility. **Seminars in Arthroplasty**, v. 24, n. 2, p. 119-123, 2013.

RICHARDS, C. J.; GRAF JR., K. W.; MASHRU, R. P. The Effect of opioids, alcohol, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs on fracture union. **Orthopedic Clinics of North America**, v. 48, n. 4, p. 433-443, 2017.

ROCHA, L. B. et al. Shannon's entropy and fractal dimension provide an objective account of bone tissue organization during calvarial bone regeneration. **Microscopy Research and Technique**, v. 71, n. 8, p. 619-625, 2008.

SABER-SAMANDARI, S.; SABER-SAMANDARI, S. Biocompatible nanocomposite scaffolds based on copolymer-grafted chitosan for bone tissue engineering with drug delivery capability. **Materials Science & Engineering C: material for biological applied**, v. 75, p. 721-732, 2017.

SARBAN, S. et al. Can rhBMP-2 containing collagen sponges enhance bone repair in ovariectomized rats?: a preliminary study. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 467, n. 12, p. 3113-3120, 2009.

SCARANO, A. et al. Removal torque values of titanium implants inserted into bone defects filled with hydroxyapatite: a histologic and histomorphometric analysis in rabbit. **International Journal of Immunopathology Pharmacology**, v. 20, n. 1, p. 49-53, 2007. Suppl. 1.

SCHLIEPHAKE, H. Application of bone growth factors--the potential of different carrier systems. **Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 14, n. 1, p. 17-22, 2010.

SCHROEDER, J. E.; MOSHEIFF, R. Tissue engineering approaches for bone repair: concepts and evidence. **Injury: international journal of the care of the injured**, v. 42, n. 6, p. 609-613, 2011.

SHEIKH, Z. et al. Bone regeneration using bone morphogenetic proteins and various biomaterial carriers. **Materials (Basel)**, v. 8, n. 4, p. 1778-1816, 2015.

SHETH, U. et al. Efficacy of autologous platelet-rich plasma use for orthopaedic indications: a meta-analysis. **The Journal of Bone and Joint Surgery. American volume**, v. 94, n. 4, p. 298-307, 2012.

SILVA, S. S.; MANO, J. F.; REIS, R. L. Potential applications of natural origin polymer-based systems in soft tissue regeneration. **Critical Reviews Biotechnology**, v. 30, n. 3, p. 200-221, 2010.

SIMPSON, A. H.; MILLS, L.; NOBLE, B. The Role of growth factors and related agents in accelerating fracture healing. **The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume**, v. 88, n. 6, p. 701-705, 2006.

SOPYAN, I. et al. Porous hydroxyapatite for artificial bone applications. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 8, n. 1/2, p. 116-123, 2007.

TAMPIERI, A. et al. Intrinsic magnetism and hyperthermia in bioactive Fe-doped hydroxyapatite. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 2, p. 843-851, 2012.

TANASE, C. E. et al. In Vitro evaluation of biomimetic chitosan-calcium phosphate scaffolds with potential application in bone tissue engineering. **Biomedical Materials**, v. 8, n. 2, p. 025002, 2013.

TEJEDA-MONTES, E. et al. Mineralization and bone regeneration using a bioactive elastin-like recombinamer membrane. **Biomaterials**, v. 35, n. 29, p. 8339-8347, 2014.

TIELINEN, L. et al. Inability of transforming growth factor- β 1, combined with a bioabsorbable polymer paste, to promote healing of bone defects in the rat distal femur. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, v. 121, n. 4, p. 191-196, 2001.

TOSOUNIDIS, T. H.; GIANNOUDIS, P. V. Biological facet of segmental bone loss reconstruction. **Journal of Orthopedic Trauma**, v. 31 Suppl. 5, p. S27-S31, 2017.

TRACY, L. E.; MINASIAN, R. A.; CATERSON, E. J. Extracellular matrix and dermal fibroblast function in the healing wound. **Advances in Wound Care (New Rochelle)**, v. 5, n. 3, p. 119-136, 2016.

URIST, M. R. Bone: formation by autoinduction. **Science**, v. 150, n. 3698, p. 893-899, 1965.

URRY, D. W.; PATTANAIK, A. Elastic protein-based materials in tissue reconstruction. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 831, n. 1, p. 32-46, 1997.

VELASCO, M. A.; NARVAEZ-TOVAR, C. A.; GARZON-ALVARADO, D. A. Design, materials, and mechanobiology of biodegradable scaffolds for bone tissue engineering. **BioMed Research International**, v. 2015, ID: 729076, 2015. Doi: 10.1155/2015/729076.

VITAL, C. C. et al. Biocompatibilidade e comportamento de compósitos de hidroxiapatita em falha óssea na ulna de coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 2, p. 175-183, 2006.

WALSH, W. R. et al. Critical size bone defect healing using collagen–calcium phosphate bone graft materials. **PLoS ONE**, v.12, n. 1, p. e0168883, 2017. Doi:10.1371/journal.pone.0168883.

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

WISE, S. G.; MITHIEUX, S. M.; WEISS, A. S. Engineered tropoelastin and elastin-based biomaterials. **Advances in Protein Chemistry and Structured Biology**, v. 78, p. 1-24, 2009.

YENI, Y. N. et al. Cancellous bone properties and matrix content of TGF-beta2 and IGF-I in human tibia: a pilot study. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 467, n. 12, p. 3079-3086, 2009.

YEO, G. C. et al. Fabricated elastin. **Advances Healthcare Materials**, v. 4, n. 16, p. 2530-2556, 2015.

ZIMMERMANN, G.; MOGHADDAM, A. Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. **Injury: international journal of the care of the injured**, v. 42, Suppl. 2, p. S16-S21, 2011.

ZURA, R. et al. Bone fracture nonunion rate decreases with increasing age: A prospective inception cohort study. **Bone**, v. 95, p. 26-32, 2017.

ANEXO A - Preparação dos biomateriais.

Membrana de elastina

Cartilagem auricular bovina foi lavada com solução salina 0,9% (NaCl) e água destilada. Essa cartilagem foi tratada com uma solução alcalina (hidrólise) contendo sais (sulfatos e cloretos) e hidróxidos de metais alcalinos e alcalinos terrosos. Esse procedimento foi feito pelo Grupo de Bioquímica e Biomateriais do Instituto de Química de São Carlos – USP por adaptação da metodologia utilizada para obtenção de colágeno (HORN; MARTINS; DE GUZZI PLEPIS, 2009). As condições de hidrólise foram:

- período de 24 h a temperatura de 50 °C, ou
- período de 96 h a temperatura de 37 °C

Nos dois casos, após o período de hidrólise, a cartilagem foi equilibrada em outra solução contendo sulfatos e cloretos dos íons Na^+ , K^+ e Ca^{2+} . O excesso de sais foi removido por lavagens em solução de ácido bórico 3%, água desionizada, seguida por solução de EDTA 0,3% e água desionizada. O material resultante foi uma membrana de elastina que foi equilibrada em tampão fosfato salino pH 7,4 por 24h e depois lavada exaustivamente com água desionizada, congelada e liofilizada. A membrana de elastina foi cortada em amostras de 3 mm de diâmetro.

Síntese da Hidroxiapatita

A síntese da hidroxiapatita foi feita utilizando-se uma solução de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ a pH = 11,0 ajustado com hidróxido de amônio concentrado e uma solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. A solução de cálcio foi vigorosamente agitada e mantida sob fluxo constante de N_2 , sendo então adicionada, lentamente, a solução de fosfato, obtendo-se um precipitado de forma gelatinosa, que foi agitado durante 24 h à temperatura ambiente (JARCHO M; BOLEN, 1976).

Após este tempo, a suspensão foi decantada e o sobrenadante removido com o sólido resultante lavado com água deionizada até pH constante, sendo então a HA formada centrifugada a 4000 rpm por 15 min a 20°C, filtrada e seca em 90°C durante um período de 24 h. Após este período a HA foi triturada e peneirada obtendo-se partículas menores que 0,149 mm.

Tanto as membranas de elastina quanto a hidroxiapatita foram acondicionadas em embalagem própria para esterilização que foi feita com óxido de etileno pela empresa Acecil Central de Esterilização Com. Ind. Ltda (Campinas, SP).

Caracterização

Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC): As curvas DSC foram obtidas utilizando-se um equipamento da TA Instruments modelo, DSC – 2010, calibrado com padrão de índio. As medidas foram feitas com aproximadamente 18 mg de amostra em placas de alumínio herméticas sob atmosfera de nitrogênio (80 mL min^{-1}), razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e um intervalo de temperatura de 5 a 120°C .

Microscopia eletrônica de varredura (MEV): as fotomicrografias foram obtidas na superfície matriz colada em stubs por fita condutora de carbono e recoberta com uma fina camada de ouro de 6 nm de espessura em um metalizador Coating System BAL-TEC MED 020 (BAL-TEC, Liechtenstein) com pressão na câmara de $2,00 \times 10^{-2}$ mbar, corrente de 60 mA e taxa de deposição de $0,60 \text{ nm s}^{-1}$, possibilitando a análise de suas estruturas. Utilizou-se o equipamento ZEISS LEO 440 (Cambridge, England) com detector OXFORD (model 7060), operando com feixe de elétrons de 20 kV. Para medir o tamanho dos poros das matrizes foi utilizado o *software* ImageJ. Foram feitas 50 determinações para cada matriz utilizando uma imagem ampliada 500 vezes e aplicando a aproximação do diâmetro de Martin (ALLEN, 1997).

Resultado da caracterização

As curvas DSC (Figura 38) não mostraram transição no intervalo de temperatura estudado, sugerindo que não existe a presença de colágeno nas matrizes, como era esperado devido ao longo período de tempo (96h) de exposição do tecido biológico à hidrólise alcalina a uma temperatura de 37°C ou ainda ao intervalo curto (24h), mas com uma temperatura elevada de 50°C . Para o tecido sem hidrólise alcalina observa-se uma transição térmica a $75,2^{\circ}\text{C}$ referente à desnaturação da estrutura colagênica presente no tecido biológico.

Figura 38 - Curvas DSC para as matrizes com e sem tratamento alcalino.

As matrizes foram caracterizadas por MEV e mostram em ambos os casos uma superfície rugosa com a presença de grande quantidade de poros (Figuras 39 e 40).

Figura 39 - MEV da matriz de elastina após hidrólise alcalina por 24 h à 50°C.

Fotomicrografias com aumentos de 200 e 1000 vezes.
Fonte: próprio autor.

Figura 40 - MEV da matriz de elastina após hidrólise alcalina por 96 h à 37°C.

Fotomicrografias com aumentos de 200 e 1000 vezes.

Fonte: próprio autor.

Os diâmetros dos poros foram medidos nas fotomicrografias por MEV utilizando uma aproximação do diâmetro de Martin (ALLEN, 1997), para as matrizes com a imagem ampliada de 500 vezes (Figura 41).

Figura 41 - Representação do diâmetro de Martin.

Fonte: (ALLEN, 1997)

Esses poros têm tamanhos irregulares e distribuídos de forma desorganizada. Contudo, para a membrana E24/50 que tem um menor tempo de hidrólise, mesmo com uma temperatura maior, os poros são menores do que os encontrados para a matriz de E96/37 como pode ser observado nas Figuras 39 e 40 e Tabela 2.

Tabela 2. Tamanho de poros ($\mu\text{m} \pm \text{DP}$) das matrizes.

Matriz	Tamanho poro (μm)	DP ^a	Menor tamanho (μm)	Maior tamanho (μm)
E24/50	26,41	9,55	12,29	68,47
E96/37	36,50	11,25	17,33	76,00

a – desvio padrão;

ANEXO B - Carta de Aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Jundiaí

Autoria Municipal criada por Lei Municipal Nº 1506 de 12 de março de 1966 - C.N.P.J. Nº 50.985.266/0001-09
Reconhecimento Federal Decreto Nº 71656 de 04/01/1973

R. Francisco Telles, 250 - CEP: 13202-550 - Cx. Postal: 1109

Fone/Fax: (11) 3395-2100 - Jundiaí - SP - site: www.fmj.br - e-mail: fmj@fmj.br

COMITÊ DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS

Jundiaí, 22 de janeiro de 2018

Ilustríssimo Senhor
MARCELO RODRIGUES DA CUNHA

Ref.: Aprovação de Projeto de Pesquisa

TÍTULO: "Capacidade osteorregenerativa da elastina, hidroxiapatita e proteína morfogenética óssea no tratamento de defeitos femorais em ratos"

Prezado Pesquisador

O Comitê de Ética para Uso de Animais – CEUA desta Faculdade, em reunião no dia 07 de abril de 2015, no cumprimento de suas atribuições e após revisão ao seu protocolo de pesquisa em epígrafe, emitiu o parecer APROVANDO o seguinte documento:

>> Protocolo para Uso de Animais em Pesquisa nº 61/2015

Lembramos a V.Sa. que é necessário enviar a este CEUA relatórios de eventos adversos, caso estes venham a ocorrer, assim como relatório final com os resultados da pesquisa, para finalização do processo. Quaisqueis dúvidas estamos à disposição.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Evaldo Marchi
Coordenador de Pós Graduação e Pesquisa

ANEXO C - Análise estatística comparativas intergrupos dos resultados morfométricos

Demonstrativo das diferenças estatísticas obtidas na comparação dos resultados entre G1 a G7. Extraído do software BioEstat versão 5.3.