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

Fernando Bento Cunha

Estudo comparativo de membrana serosa porcina e de elastina no
reparo de defeitos na calvária de ratos

São Carlos

2018

FERNANDO BENTO CUNHA

Estudo comparativo de membrana serosa porcina e de elastina no
reparo de defeitos na calvária de ratos

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

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Rodrigues da Cunha
Área de Concentração: Bioengenharia

São Carlos
2018

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

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

B972e Bento Cunha, Fernando
Estudo comparativo de membrana serosa porcino e de elastina no reparo de defeitos na calvária de ratos / Fernando Bento Cunha; orientador Marcelo Rodrigues da Cunha. São Carlos, 2018.

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

1. Elastina. 2. colágeno. 3. hidroxiapatita. 4. proteína morfogenética óssea. 5. regeneração óssea . I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato(a): Fernando Bento Cunha

Título: “ Estudo comparativo de membrana serosa porcina e de elastina no reparo de defeitos na calvária de ratos”

Data da defesa: 15/10/2018

Comissão Julgadora	Assinatura	Resultado
Prof(a). Dr(a). Marcelo Rodrigues da Cunha Faculdade de Medicina de Jundiaí		<u>— " —</u>
Prof(a). Dr(a). Ana Maria de Guzzi Plepis IQSC/USP		<u>aprovado</u>
Prof(a). Dr(a). Itibagi Rocha Machado Faculdade de Medicina de Jundiaí		<u>aprovado</u>
Prof(a). Dr(a). Arnaldo Rodrigues Santos Junior Universidade Federal do ABC		<u>APROVADO</u>

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

*Á minha esposa Renata, pela compreensão, amor, carinho e apoio em todos os
momentos.*

*Aos meus queridos pais Vagner e Renata pela educação e os ensinamentos dos
bons costumes que sigo.*

Á minha querida irmã Daniela, pela presença nos bons momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Itibagi Rocha Machado pela contribuição na minha formação profissional e incentivo pela vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. Marcelo Rodrigues da Cunha pela orientação, sabedoria, paciência e incentivos ao longo da execução do trabalho.

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 Marcelo Munhoz, Eduardo Gomes Machado e Renato de Moraes por participar com o melhor espírito de grupo neste estudo e auxílio nos procedimentos cirúrgicos dos animais.

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

RESUMO

CUNHA, F.B. **Estudo comparativo de membrana serosa porcina e de elastina no reparo de defeitos na calvária de ratos**. 2018. 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

As patologias que provocam perdas ósseas extensas ainda, utilizam o enxerto ósseo autólogo como tratamento padrão-ouro. Contudo, devido a limitação quantitativa, apresentam-se como alternativa o uso de biomateriais de elastina e colágeno da serosa do intestino porcino com hidroxiapatita, bem como a associação com a proteína morfogenética óssea em terapias regenerativas do tecido ósseo. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial osteogênico de matrizes poliméricas naturais à base de elastina derivada da cartilagem auricular bovina e colágeno da serosa de intestino porcino, utilizadas isoladamente ou em associação a hidroxiapatita e proteína morfogenética óssea, no reparo de defeitos ósseos no crânio de ratos. Foram utilizados 63 ratos (*Rattus norvegicus*, *Wistar*), machos, com peso aproximado de 360 gramas e 16 semanas de idade. Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para a criação do defeito ósseo no osso parietal esquerdo e divididos em 7 grupos com 09 animais cada. Os grupos foram implantados com os seguintes biomateriais: grupo 1 controle (G1-C) sem implante, grupo 2 (G2-E24/37) membrana de elastina tratada 24h a 37°C, grupo 3 (G3-E24/37/HA) membrana de elastina tratada 24h a 37°C e hidroxiapatita, grupo 4 (G4-E24/37/BMP) membrana de elastina tratada 24h a 37°C e proteína morfogenética óssea, grupo 5 (G5-SIP24/25) membrana colágeno da serosa intestino porcino tratada 24h a 25°C, grupo 6 (G6-SIP24/25/HA) membrana colágeno da serosa intestino porcino tratada 24h a 25°C e hidroxiapatita, grupo 7 (G7-SIP24/25/BMP) membrana colágeno da serosa intestino porcino tratada 25°C e proteína morfogenética óssea. Após a morte indolor induzida em 6 semanas, as peças anatómicas das calotas cranianas foram retiradas para análise macroscópica, radiológica, histológica e morfométrica. Resultados: As análises macroscópicas, radiográficas e histológicas demonstraram a biocompatibilidade dos biomateriais utilizadas. As médias e desvios-padrão do volume percentual relativo de osso neoformado no defeito craniano do grupo controle (G1), dos grupos enxertados com membrana de elastina 24h/37°C (G2 a G4) e dos grupos enxertados com membrana de serosa de intestino porcino 24h/25°C (G5 a G7), foram: 5,86±2,87; 13,68±1,44; 17,65±1,85; 29,46±3,21; 53,20±4,46; 30,45±4,12; 38,47±5,32, respectivamente. Os biomateriais mostraram-se biocompatíveis e o grupo 5 (G5-SIP24/25) apresentou a maior neoformação óssea.

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

ABSTRACT

CUNHA, F.B. **Comparative study of porcine serous membrane and elastin in the repair of defects in calvaria of rats**. 2018. 117 f. Dissertation (Master in Sciences) - São Carlos School of Engineering and Ribeirão Preto Medical School and São Carlos Institute of Chemistry of the University of São Paulo, São Carlos, 2018.

Introduction: Pathologies that cause extensive bone loss still use autologous bone graft as the gold standard treatment. However, due to quantitative limitation, the use of elastin biomaterials and porcine intestinal serosa collagen with hydroxyapatite, as well as the association with bone morphogenetic protein in regenerative bone tissue therapies are presented as alternatives. **Objectives:** To evaluate the osteogenic potential of natural polymer matrices based on elastin derived from bovine auricular cartilage and porcine gut serosa collagen, used alone or in combination with hydroxyapatite and bone morphogenetic protein, in the repair of bone defects in the skull of rats. **Materials and Methods:** 63 male rats (*Rattus norvegicus*, Wistar) weighing approximately 360 grams and 16 weeks of age were used. The animals were submitted to the surgical procedure to create the bone defect in the left parietal bone and were divided into 7 groups with 9 animals each. The groups were implanted with the following biomaterials: group 1 control (G1-C) without implant, group 2 (G2-E24 / 37) elastin membrane treated for 24h at 37 ° C, group 3 (G3-E24 / 37 / HA) elastin membrane treated for 24h at 37 ° C and hydroxyapatite, group 4 (G4-E24 / 37 / BMP) elastin membrane treated 24 h at 37 ° C and bone morphogenetic protein, group 5 (G5- SIP24/25) porcine intestinal serosa collagen membrane treated for 24h at 25° C, group 6 (G6- SIP24/25/ HA) porcine intestinal serosa collagen membrane treated for 24h at 25° C and hydroxyapatite, group 7 (G7- SIP24/25 / BMP) porcine intestinal serosa collagen membrane treated for 24h at 25° C and bone morphogenetic protein. After painless death induced in 6 weeks, the anatomical parts of the skull caps were removed for macroscopic, radiological, histological and morphometric analysis. **Results:** Macroscopic, radiographic and histological analyzes demonstrated the biocompatibility of the biomaterials used. The mean and standard deviations of the relative percentage volume of newly formed bone in the cranial defect of the control group (G1), the grafted groups with the elastin membrane 24h / 37 ° C (G2 to G4) and the grafted groups with the porcine intestinal serosa collagen membrane 24h / 25 ° C (G5 to G7) were: 5,86 ± 2,87; 13,68 ± 1,44; 17,65 ± 1,85; 29,46 ± 3.21; 53,20 ± 4,47; 30,45 ± 4,12; 38,47 ± 5,32, respectively. **Conclusion:** Biomaterials were biocompatible and group 5 (G5-SIP24/25) showed the greatest bone neoformation.

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mostra os biomateriais utilizados	32
Figura 2 - Representação esquemática do planejamento experimental.....	34
Figura 3 - Procedimento cirúrgico e enxertia no osso parietal esquerdo.....	36
Figura 4 - Demonstrativo macroscópico da amostra experimental.....	37
Figura 5 - Sequência de injeção de marcadores fluorocromáticos.....	40
Figura 6 - Planos de corte transversais da calota craniana de ratos.....	41
Figura 7 - Quantificação morfométrica da área experimental e neoformação óssea	42
Figura 8 - Fotografias das peças anatômicas.....	46
Figura 9 - Radiografias das peças anatômicas	47
Figura 10 - Fotomicroscopias de G1 a G7 com Tricrômio de Masson	49
Figura 11 - Fotomicroscopias de G1 a G7 com Picrosirius Red.....	50
Figura 12 - Fotomicroscopias de G1 a G7 com Fluorescência Óssea	51
Figura 13 - Fotomicroscopias de G1 a G7 com Von Kossa	52
Figura 14 - Fotomicroscopias de G1 (Controle) com Tricrômio de Masson	54
Figura 15 - Fotomicroscopias de G1 (Controle) com Picrosirius Red.....	55
Figura 16 - Fotomicroscopias de G1 (Controle) com fluorescência óssea	56
Figura 17 - Fotomicroscopias de G1 (Controle) com Von Kossa	57
Figura 18 - Fotomicroscopias de G2-E24h/37°, com Tricrômio de Masson	59
Figura 19 - Fotomicroscopias de G2 - E24h/37°, com Picrosirius Red.....	60
Figura 20 - Fotomicroscopias de G2 - E24h/37° com Fluorescência Óssea	61
Figura 21 - Fotomicroscopias de G2 – E24h/37°, com Von Kossa.....	62
Figura 22 - Fotomicroscopias de G3 - E24h/37° + HA, com Tricrômio de Masson ...	64
Figura 23 - Fotomicroscopias de G3 - E24h/37°+ HA, com Picrosirius Red.....	65
Figura 24 - Fotomicroscopias de G3 - 24h/37° + HA, com Fluorescência Óssea	66
Figura 25 - Fotomicroscopias de G3 – E24h/37°+HA, com Von Kossa	67
Figura 26 - Fotomicroscopias de G4 - E24h/37°+ BMP, com Tricrômio de Masson .	69
Figura 27 - Fotomicroscopias de G4 - E24h/37°+ BMP, com Picrosirius Red.....	70
Figura 28 - Fotomicroscopias de G4 - E24h/37°+ BMP, com Fluorescência Óssea .	71
Figura 29 - Fotomicroscopias de G4 –E24h/37° + BMP, com Von Kossa.....	72
Figura 30 - Fotomicroscopias de G5 – SIP24h/25°, com Tricrômio de Masson	74
Figura 31 - Fotomicroscopias de G5 – SIP24h/25°, com Picrosirius Red	75
Figura 32 - Fotomicroscopias de G5 – SIP24h/25°, com Fluorescência Óssea.....	76
Figura 33 - Fotomicroscopias de G5 – SIP24h/25°, com Von Kossa	77
Figura 34 - Fotomicroscopias de G6 - SIP24h/25°+HA, com Tricrômio de Masson..	79
Figura 35 - Fotomicroscopias de G6 - SIP24h/25°+HA, com Picrosirius Red	80
Figura 36 - Fotomicroscopias de G6 - SIP24h/25°+HA, com Fluorescência Óssea..	81
Figura 37 - Fotomicroscopias de G6 - SIP24h/25°+HA, com Von Kossa	82
Figura 38 - Fotomicroscopias de G7 - SIP24h/25° + BMP, com Tricrômio de Masson	84
Figura 39 - Fotomicroscopias de G7 - SIP24h/25° + BMP, com Picrosirius Red	85
Figura 40 - Fotomicroscopias de G7 - SIP24h/25° + BMP, com Fluorescência Óssea	86
Figura 41 - Fotomicroscopias de G7 - SIP24h/25° + BMP, com Von Kossa	87
Figura 42 - Análise morfométrica do percentual relativo de osso neoformado dos grupos G1 a G7	88
Figura 43 - Comparativo das diferenças estatísticas entre os grupos G1 a G7	89

Figura 44 - Fotomicrografias por MEV para Matriz de elastina após tratamento alcalino a 37°C. Aumento de 200 e 1000 vezes.....	117
Figura 45 - Fotomicrografias por MEV para Matriz de serosa porcina após tratamento alcalino a 25°C. Aumento de 200 e 1000 vezes.....	118

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Alz	Alizarina
BMP	Proteína Óssea Morfogenética
rhBMP	Proteínas ósseas morfogenéticas recombinante humana
Ca	Calceína
CEUA	Comitê de Ética para Uso de Animais
TCP	b-trifosfato de cálcio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E	Elastina
ELP	Polipeptídeos semelhantes a elastina
FMJ	Faculdade de Medicina de Jundiaí
HA	Hidroxiapatita
MEC	Matriz extracelular
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
O	Osso original
pH	Potencial hidrogeniônico
PO	Pós-operatório
PSR	Picrosirius Red
SIS	Submucosa do intestino porcino
SIP	Serosa do intestino porcino
TC	Tecido conectivo
TGF-b	Fatores de crescimento beta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	Terapias regenerativas	21
1.2	Hidroxiapatita	22
1.3	Proteína morfogenética óssea	23
1.4	Polímeros	24
1.4.1	<i>Elastina</i>	25
1.4.2	<i>Colágeno da serosa do intestino porcino</i>	27
2	OBJETIVOS	29
2.1	Objetivo Geral	29
2.2	Objetivos específicos	29
3	MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1	Preparo dos biomateriais	31
3.2	Planejamento experimental	32
3.3	Técnica cirúrgica da criação do defeito craniano do rato	35
3.4	Sutura dos tecidos e medicação	36
3.5	Morte indolor induzida dos animais e remoção das áreas cirúrgicas	37
3.6	Análise macroscópica	37
3.7	Análise radiológica	38
3.8	Processamento histológico das amostras da área cirúrgica	38
3.9	Análise histológica por microscopia de luz transmitida (óptica)	39
3.10	Análise histológica por microscopia de luz polarizada	39
3.11	Análise histológica por microscopia de fluorescência	39
3.12	Análise histológica da mineralização pelo método de Von Kossa	40
3.13	Análise morfométrica	41
3.14	Análise estatística	43
4	RESULTADOS	45
4.1	Análise macroscópica	45
4.2	Análise radiológica	46
4.3	Análise histológica	47
4.3.1	<i>Histologia do G1 (G1-Controle)</i>	53
4.3.2	<i>Histologia do G2 (G2-E24h/37° + HA)</i>	58
4.3.3	<i>Histologia do G3 (G3-E24h/37° + HA)</i>	63
4.3.4	<i>Histologia do G4 (G4- E24h/37° + BMP)</i>	68
4.3.5	<i>Histologia do G5 (G5-SIP24h/25°)</i>	73
4.3.6	<i>Histologia de G6 (G6-SIP24h/25° + HA)</i>	78

4.3.7	<i>Histologia de G7 (G7-SIP24h/25° + BMP)</i>	83
4.4	Análise Morfométrica.....	88
4.5	Análise Estatística.....	89
5	DISCUSSÃO.....	91
5.1	Biocompatibilidade	91
5.2	Biodegradabilidade.....	92
5.3	Osteoregeneração.....	94
5.3.1	<i>Capacidade osteorregenerativa da elastina</i>	95
5.3.2	<i>Capacidade osteorregenerativa do colágeno</i>	96
5.3.3	<i>Comparação da capacidade osteorregenerativa entre colágeno x elastina</i>	98
6	CONCLUSÕES.....	101
	REFERÊNCIAS.....	102
	ANEXO A - Preparação dos biomateriais	115
	ANEXO B - Carta de Aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Jundiaí	119

1 INTRODUÇÃO

1.1 Terapias regenerativas

A crescente ocorrência de desordens ósseas como fraturas cominutivas de alta energia, deformidades congênitas, neoplasias tumorais que necessitam de ressecções cirúrgicas extensas ou ainda por sequela de infecções ósseas como na osteomielite, estimularam a busca por novos métodos clínicos de terapias reconstrutivas (TANG et al., 2017). O tratamento destas perdas ósseas extensas, geralmente exigem uma abordagem cirúrgica especializada visto que a regeneração óssea natural pode ser de difícil solução (RODEO et al., 2013; QUINNAN, 2017). Nestes casos, podem ser utilizados como auxiliares do processo de reparo ósseo, os enxertos autólogos, homólogos, xenoenxertos e enxertos periostais (FINKEMEIER, 2002; LAURECIN; JIANG, 2014).

O enxerto autólogo ainda permanece como padrão ouro e apresenta as características ideais para regeneração óssea como a osteogênese, osteoindução e osteocondução necessárias para formação, crescimento e regeneração óssea (STOCK; VACANTI, 2001; DIMITRIOU et al., 2011; EGOL et al., 2015). Os enxertos homólogos e heterólogos tem grande disponibilidade, mas podem desenvolver resposta imunogênica, ausência de capacidade osteogênica e risco de transmissão de doenças infecto contagiosas como HIV e hepatite (ZIMMERMANN; MOGHADDAM, 2011; BILLSTRÖM et al., 2013). Desta maneira a engenharia de tecidos tem avançado nas pesquisas com biomateriais como substitutos ósseos visto sua grande disponibilidade, ausência de imunogenicidade, proliferação celular e biodegradação simultânea com neoformação óssea (HAK, 2007; GROSS et al., 2012; ORYAN et al., 2014). Além disso, os biomateriais têm sido desenvolvidos e aperfeiçoado para alcançar outras funções ideais para a formação óssea além da biocompatibilidade, que é a osteoindução, caracterizando assim a sua biofuncionalidade (SPRIO et al., 2016; ORCIANI et al., 2017).

A osteoindução é o processo pelo qual a osteogênese é induzida e envolve a formação de novo osso a partir do recrutamento de células mesenquimais e sua diferenciação em células osteoprogenitoras. A osteocondução é a capacidade do material em conduzir o desenvolvimento de novo tecido ósseo através de sua matriz de suporte (arcabouço). A osteogênese é o processo pelo qual as células ósseas vivas e remanescentes no enxerto mantêm a capacidade de formar matriz óssea (KHAN et al., 2005; HORNER et al., 2010). Alguns biomateriais e substância que apresentam essas características osteoregenerativas vêm ganhando destaque nas terapias regenerativas do tecido ósseo e dentre elas há as cerâmicas, proteínas ósseas e polímeros (TANG et al., 2017).

As cerâmicas estão presentes em diversos biomateriais, incluindo sulfato de cálcio, vidro bioativo, fosfato de cálcio, a hidroxiapatita e o b-trifosfato de cálcio (b-TCP). A utilização destes materiais consiste em que o componente inorgânico primário do osso é a hidroxiapatita (HA). (JANICKI; SCHMIDMAIER, 2011; GROVER; CAMERON; BEST, 2012; LAURECIN; JIANG, 2014).

1.2 Hidroxiapatita

A hidroxiapatita (HA) tem sido utilizada como biomaterial de substituição há mais de três décadas apresentando uma das formas mais estáveis de fosfato de cálcio, com características da composição química $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$ muito próxima à fase mineral do osso (CUNHA, 2001; GERMAINI et al., 2017). Apesar de não ter atividade osteogênica e osteoindutora, demonstra importante função osteocondutora e ainda, devido sua similaridade a matriz óssea torna-se biocompatível, justificando assim seu uso frequente nas cirurgias de reconstrução óssea (VITAL et al., 2006; SOPYAN et al., 2007; JANG et al., 2017).

A hidroxiapatita pode ser utilizada de diversas formas e tamanhos como em grânulos, blocos ou cunhas pré-formadas, podendo ser densas ou porosas (HIXON et al., 2017). A porosidade e o tamanho dos poros podem variar entre 200 e 500µm, algo que tem despertado interesse pela sua capacidade de permitir a proliferação

celular óssea e vascular. Entretanto, a maior tamanho dos poros está diretamente ligado ao aumento do tempo para a sua reabsorção (CHEN et al., 2017; COMÍN et al., 2017; RYABENKOVA et al., 2017).

Os biomateriais cerâmicos mais utilizados como substitutos aos enxertos ósseos são a HA e o beta tricálcio fosfato. As principais fontes da hidroxiapatita provêm da forma natural dos corais, por desproteinização de tecidos ósseos de animais e também por formulações sintéticas (SOPYAN et al., 2007; LEBRE et al., 2017). Entretanto, alguns aspectos negativos da HA estão relacionados a falta de capacidade mecânica de absorção de cargas e quanto ao custo elevado na produção. Outro aspecto relevante é a ausência da capacidade osteoindutiva ou osteogênica por si própria, sendo sua principal característica servir como arcabouço para crescimento de tecido vascular e ósseo (VITAL et al., 2006; SOPYAN et al., 2007; ZIMMERMANN; MOGHADDAM, 2011).

Na engenharia de tecidos, a HA também vem sendo usada no revestimento das hastes de próteses e parafusos para melhora da fixação implante-osso. A fim de potencializar o efeito osteoregenerativo da HA, pode ser usada como um substrato para o crescimento ósseo através da sua associação com as proteínas ósseas morfogenéticas (*Bone Morphogenetic Protein – BMP*) (HAIDER et al., 2015; RAINA et al., 2018).

1.3 Proteína morfogenética óssea

As proteínas ósseas morfogenéticas (BMP) são glicoproteínas bioativas que estão presentes naturalmente no tecido ósseo e desempenham um papel importante na osteogênese, atuando na proliferação e diferenciação de células tronco mesenquimais em osteoblastos para remodelação óssea (HAIDER et al., 2015; RAHMAN et al., 2015; GARG et al., 2017).

As BMPs pertencem a superfamília dos fatores transformadores de crescimento beta (TGFB) e compreendem pelo menos vinte fatores de crescimento divididas em subclasses baseadas em sua estrutura. As que demonstram potencial osteogênico são as BMPs-2, 4, 6, 7 e 9 (MITHIEUX; WEISS, 2005; BLOKHUIS;

LINDNER, 2008; GIANNOUDIS; DINOPOULOS, 2010; GROVER; CAMERON; BEST, 2012; MUMCUOGLU et al., 2018).

Para reparação de defeitos ósseos estão disponíveis as BMP- 2 e BMP-7, sendo a primeira a mais utilizada que é encontrada na forma de recombinante humana (rhBMP-2) (EL BIALY; JISKOOT; NEJADNIK, 2017). É necessário a utilização de um carreador no lugar a ser estimulado para reparação óssea, pois a BMP tem que ser mantida no local da falha óssea até que a cascata de diferenciação dos osteoblastos e a osteogênese tenham iniciado (MACHADO et al., 2015; JUNG et al., 2017). A BMP-2 atua na diferenciação celular e remodelação óssea, o que a credencia para a utilização em lesões complexas, artrodese de coluna e pseudoartroses (ORTH et al., 2017).

No entanto, as BMPs têm uma meia vida muito curta e podem perder rapidamente a sua bioatividade. Assim, é necessário um sistema de liberação de BMP propiciando um efeito osteoindutivo para a diferenciação osteogênica (JUNG et al., 2017). Dentre os carreadores comumente utilizados para as BMPs estão os polímeros e as esponjas de colágeno e elastina (MACHADO et al., 2015; ORTH et al., 2017). O bom funcionamento da BMP também está relacionada as capacidades do carreador utilizado em apresentar algumas características como a biocompatibilidade, biodegradabilidade e porosidade que são essenciais para a adesão e crescimento celular. (GARRISON et al., 2010; SCHLIEPHAKE, 2010; LI et al., 2015; PAPANAGIOTOU et al., 2015; SHEIKH et al., 2015).

A velocidade de biodegradação do carreador pode ser um fator importante na eficácia da atividade da BMP, podendo ser muito rápida ou muito lenta em relação a formação óssea no local e interferindo negativamente na sua ação (ISSA et al., 2008; GIANNOUDIS; DINOPOULOS, 2010; GROVER; CAMERON; BEST, 2012; RAHMAN et al., 2015).

1.4 Polímeros

Os polímeros representam uma classe importante dos biomateriais na engenharia de tecidos, podendo ser naturais ou sintéticos. Eles são produtos

formados pela união de diversas moléculas de cadeia longa (monômeros). Além da biocompatibilidade, devem ser também bioinertes, biodegradáveis e bioabsorvíveis para facilitar a regeneração óssea (MOREIRA et al., 2013). Dentre os polímeros naturais, há os derivados de elastina e colágeno que podem apresentar diversas formas e densidades diferentes, podendo atuar de maneira isolada ou associados a outros materiais para potencializar a reparação óssea (MOREIRA et al., 2013; JAHAN; TABRIZIAN, 2016).

Os polímeros atuam na estrutura tecidual e na regulação do fenótipo celular por simular a matriz extracelular. O objetivo final da utilização destes materiais sintéticos ou naturais é a obtenção da osteointegração, que se caracteriza pela degradação do biomaterial implantado concomitante com a neoformação óssea, sem a presença de tecido conjuntivo interposto (KÖNIG JÚNIOR, 2010; GAO et al., 2017). A matriz extracelular artificial pode simular o espaço intersticial dos tecidos vivos permitindo a adesão celular e servindo como suporte para crescimento de novo tecido e guia para o desenvolvimento e diferenciação de novos tipos celulares (CUNHA, 2006; MOREIRA et al., 2013)

As matrizes de colágeno ainda têm a vantagem de sofrer modificações quando submetidas ao tratamento alcalino que causa hidrólise seletiva de cadeias carboxiamidas de asparagina e glutamina, ocorrendo um aumento de cargas negativas superficiais na molécula e assim, elevando as propriedades piezoelétricas com a finalidade de aumentar sua capacidade osteogênica. Além disso, esse tratamento transforma a matriz nativa em uma estrutura porosa e ainda, promove a remoção das células que poderiam provocar rejeição imunológica (HORN; MARTINS; PLEPIS, 2009).

1.4.1 Elastina

Materiais à base de elastina estão se tornando cada vez mais habituais na Engenharia de Tecidos devido as suas características como a elasticidade, estabilidade a longo prazo e a sua atividade biológica. Podem ser utilizadas de

diversas formas e associada a outros polímeros, sendo seu processo de preparo alterado de acordo com a finalidade (DAAMEN et al., 2007; YEO et al., 2015).

A elastina é uma proteína presente na matriz extracelular com a característica principal a elasticidade, presente mais em vasos sanguíneos, ligamentos e pele (MUNHOZ, 2013; OZSVAR et al., 2015). A formação é através de ligações cruzadas do seu monômero precursor tropoelastina, formando um arcabouço tridimensional. (BELLINGHAN; KEELEY, 2004; GROVER; CAMERON; BEST, 2012). Algumas características da elastina a credenciam para utilização como biomaterial: estabilidade estrutural, elasticidade, bioatividade e automontagem (YEO et al., 2015; RAGNONI et al., 2016).

Os biomateriais a base de elastina provém da extração natural de enxertos, principalmente de origem animal e mais recentemente utilizando a terapia recombinante e a produção sintética (YEO et al., 2015). As fontes da elastina ou tropoelastina podem ser provenientes de: ligamento nugal equino ou bovino, grandes vasos (MOCZAR; MOCZAR; ROBERT, 1979), pavilhão auricular bovino (NASCIMENTO et al., 2012) e membrana de pericárdio equino e bovino (ROCHA et al., 2006)

Biopolímeros artificiais contendo elastina são denominados elastin-like peptides (ELPs), apresentando 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 (URRY; PATTANAIK, 1997; AMRUTHWAR; JANORKAR, 2013).

Algumas propriedades da elastina ainda continuam incertas, como a tendência de calcificação apresentados em próteses cardíacas. Essa característica despertou interesse para a utilização dessa membrana na regeneração óssea somando o fato de ser biocompatível e biodegradável. Outro fato que a sua utilização a torna muito favorável e aceleradora na regeneração óssea é a sua característica de reduzir a formação de fibrose e diminuir a resposta inflamatória (DAAMEN et al., 2007; CUNHA et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2012).

Os biomateriais a derivados da elastina são produzidos em forma de gel, partículas, fibras, tubos, folhas e filmes, podendo ser utilizados para revestimento e regeneração de enxertos de nervos periféricos ou como enxertos de pele, osso e cartilagem (HSUEH et al., 2014; XIE et al., 2017; ZHU et al., 2017).

1.4.2 Colágeno da serosa do intestino porcino

O colágeno é uma da proteína fibrosa insolúvel encontrada nos tecidos conjuntivos e de matriz extracelular, sendo responsável pela conformação estrutural inicial dos tecidos. É a proteína mais abundante do organismo humano e representa 70% do peso seco do tendão e pele. No osso, 90% da matriz extracelular é de colágeno apresenta estrutura em tripla hélice de três cadeias polipeptídicas denominadas cadeias alfa e esta conformação da proteína justifica as propriedades físicas e biológicas do colágeno, que são geralmente capazes de proporcionar rigidez, força e estabilidade (CUNHA et al., 2008; MOREIRA et al., 2013).

Atualmente muito se sabe sobre o colágeno derivado do intestino bovino e a literatura apresenta ampla casuística da submucosa do intestino porcino (SIS). A matriz descelularizada da SIS tem atraído uma atenção especial para a regeneração de tecidos, pois apresenta efeitos angiogênicos e retém abundantes componentes bioativos (LI et al., 2017; SUN et al., 2018). Porém, pouco se sabe sobre a serosa do intestino porcino.

A membrana da serosa de intestino porcino tem se mostrado um biomaterial com boa afinidade celular e elasticidade devido a presença de colágeno na sua estrutura. Essas características somada a sua matriz tridimensional que gera um meio para o crescimento celular, propiciam a utilização da membrana no processo de remodelação cicatrização (HIRATA et al., 2015; BOLAÑOS et al., 2017).

O tratamento alcalino, que causa hidrólise seletiva nas cadeias carboxiamidas de aspargina e glutamina, aumenta o número de cargas negativas superficiais na molécula do colágeno, elevando as propriedades piezoelétricas do colágeno com importante função osteogênica (HORN; MARTINS; PLEPIS, 2009; HIRATA et al., 2015). A membrana de colágeno é um material que tem demonstrado capacidade de potencializar a angiogênese durante sua biodegradação, baixa imunogenicidade e com importante função carreadora para proteínas indutoras de osso (RONG et al., 2015; LI et al., 2017). O biomaterial a base de colágeno possui algumas vantagens como a apresentação em diversas formas, como as membranas, esponjas e esferas, porém seu custo de purificação ainda é elevado (ROCHA et al., 2004).

Estudos utilizando colágeno de osso desmineralizado juntamente com hidroxiapatita em defeitos osseos, mostraram que essa combinação demonstrou a membrana como um excelente material osteoindutivo. Observam-se também osteoindução quando células osteogênicas foram colocadas na matriz de colágeno associado com a BMP. A utilização de carreador de colágeno associado a BMP-2 mostrou-se necessário 30 vezes menos quantidade da proteína (QUINLAN et al., 2015; SHEIKH et al., 2015).

Atualmente diversos biomateriais que apresentam capacidade osteoregenerativa estão sendo estudados, destacando as membranas poliméricas derivadas de elastina, serosa do intestino porcino, hidroxiapatita e BMP, devido as propriedades físico-químicas e arranjo estrutural, que notadamente fornecem arcabouço adequado para adesão, proliferação e crescimento de um novo tecido. No entanto, a literatura descreve amplamente o uso isolado da BMP e hidroxiapatita, mas pouco sobre a associação com membranas de elastina e serosa de intestino porcino para regeneração óssea (DAAMEN et al., 2007; SOPYAN et al., 2007; HORN; MARTINS; PLEPIS, 2009; PRAKASAM et al., 2017; WALSH et al., 2017).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar de forma qualitativa e quantitativa a contribuição das membranas de elastina e de colágeno associadas ou não a hidroxiapatita e proteína morfogenética óssea no processo de consolidação em defeitos provocados na calvária de ratos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a biocompatibilidade dos biomateriais e proteínas ósseas utilizados no reparo de defeitos cranianos em ratos através da análise clínica das condições macroscópicas, radiográficas e microscópicas da área cirúrgica;
- Determinar a reabsorção dos biomateriais simultaneamente ao processo de osteogênese na área cirúrgica;
- Caracterizar a morfologia do tecido ósseo neoformado na área da lesão;
- Estabelecer qual biomaterial isolado ou combinado apresenta melhor capacidade quanto ao estímulo do processo de reparo ósseo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparo dos biomateriais

As matrizes de elastina da cartilagem auricular bovina e colágena da serosa de intestino porcino assim como hidroxiapatita foram confeccionadas e fornecidos pela profa. Dra. Ana Maria Guzzi Plepis e Dra. Virginia Conceição Amaro Martins, Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (IQSC). A BMP comercial utilizada foi a *recombinant human* BMP-2 μg (R&D system inc., Minneapolis, MN, USA) (Figura 1).

A membrana de elastina foi lavada com solução salina 0,9% (NaCl) e água destilada e imerso em uma solução alcalina (hidrólise) por um período de 24 h a temperatura de 37°C (HORN; MARTINS; PLEPIS, 2009). A membrana de colágeno da serosa de intestino porcino sofreu o mesmo processo, porém com um período de 24h a 25°C , (Anexo A).

Figura 1 - Mostra os biomateriais utilizados

Fonte: Próprio autor. **(A)** Hidroxiapatita em grânulos finos; **(B)** Imagem macroscópica da matriz de elastina 24h 37°C **(C)** Proteína óssea morfogenética; **(D)** Eletrofotomicrografias por Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV - da matriz de elastina 24h 37°C em aumento 200X **(E)** MEV da membrana da serosa de intestino porcino.

3.2 Planejamento experimental

Utilizou-se 63 ratos machos da espécie *Ratus norvegicus* - Wistar, com 16 semanas de idade e aproximadamente 360 gramas de peso corpóreo, fornecidos pelo IPEN (Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares). Os animais foram alojados no Biotério da Faculdade de Medicina de Jundiaí em temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e ciclo claro/escuro de 12/12 horas e permaneceram em gaiolas com maravalha, recebendo ração balanceada (purina) e água *ad-libitum*. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética para uso de animais da Faculdade de Medicina de Jundiaí protocolo nº 56/2015. (Anexo B)

Os animais foram alocados em 7 grupos com 9 animais cada, conforme a seguir (Figura 2):

Grupo 1 (G1-C): Defeito no calvaria e sem enxerto;

Grupo 2 (G2-E24h/37°): Defeito no calvaria e com membrana elastina tratada 24h a 37°C;

Grupo 3 (G3-E24h/37° + HA): Defeito no calvaria e com membrana elastina tratada 24h a 37°C e associada a hidroxiapatita;

Grupo 4 (G4-E24h/37° + BMP): Defeito no calvaria e com membrana elastina tratada 24h a 37°C e associada a BMP;

Grupo 5 (G5-SIP24h/25°): Defeito no calvaria e com membrana colágeno da serosa do intestino porcino tratada 24h a 25°C;

Grupo 6 (G6-SIP24h/25° + HA): Defeito no calvaria e com membrana colágeno da serosa do intestino porcino tratada 24h a 25°C e associada a hidroxiapatita;

Grupo 7 (G7-SIP24h/25° + BMP): Defeito no calvaria e com membrana colágeno da serosa do intestino porcino tratada 24h a 25°C e associada BMP.

Figura 2 - Representação esquemática do planejamento experimental

Fonte: Próprio autor.

3.3 Técnica cirúrgica da criação do defeito craniano do rato

Inicialmente, os animais foram anestesiados com a solução anestésica de Coopazine (Xylazina) como sedativo, analgésico e relaxante muscular e Dopalen (Ketamina) como anestésico geral, fornecido pela Agronova- Jundiaí, SP, Brasil, na proporção de 1:1 e na dose de 0,10 mg / 100 gramas de massa corpórea, via intramuscular glútea (CUNHA et al., 2008). Também foi aplicada em ambos os olhos dos animais, durante a cirurgia, uma gaze estéril embebida em soro fisiológico a 0,9% com o objetivo de prevenir o ressecamento das córneas.

Os animais foram colocados em decúbito ventral e realizada a tricotomia e assepsia da região da calvária a ser operada. A pele foi incisada longitudinalmente e afastada lateralmente para expor os ossos parietais. O periósteo foi incisado e descolado com auxílio de pinça e bisturi e através de uma broca cirúrgica do tipo trefina, acoplada a um minimotor (ELTEC LB-100), foi realizada uma lesão com 5 mm de diâmetro no osso parietal esquerdo da calota craniana dos ratos, ocupando praticamente toda a largura do referido osso desde sua borda lateral até sua borda medial na sutura sagital (HIRATA et al., 2015). A falha óssea foi submetida a limpeza com SF0,9% para retirada dos debris. O grupo controle (G1) ficou com a falha vazia. Nos grupos G2 a G7 o defeito ósseo foi preenchido com a membrana de colágeno ou elastina e superficialmente à estas, depositou-se 5 µL de BMP-2 ou uma quantidade de HA suficiente para a cobertura da membrana, conforme demonstrado na Figura 3.

Figura 3 - Procedimento cirúrgico e enxertia no osso parietal esquerdo

Fonte: Próprio autor. (A) Incisão cutânea sagital; (B) Falha óssea com 5mm de diâmetro; (C) Enxertia com membrana de elastina ou membrana da serosa do intestino porcino; (D) Deposição de grânulos de hidroxiapatita sobre a membrana implantada; (E) Deposição de BMP sobre a membrana implantada.

3.4 Sutura dos tecidos e medicação

Após a cirurgia do defeito ósseo e conforme a divisão dos grupos de animais quanto ao preenchimento ou não de enxerto, o periósteo, fáscias e a pele foram reposicionados e suturados com fio de nylon 5.0 (Ethicon, Johnson & Johnson®) e aplicado antibiótico rifamicina spray na área da pele suturada. Em seguida, cada animal recebeu uma dose de 0,1 mg/100 g de peso do antibiótico Pentabiotic Veterinário Pequeno Porte (Fort Dodge®) via intramuscular. Durante o pós-operatório foi colocada dosagem de analgésico (paracetamol) diluído na água dos animais durante 3 semanas (MUNHOZ, 2013). Cada animal permaneceu isolado em gaiola, recebendo ração comum e água *ad-libitum*.

3.5 Morte indolor induzida dos animais e remoção das áreas cirúrgicas

A morte indolor induzida dos animais foi realizada após 6 semanas do procedimento cirúrgico através de anestesia intraperitoneal de 0.2 mL/100 g da solução de ketamina e xilazina, seguida de pneumotórax através da secção do musculo diafragma (HIRATA et al., 2015). Após constatada a morte do animal, a ressecção da calota craniana ocorreu com serra oscilatória Taimim modelo YDJZ-IID.

3.6 Análise macroscópica

As calotas removidas foram fotodocumentadas com máquina digital NIKON, avaliando a presença de alguma alteração patológica ou qualquer outra condição anormal na área cirúrgica (Figura 4).

Figura 4 - Demonstrativo macroscópico da amostra experimental

Fonte: Próprio autor. (A) Calota craniana; (B) Redução da área cirúrgica com navalha de micrótomo; (C) Acondicionamento em cassete histológico para processamento tecidual.

3.7 Análise radiológica

Utilizou-se aparelho Odel 300 miliamperes, foco com 100 miliamperes, tempo de 0,06 segundos e radiação de 40 kv. As imagens foram digitalizadas pelo sistema agfa e avaliadas quanto a integridade da falha óssea, bem como a regeneração através do aspecto radiopaco e radiolúcido da área do implante.

3.8 Processamento histológico das amostras da área cirúrgica

As amostras contendo a área receptora cirúrgica permaneceram imersas em formol tamponado 10% (Allkimia® - Campinas/SP - Brasil) durante 10 dias, seguidas de imersão em solução descalcificante de cloreto de hidrogênio (Allkimia® - Campinas/SP - Brasil). A solução foi trocada a cada 3 dias em um período que variou entre 15 e 20 dias. Após a descalcificação as amostras foram lavadas em água corrente. As mesmas foram inseridas em cassetes histológicos e submetidas ao processo de desidratação e diafanização em processador automático de tecidos LUPE®PT, contendo 2 recipientes com formol tamponado 10%, 4 recipientes com álcool absoluto, 4 contendo xilol 100% e 2 recipientes com parafina líquida a 70°C.

O tempo de imersão das amostras em cada recipiente foi de 1 hora, totalizando um processo de 12 horas. Em seguida as amostras foram incluídas verticalmente em bloco de parafina e congeladas a -5°C e foram submetidas a cortes semisseriados com 5 µm de espessura. Após o processo de desparafinização foram coradas com os seguintes marcadores ósseos: Tricrômico Masson, Picrosírus Red, Fluorocromáticos e Von Kossa. Para análise histológica dessas técnicas foi utilizado o fotomicroscópio Motic BA310E com objetivas de 4,10 e 40 vezes (CALDINI, 2002).

3.9 Análise histológica por microscopia de luz transmitida (óptica)

Nesta técnica, utilizou-se o Tricrômico de Masson que permitiu diferenciar osso maduro original corado em vermelho do osso neoformado imaturo que se cora em azul, além da possibilidade de identificar as fibras colágenas de matriz extracelular que também coram-se em azul.

3.10 Análise histológica por microscopia de luz polarizada

O método Picrosirius Red (solução aquosa saturada de ácido pícrico adicionada de 0,1 g de vermelho da Síria F3b, Sírius Red F3B-Bayer) permite avaliar o colágeno formado no início da consolidação óssea. O Picrosirius Red interage com as moléculas do colágeno, intensificando a sua capacidade de birrefringência (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979).

3.11 Análise histológica por microscopia de fluorescência

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

Através da técnica de fluorescência óssea, proposta por König Júnior (2010), foi possível identificar 3 períodos distintos da regeneração óssea:

Primeiro período do 0 ao 12º dia pós-cirúrgico (PO) (tecido neoformado corado por Alizarina);

Segundo período corresponde do 12º ao 24º dia de PO (tecido neoformado marcado por Calceína);

Terceiro período corresponde do 24º ao 36º dia de PO (tecido neoformado corado por Tetraciclina).

A metodologia de aplicação e concentração dos corantes fluorocromáticos, está exemplificada na Figura 5:

Figura 5 - Sequência de injeção de marcadores fluorocromáticos

Dias (Pós-cirúrgico)	Marcador	Solução injetada via subcutânea (kg)
0	Alizarina	30 mg + 1 mL soro + 20 mg de Na^2HPO^4
7	Alizarina	30 mg + 1 mL soro + 20 mg de Na^2HPO^4
14	Calceína	10 mg + 1 mL soro + 20 mg de Na^2HPO^4
21	Calceína	10 mg + 1 mL soro + 20 mg de Na^2HPO^4
28	Tetraciclina	60 mg + 1 mL soro + 20 mg de Na^2HPO^4
35	Tetraciclina	60 mg + 1 mL soro + 20 mg de Na^2HPO^4
42	Sacrifício	

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

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

3.12 Análise histológica da mineralização pelo método de Von Kossa

Von Kossa é uma técnica histológica para identificação de depósitos de cálcio responsáveis pela formação de ilhas de mineralização em uma camada celular. Quanto mais escuros esses depósitos são observados, maior a quantidade de cálcio

depositado, sendo um bom indicador da extensão da mineralização extra-articular (BRITO et al., 2016).

3.13 Análise morfométrica

Os cortes seriados com 5 μ m de espessura e corados com Tricrômio de Masson foram coletados de 3 pontos diferentes da falha óssea, possibilitando a quantificação da neoformação óssea ao longo da área cirúrgica (Figura 6):

Figura 6 - Planos de corte transversais da calota craniana de ratos

Fonte: Próprio autor. Demonstrativo macroscópico da amostra experimental, indicando os planos de corte para as análises histológica e morfométrica.

Cada imagem foi quantificada com auxílio do software Motic Images Plus 2.0 ML usando o Fotomicroscópio Motic BA310. Para isto, mediu-se a largura da cortical através de linhas guia, que em seguida, foram replicadas e posicionadas ao longo da falha óssea, com a finalidade de mimetizar a continuação do contorno ósseo original de cada animal (as linhas guias tinham as mesmas medidas da espessura da cortical) (Figura 7: A1 e A2). Após este processo, foi traçado manualmente um contorno que partia da borda esquerda e da borda direita da falha óssea, em direção ao centro da falha, respeitando os limites das linhas guias. Deste modo, obteve-se a área total demarcada, que correspondia à área total da falha óssea (Figura 7: B1 e

B2). Em seguida, os pontos de neoformação óssea foram demarcados manualmente na região esquerda e direita, obtendo-se suas respectivas áreas (Figura 7: C1 e C2).

Figura 7 - Quantificação morfométrica da área experimental e neoformação óssea

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

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

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

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

3.14 Análise estatística

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

4 RESULTADOS

4.1 Análise macroscópica

Na área cirúrgica de todos animais não ocorreu sinais de infecção como secreção purulenta, vermelhidão, tecido fibrótico e deiscência de sutura. Observou-se boa cicatrização da pele com a formação de pêlos e ausência de nódulos percutâneos. A calota craniana estava integra em todos os grupos, com ausência de granulomas, erosões ósseas, tumorações ou outras alterações indicativas de reação imunológica provocada pelos materiais implantados nos casos dos grupos G2 a G7 (Figura 8).

Figura 8 - Fotografias das peças anatômicas

Fonte: próprio autor. Análise macroscópica dos grupos G1 a G7. Setas indicam o sítio cirúrgico.

4.2 Análise radiológica

Na área cirúrgica de todos os animais ocorreu a radiotransparência central e ausência de neoformação óssea com densidade insuficiente para a opacidade. Notou-se ausência de alterações patológicas como rarefação, reabsorção óssea ou fratura secundária. As bordas internas da lesão permaneceram regulares e sem espículas ósseas, além da preservação das estruturas da morfologia do osso da calota craniana. Nos grupos, G2 a G7, notou-se uma densidade maior no centro

devido a presença do material que não foi totalmente reabsorvido dentro do período experimental. Não houve o reparo ósseo total em todos os grupos estudados, o que já era esperado devido a característica da ossificação intramembranosa do crânio (Figura 9).

Figura 9 - Radiografias das peças anatômicas

Fonte: Próprio autor. As setas indicam as falhas ósseas sem alterações morfológicas.

4.3 Análise histológica

Os achados histológicos comuns aos grupos foi a neoformação óssea partindo das margens da lesão óssea em direção ao centro. O osso jovem

apresentava ambas as características de osso imaturo e maduro. No imaturo, ocorreu a formação de trabéculas e várias lacunas desorganizadas contendo osteócitos. No maduro, as lacunas de osteócitos estavam mais organizadas. Não houve reparo total da lesão óssea, havendo tecido conjuntivo fibroso entremeado na neoformação óssea da área cirúrgica (Figura 10). Pode ser observado através da luz polarizada, a boa densidade óptica pela birrefringência da expressão das fibras de colágenas (Figura 11).

A fluorescência mostrou que em comum a todos os grupos ocorreu neoformação óssea a partir das margens da lesão. O padrão apresentado foi a marcação em vermelho da camada de osso jovem subperiosteal pela alizarina, primeiro marcador utilizado, nas regiões em contato com o osso receptor. Já a calceína, demonstrada na cor verde, ficou mais evidente na região mais central da lesão, demonstrando um padrão de crescimento, a partir do osso hospedeiro, em direção ao centro da lesão óssea (Figura 12).

Pela técnica de von Kossa, observou-se diferenças entre as membranas, com a de elastina apresentando mineralização mais periférica com a persistência da membrana na região central da lesão, enquanto as membranas de colágeno foram quase que totalmente reabsorvidas com calcificação distribuída entre a região periférica e central de lesão óssea (Figura 13).

Figura 10 - Fotomicroscopias de G1 a G7 com Tricrômio de Masson

Fonte: Próprio autor. Observou-se neoformação de tecido conjuntivo fibroso (setas vermelhas), neoformação óssea (setas pretas), osso original (O) e falha óssea sem enxerto (F). Aumento de 40 vezes.

Figura 11 - Fotomicroscopias de G1 a G7 com Picrosirius Red

Fonte: Próprio autor. Observou-se neoformação de tecido conjuntivo fibroso (setas vermelhas), neoformação óssea (setas pretas), a birrefringência do colágeno (setas amarelas), osso original (O) e falha óssea sem enxerto (F). Aumento de 40 vezes.

Figura 12 - Fotomicroscopias de G1 a G7 com Fluorescência Óssea

Fonte: Próprio autor. Notou-se neoformação óssea marcada por Alizarina (ALZ), neoformação óssea marcada por Calceína (CAL) e osso original (O). Aumento de 50 vezes.

Figura 13 - Fotomicroscopias de G1 a G7 com Von Kossa

Fonte: Próprio autor. Observou-se áreas de mineralização óssea (setas vermelhas), osso original (O) e falha óssea sem enxerto (F). Aumento de 40 vezes.

4.3.1 Histologia do G1 (G1-Controle)

No G1 houve pequena neoformação óssea a partir das extremidades da lesão provenientes do osso original. A área central do defeito ósseo foi preenchida predominantemente por tecido conectivo organizado (Figura 14).

O osso neoformado apresentou-se com birrefringência de suas fibras colágenas em tons alaranjados e avermelhados (Figura 15). Ao teste da fluorescência observou que a osteogênese ocorreu apenas na região periférica da lesão, visto a presença marcante da calceína (Figura 16). Na técnica de Von Kossa foi observada a formação de tecido conjuntivo fibroso e trabéculas ósseas ao redor das margens dos defeitos ósseos na cor preta indicando a mineralização óssea (Figura 17).

Figura 14 - Fotomicroscopias de G1 (Controle) com Tricrômio de Masson

Fonte: Proprio autor. Notou-se o osso original (O), falha óssea sem enxerto (F), áreas de neoformação óssea de característica imatura e madura (setas pretas), associado a presença de osteócitos alojados em lacunas (setas amarelas) e tecido conjuntivo fibroso (setas vermelhas). Aumento de 40, 100 e 200 vezes.

Figura 15 - Fotomicroscopias de G1 (Controle) com Picrosirius Red

Fonte: Próprio autor. Observeu-se-se o osso original (O) evidenciando a birrefringência das fibras colágenas (setas amarelas), áreas de neoformação óssea (setas brancas), presença de tecido conjuntivo fibroso (setas verdes) e a falha óssea (F). Aumento de 40 vezes.

Figura 16 - Fotomicroscopias de G1 (Controle) com fluorescência óssea

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

Figura 17 - Fotomicroscopias de G1 (Controle) com Von Kossa

Fonte: Próprio autor. Notou-se áreas de mineralização óssea (setas vermelhas), tecido conjuntivo fibroso (setas azuis), osso original nas bordas lesão (O) e a falha óssea (F). Aumentos de 40 e 100 vezes.

4.3.2 Histologia do G2 (G2-E24h/37° + HA)

Em G2 foi observada neoformação óssea trabeculada na borda da lesão com a presença de osso imaturo na cor azul e maduro na cor vermelha associado a presença de osteócitos. Ficou evidente os resquícios da membrana no centro da lesão sendo circundada por tecido conjuntivo fibroso, sem contato com osso neoformado (Figura 18).

A área cirúrgica apresentou-se com birrefringência de fibras colágenas em tons avermelhados e de maneira desorientada (Figura 19). Notou-se 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 ao redor da membrana (Figura 20). Na técnica de Von Kossa, foi observada que a mineralização ocorreu apenas ao redor das bordas da lesão (Figura 21).

Figura 18 - Fotomicroscopias de G2-E24h/37°, com Tricrômio de Masson

Fonte: Proprio autor. Notou-se o osso original (O), falha óssea sem enxerto (F), áreas de neoformação óssea (setas pretas) com a presença de osteócitos alojados em lacunas (setas amarelas) e tecido conjuntivo fibroso (setas vermelhas). Aumento de 40, 100 e 200 vezes.

Figura 19 - Fotomicroscopias de G2 - E24h/37°, com Picrosirius Red

Fonte: Próprio autor. Obsevou-se-se o osso original (O), falha óssea sem enxerto (F), áreas de neoformação óssea (setas brancas), presença de tecido conjuntivo fibroso (setas verdes) e a birrefringência do colágeno (setas amarelas). Aumento de 40 vezes.

Figura 20 - Fotomicroscopias de G2 - E24h/37° com Fluorescência Óssea

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

Figura 21 - Fotomicroscopias de G2 – E24h/37°, com Von Kossa

Fonte: Próprio autor. Notou-se áreas de mineralização óssea (setas vermelhas), tecido conjuntivo fibroso (setas azuis), osso original nas bordas lesão (O) e a falha óssea (F). Aumentos de 40 e 100 vezes.

4.3.3 Histologia do G3 (G3-E24h/37° + HA)

Nos achados de G3 foi observada tecido ósseo neoformado trabeculado de aspecto imaturo e maduro nas bordas da lesão. Notou-se a formação de uma ponte óssea inferiormente a membrana que permaneceu presente e involucra por tecido conjuntivo fibroso. Não houve osteointegração visto a interposição entre a membrana e osso, seja original ou osso neoformado (Figura 22).

O osso neoformado apresentou-se com birrefringência de suas fibras colágenas em tons avermelhados, além de resquícios da membrana no centro do defeito (Figura 23). Notou-se 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 24). 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 25).

Figura 22 - Fotomicroscopias de G3 - E24h/37° + HA, com Tricrômio de Masson

Fonte: Proprio autor. Notou-se o osso original (O), falha óssea sem enxerto (F), áreas de neoformação óssea (setas pretas), presença de tecido conjuntivo fibroso (setas vermelhas) ao redor da membrana de elastina. Aumentos de 40, 100 e 200 vezes.

Figura 23 - Fotomicroscopias de G3 - E24h/37°+ HA, com Picrosirius Red

Fonte: Próprio autor. Obsevou-se-se o osso original (O), falha óssea sem enxerto (F), áreas de neoformação óssea (setas brancas), presença de tecido conjuntivo fibroso (setas verdes) e a birrefringência do colágeno (setas amarelas). Aumento de 40 vezes.

Figura 24 - Fotomicroscopias de G3 - 24h/37° + HA, com Fluorescência Óssea

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

Figura 25 - Fotomicroscopias de G3 – E24h/37°+HA, com Von Kossa

Fonte: Próprio autor. Notou-se áreas de mineralização óssea (setas vermelhas), tecido conjuntivo fibroso (setas azuis), osso original nas bordas lesão (O) e a falha óssea (F). Aumentos de 40 e 100 vezes.

4.3.4 Histologia do G4 (G4- E24h/37° + BMP)

Em G4 ficou evidenciada pouca neoformação óssea e de característica imatura nas bordas da lesão com predominância de tecido conjuntivo fibroso na região central. Nota-se um desalinhamento entre a pare superior e inferior ao osso neoformado. Os resquícios da membrana foram observados no centro da falha óssea. Não houve contato entre o osso e membrana devido a presença de tecido conjuntivo fibroso (Figura 26). O osso neoformado nas bordas da lesão apresentou-se com birrefringência de suas fibras colágenas em tom avermelhado (Figura 27). 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 28). 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 ao redor do implante circundado por tecido conjuntivo fibroso (Figura 29).

Figura 26 - Fotomicroscopias de G4 - E24h/37°+ BMP, com Tricrômio de Masson

Fonte: Próprio autor. Notou-se o osso original (O), falha óssea sem enxerto (F), áreas de neoformação óssea (setas pretas), presença de tecido conjuntivo fibroso (setas vermelhas) ao redor dos resquícios da membrana. Aumento de 40, 100 e 200 vezes.

Figura 27 - Fotomicroscopias de G4 - E24h/37°+ BMP, com Picrosirius Red

Fonte: Próprio autor. Observeu-se-se o osso original (O), falha óssea sem enxerto (F), áreas de neoformação óssea (setas brancas), presença de tecido conjuntivo fibroso (setas verdes) e a birrefringência do colágeno (setas amarelas). Aumento de 40 vezes.

Figura 28 - Fotomicroscopias de G4 - E24h/37°+ BMP, com Fluorescência Óssea

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

Figura 29 - Fotomicroscopias de G4 -E24h/37° + BMP, com Von Kossa

Fonte: Próprio autor. Notou-se áreas de mineralização óssea (setas vermelhas), tecido conjuntivo fibroso (setas azuis), osso original nas bordas lesão (O) e a falha óssea (F). Aumentos de 40 e 100 vezes.

4.3.5 Histologia do G5 (G5-SIP24h/25°)

No G5 foi possível observar neoformação óssea de aspecto imaturo mais acentuada e maduro em menor proporção ao redor da membrana circundada por tecido conjutivo fibroso. Notou-se que o osso neoformado na região central não apresentou comunicação o osso original e os resquícios da membrana ficaram entremeados no novo tecido ósseo (Figura 30). O osso neoformado apresentou-se com birrefringência de suas fibras colágenas em tons avermelhados, porém ainda com as fibras desorganizadas além de tecido conectivo e resquícios da membrana na região central (Figura 31). Notou-se 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 32). Pela técnica de Von Kossa notou-se a formação de trabéculas ósseas mineralizadas com múltiplas lacunas com maior frequência nas áreas próximas ao osso original e profundamente a membrana (Figura 33).

Figura 30 - Fotomicroscopias de G5 – SIP24h/25°, com Tricrômio de Masson

Fonte: Próprio autor. Notou-se o osso original (O), áreas de neoformação óssea (setas pretas) com a presença de osteócitos alojados em lacunas (setas amarelas) e tecido conjuntivo fibroso (setas vermelhas). Aumentos de 40, 100 e 200 vezes.

Figura 31 - Fotomicroscopias de G5 – SIP24h/25°, com Picrosirius Red

Fonte: Próprio autor. Obsevou-se-se o osso original (O), áreas de neoformação óssea (setas brancas), presença de tecido conjuntivo fibroso (setas verdes) e a birrefringência do colágeno com fibras organizadas próxima ao osso original (setas amarelas). Aumento de 40 vezes.

Figura 32 - Fotomicroscopias de G5 – SIP24h/25°, com Fluorescência Óssea

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

Figura 33 - Fotomicroscopias de G5 – SIP24h/25°, com Von Kossa

Fonte: Próprio autor. Notou-se áreas de mineralização óssea (setas vermelhas), tecido conjuntivo fibroso (setas azuis), osso original nas bordas lesão (O). Aumentos de 40 e 100 vezes.

4.3.6 Histologia de G6 (G6-SIP24h/25° + HA)

No G6 notou-se predominância de tecido conjuntivo fibroso em toda lesão com tênue formação óssea, predominando tecido ósseo neoformado de aspecto imaturo e irregular ao redor do osso original. Os resquícios da membrana foram observados na região central do defeito ósseo, entremeado de osso neoformado e tecido conjuntivo fibroso mais superficialmente (Figura 34). O osso neoformado apresentou-se com birrefringência de suas fibras colágenas em tons avermelhados e foi observada presença de tecido conectivo superficialmente (Figura 35). Notou-se pelo 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 36). Pela técnica de Von Kossa observou-se a formação de trabéculas ósseas com lacunas na cor preta, indicando a mineralização óssea próxima das bordas do osso original (Figura 37).

Figura 34 - Fotomicroscopias de G6 - SIP24h/25°+HA, com Tricrômio de Masson

Fonte: Próprio autor. Notou-se o osso original (O), áreas de neoformação óssea (setas pretas), presença de tecido conjuntivo fibroso (setas vermelhas) e osteócitos alojados em lacunas (setas amarelas). Aumentos de 40, 100 e 200 vezes.

Figura 35 - Fotomicroscopias de G6 - SIP24h/25°+HA, com Picrosirius Red

Fonte: Próprio autor. Obsevou-se-se o osso original (O), áreas de neoformação óssea (setas brancas), presença de tecido conjuntivo fibroso (setas verdes) e a birrefringência do colágeno (setas amarelas). Aumento de 40 vezes.

Figura 36 - Fotomicroscopias de G6 - SIP24h/25°+HA, com Fluorescência Óssea

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

Figura 37 - Fotomicroscopias de G6 - SIP24h/25°+HA, com Von Kossa

Fonte: Próprio autor. Notou-se áreas de mineralização óssea (setas vermelhas), tecido conjuntivo fibroso (setas azuis), osso original nas bordas lesão (O). Aumentos de 40 e 100 vezes.

4.3.7 Histologia de G7 (G7-SIP24h/25° + BMP)

Nos achados em G7 foi observado neoformação óssea partindo das margens da lesão em direção a falha óssea, com característica de osso maduro e imaturo. Os resquícios da membrana podem ser observados na região central e entremeada ao osso neoformado, inclusive com a presença de osteócito ajojado em lacuna (Figura 38). O osso neoformado apresentou-se com birrefringência de suas fibras colágenas em tons avermelhados, com resquícios da matriz na região central (Figura 39). Sob o teste da fluorescência notou-se 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 40). Pela técnica de Von Kossa observou-se a formação de trabéculas ósseas com múltiplas lacunas indicando a mineralização óssea da matriz nas bordas próximas ao osso original e na região central da falha óssea (Figura 41).

Figura 38 - Fotomicroscopias de G7 - SIP24h/25° + BMP, com Tricrômio de Masson

Fonte: Próprio autor. Notou-se o osso original (O), áreas de neoformação óssea (setas pretas), presença de tecido conjuntivo fibroso (setas vermelhas) e osteócitos alojados em lacunas (setas amarelas). Aumentos de 40, 100 e 200 vezes.

Figura 39 - Fotomicroscopias de G7 - SIP24h/25° + BMP, com Picrosirius Red

Fonte: Próprio autor. Obsevou-se-se o osso original (O), áreas de neoformação óssea (setas brancas), presença de tecido conjuntivo fibroso (setas verdes) e a birrefringência do colágeno (setas amarelas). Aumento de 40 vezes.

Figura 40 - Fotomicroscopias de G7 - SIP24h/25° + BMP, com Fluorescência Óssea

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

Figura 41 - Fotomicroscopias de G7 - SIP24h/25° + BMP, com Von Kossa

Fonte: Próprio autor. Notou-se áreas de mineralização óssea (setas vermelhas), tecido conjuntivo fibroso (setas azuis), osso original nas bordas lesão (O). Aumentos de 40 e 100 vezes.

4.4 Análise Morfométrica

As médias e desvios-padrão do volume percentual relativo de osso neoformado no defeito craniano do grupo controle (G1), dos grupos enxertados com membrana de elastina 24 h/37°C (G2 a G4) e dos grupos enxertados com membrana de serosa de intestino porcino 24h/25°C (G5 a G7), foram: $5,86 \pm 2,87$; $13,68 \pm 1,44$; $17,65 \pm 1,85$; $29,46 \pm 3,21$; $53,20 \pm 4,46$; $30,45 \pm 4,12$; $38,47 \pm 5,32$, respectivamente (Figura 42). Identificou-se que os grupos enxertados com membrana da serosa do intestino porcino (G5 a G7), apresentaram neoformação superior em relação aos demais grupos de estudo, especialmente para o grupo G5 (Membrana da serosa do intestino porcino 24h/25°C, aplicada de forma isolada).

Figura 42 - Análise morfométrica do percentual relativo de osso neoformado dos grupos G1 a G7

Fonte: Próprio autor. Demonstração do percentual de osso neoformado. Letras iguais indicam semelhança estatística entre os grupos. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

4.5 Análise Estatística

Foram identificadas diferenças significativas com índice de significância $p < 0.05$, na comparação estatística do volume ósseo formado entre os grupos G1 (Controle) e G2 (Elastina 24h/37°C) e entre os grupos G6 (Serosa 24h/25°C + HA) e G7 (Serosa 24h/25°C + BMP). Entretanto, não apresentou diferença significativa (n/s) entre os grupos enxertados com membrana de elastina G2 (Elastina 24h/37°C) e G3 (Elastina 24h/37°C + HA), bem como entre o grupo elastina G4 (Elastina 24h/37°C + BMP) em relação ao grupo controle G6 (Serosa 24h/25°C + HÁ). As demais comparações entre os grupos, apresentaram diferença significativa $p < 0.01$, conforme gráfico demonstrado pelo método ANOVA seguido de Tukey (Figura 43).

A análise estatística comparativa entre os grupos de estudo, revelou que todos os grupos enxertados (G2 a G7), apresentaram diferença significativa superior de volume ósseo neoformado ao grupo controle ($p < 0.01$). Identificou-se também, que os grupos enxertados com membrana de elastina ou serosa de intestino porcino associado à BMP apresentaram neoformação significativa e superior aos equivalentes grupos de estudo com a hidroxiapatita. Entretanto o resultado mais expressivo foi obtido com a membrana da serosa do intestino porcino isolada.

Figura 43 - Comparativo das diferenças estatísticas entre os grupos G1 a G7

Comparativo das diferenças estatísticas entre os grupos G1 a G7, extraído do software estatístico BioEstat 5.0.

5 DISCUSSÃO

A cirurgia para reconstrução óssea utiliza como padrão ouro o enxerto ósseo autólogo, porém devido a sua quantidade limitada e morbidade do sitio doador aumentaram as buscas por novos métodos que sejam eficazes no reparo ósseo (BOULER et al., 2017). A partir dessa necessidade, a engenharia de tecidos tem desenvolvido biomateriais que possam estimular a rápida proliferação celular óssea tornando-os assim uma alternativa interessante para a medicina regenerativa (MIJIRITSKY et al., 2017; RATNAYAKE; MUCALO; DIAS, 2017; COSTA et al., 2017).

Nos ultimos anos o desenvolvimento e aperfeiçoamento dos biomaterias tem melhorado suas propriedades como osteocondução, osteointegração e bioatividade, porém algumas limitações relacionadas com a baixa resistência mecânica, alto custo de fabricação, baixa capacidade osteogênica e dificuldade na osteointegração ainda revelam a dificuldade para chegar ao biomaterial ideal (GURUMURTHY; BIERDEMAN; JANORKAR, 2016; GUO; MA, 2018; LEBRE et al., 2017). Desta maneira essas limitações estimulam o estudo de novos materiais, entretanto algumas de suas características devem obrigatoriamente serem avaliadas como a capacidade de ser biocompatível com o tecido receptor, biodegradabilidade e osteogenicidade capaz de promover a integração osso/implante (ORYAN et al., 2014; JANICKI; SCHMIDMAIER, 2011).

5.1 Biocompatibilidade

A biocompatibilidade é uma das principais características a serem consideradas no processo de utilização dos biomateriais e está relacionada à capacidade de um material desencadear uma resposta adequada no leito receptor com ausência ou o mínimo possível de reações inflamatórias, tóxicas ou mutagênica (RATNER et al., 2013; SABER-SAMANDARI; SABER-SAMANDARI, 2017). Essa

característica pode ser observada nessa pesquisa que usou membranas poliméricas derivadas de tecido bovino e porcino, pois todas as suas células foram removidas pelo processo de hidrólise alcalina (DAAMEN et al., 2007; HORN; MARTINS; PLEPIS, 2009; YEO et al., 2015).

Moraes (2017), implantou as membranas de elastina no crânio de ratos derivado da cartilagem auricular bovino e observou nos resultados histológicos ausência de reação inflamatória, a qual esta associada com a presença de células gigantes e reabsorção da interface osso/enxerto. Resultado semelhante foi divulgado por MACHADO (2018), que observou ausência de reações adversas em membranas de colágeno derivadas da serosa do intestino porcino e implantadas no fêmur de ratos. Segundo esses estudos, o tratamento alcalino das membranas derivadas do tecido bovino e porcino promove a acelularização que poderiam causar reações imunológicas, além de as transformarem em estruturas porosas.

Comprovando estas conclusões, notou-se nesse estudo a ausência de sinais inflamatórios e infecciosos de rejeição tecidual, tanto macroscópico quanto histológico, nos grupos enxertados com os biomateriais, características que confirmam a biocompatibilidade das membranas de elastina e serosa de intestino porcino. Portanto, pode-se afirmar que os materiais de elastina e serosa de intestinos porcino utilizados nesta pesquisa mostraram-se atóxicos e por isso, viável para a prática clínica (MUNHOZ et al., 2013; HIRATA et al., 2015; MACHADO et al., 2018). A BMP comercializada e a HA sintetizada foram também biocompatíveis conforme já demonstrado em pesquisas anteriores (MORAES, 2017; JUNG et al., 2017).

Entretanto, não somente a biocompatibilidade justifica o uso dos biomateriais devendo também os mesmos sofrer um processo de biodegradação controlado para que ocorra neoformação óssea em proporções semelhantes (KÖNIG JÚNIOR, 2010).

5.2 Biodegradabilidade

O biomaterial além de imunocompatível, deve manter, induzir e restaurar funções biológicas. Além disso o processo de biodegradação concomitante taxa de neoformação óssea é essencial pois promove a proliferação celular e ao mesmo tempo permite espaço para o crescimento ósseo (EBRAHIMI; BOTELHO; DOROZHKIN, 2017). Desta maneira analisou-se no presente estudo o comportamento das membranas utilizadas, as quais permaneceram alguns resquícios nas áreas implantadas conforme também descrito em estudos anteriores (CUNHA et al., 2008; MUNHOZ, 2013; HIRATA et al., 2015).

Este dado pode ser atribuído à questão de equilíbrio hidrofílico/hidrofóbico, porém há a necessidade de testes físico-químicos como o de absorção, para comprovar esta hipótese (WANG et al., 2018; YEO et al., 2015). Segundo Guo e Ma (2018), a velocidade de reabsorção de um polímero está relacionada a sua propriedade hidrofílica ou hidrofóbica, sendo que as células apresentam preferência por superfícies hidrofílicas. Cardoso et al. (2016) demonstraram que a adição de um ácido graxo insaturado pode melhorar a reação do biomaterial com o tecido circunjacente na área implantada, já que a hidrofobicidade pode alterar a adesão e a resposta celular. Outros autores sugerem que um aumento da hidrofobia possa melhorar os problemas relacionados à rápida degradação da membrana de colágeno (AMRUTHWAR; JANORKAR, 2013).

Outras pesquisas sobre membranas poliméricas de colágeno e elastina têm mostrado as suas propriedades hidrofílicas através de testes físico-químicos de absorção (MOURIÑO; BOCCACCINI, 2010; WANG et al., 2018). LI et al., (2017) afirmam que a capacidade de absorção do biomaterial permite a migração de proteínas através do líquido tissular, que circunda os biomateriais durante a sua permanência no tecido receptor. Segundo alguns autores a característica de hidrofiliabilidade pode inclusive, interferir na ação osteoblástica e consequentemente na osteoregeneração (BÁRTOLO et al., 2011; YEO et al., 2015; KRISHNAKUMAR et al., 2018).

5.3 Osteoregeneração

Dentre os biomateriais que estimulam a osteorregeneração destacam-se os polímeros a base de colágeno e elastina que são elementos da matriz extracelular do tecido ósseo e as cerâmicas de hidroxiapatita pela sua semelhança com a parte inorgânica do osso. A osteogênese é descrita como o processo de formação de osso novo através da atividade das células osteoblásticas que podem ser estimuladas pelas características do biomaterial e dentre esses destaca-se a porosidade (JANICKI; SCHMIDMAIER, 2011; ORYAN et al., 2014; EMADEDIN et al., 2017; PRAKASAM et al., 2017).

A porosidade dos biomateriais favorece a migração, proliferação e diferenciação celular, facilitando o transporte de oxigênio e nutrientes (CUNHA et al., 2017). Ainda não há um consenso na literatura sobre as dimensões ideais dos poros de um biomaterial, podendo variar de 100 a 500 μm para permitir o crescimento ósseo (BLOKHUIS; ARTS, 2011; MAUFFREY et al., 2011; ORYAN et al., 2014). PRAKASAM et al (2017) demonstraram que a porosidade das membranas poliméricas pode ser modificada pelo tempo da hidrólise alcalina, além do aumento de cargas negativas visando um melhor efeito osteogênico. Contrariando o padrão demonstrado na literatura sobre a porosidade, a análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV), constatou que as membranas utilizadas nesta pesquisa (E24/37 e SIP24/25) apresentaram superfície compacta e aparentemente sem poros, porém com satisfatória neoformação óssea, destacando-se a de colágeno da serosa de intestino porcino.

O tamanho dos poros está associado ao tempo de hidrólise alcalina e pela temperatura que determina a integridade da estrutura da tripla hélice da molécula de tropocolágeno, bem como, das ligações de reticulação (GOISSIS et al., 1999; HORN; MARTINS; PLEPIS, 2009). Portanto, esses resultados demonstram a necessidade de novos estudos para determinar até quando a porosidade é um dos fatores mais relevantes na regeneração óssea. Assim, outras características dos biomateriais, além da porosidade, devem ser investigadas como o tipo de superfície (lisa ou rugosa), presença de cargas iônicas e as características hidrolíticas/hidrofóbicas (SALVAGNI et al. 2014; CARDOSO et al., 2016; CUNHA et al., 2017; SASKA et al.,

2018).

Outro fator que pode ter contribuído para a regeneração óssea observada nesse estudo, foi a presença da rugosidade na superfície das membranas de elastina e colágeno, conforme mostrado nas análises por MEV das membranas. Em acordo, alguns autores enfatizam que a migração, proliferação e diferenciação celular estão relacionadas as superfícies às quais estão ligadas (KHAN et al., 2008; BÁRTOLO et al., 2011). SCHARIN-MEHLMANN et al. (2018) 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.

5.3.1 Capacidade osteorregenerativa da elastina

A membrana de elastina foi obtida através da cartilagem auricular bovina, lavada com solução salina 0,9% (NaCl) e água destilada, e tratada com uma solução alcalina (hidrólise) por um período de 24h a temperatura de 37°C (HORN; MARTINS; PLEPIS, 2009). A elastina presente na cartilagem auricular possui fibras orientadas em forma de favo, favorecendo a permeabilidade celular (GALDEANO et al., 2104). Pela MEV da membrana de elastina usada nessa pesquisa observou-se a disposição das fibras em forma de rede, o que pode ter contribuído para a sustentação e adesão celular.

Os resultados histológicos dos grupos com membrana de elastina (G2, G3 e G4), seguiram o padrão esperado com a associação com a BMP apresentando maior neoformação óssea, seguido pela hidroxiapatita e por último a membrana isolada (MACHADO, 2018). Ao analisar estudos pregressos com utilização de membrana de elastina submetidas a hidrólise alcalina, verifica-se resultados distintos que variam de acordo com o tempo e temperatura à que foram submetidas. Moraes (2017) utilizou membranas de elastina com hidrólise por 24h à 50°C e por 96h à 37°C, isolada e associada a HA ou BMP, apresentando seus melhores resultados com membrana submetida a maior tempo de hidrólise e associada à BMP.

A capacidade osteoregenerativa dos biomateriais apresentou um padrão bem

definido, visto que o biomaterial de elastina demonstrou resultados semelhantes ao da literatura, sendo a associação com a BMP superior em relação a com hidroxiapatita, e o pior resultado quando utilizada de forma isolada (MCCARTHY; YUAN; KORIA, 2016; MACHADO, 2018). Foi observado na histomorfometria que a membrana de elastina empregada de forma isolada, proporcionou um aumento do volume ósseo de 134% em relação ao grupo controle, enquanto que a associação com a hidroxiapatita proporcionou um aumento de 29% quando comparado à elastina isolada. Contudo, com a inclusão de BMP permitiu um aumento de 116%, corroborando com a literatura e atribuindo à BMP, a importante função de estimular a diferenciação celular e osteogênese (MARUPANTHORN et al., 2017). As BMPs correspondem a uma grande família de proteínas que atuam na proliferação de fatores de crescimento, na invasão vascular e também na remodelação óssea através da atividade osteoclástica. Outra grande vantagem consiste na propriedade de induzir a formação óssea a partir do tecido muscular circunjacente e não apenas, pelas células da medula óssea e do periósteo (RAHMAN et al., 2015; SHEIKH et al., 2015).

5.3.2 Capacidade osteorregenerativa do colágeno

Neste estudo, a membrana de colágeno foi obtida a partir de serosa de intestino porcino através de hidrólise por um período de 24h a temperatura de 25°C. A porosidade e a rugosidade da matriz pode ser modificada através do processo de hidrólise alcalina, além do aumento do número de cargas negativas superficiais na molécula elevando as propriedades piezoelétricas fundamentais para a osteogênese, como demonstrado por ROCHA et al., (2002).

Segundo Moreira et al.(2013), as matrizes de colágeno tratadas por 48 horas apresentaram melhores resultados sobre as submetidas a 24 horas. Além disso, demonstrou-se que a absorção de água pelas matrizes e seu potencial hidrofílico aumenta linearmente com o aumento do conteúdo de carboxilados. Essas características podem afetar o comportamento de adesão celular à essas matrizes,

muito mais do que a morfologia de suas superfícies (MOREIRA et al., 2004; MOREIRA et al., 2013).

A utilização da serosa de intestino porcino trata-se de algo inovador, visto que a literatura apresenta vastas pesquisas com a matriz descelularizada da submucosa intestinal (SIS). Essa mudança deve ao fato da SIS ser um material promissor, porém ainda não é o ideal devido presença de tecido fibroso em conjunto com a neoformação óssea (LI et al., 2017; SUN et al., 2018).

A membrana da serosa de intestino porcino mostra-se um biomaterial com afinidade celular e elasticidade, devido a presença de colágeno na sua estrutura (MACHADO, 2108). Essas características somadas a uma matriz tridimensional, possibilita a criação de um microambiente facilitador do crescimento celular, obtendo vantagem na utilização da membrana para o processo de remodelação cicatrização (HIRATA et al., 2015; BOLAÑOS et al., 2017).

Em relação aos grupos com as membranas de colágeno da serosa de intestino porcino (G5, G6 e G7), foi identificado melhor resultado morfométrico com a utilização da membrana aplicada isoladamente, seguido pela associação com a BMP e por último, com a hidroxiapatita. Estes dados contrariam os resultados apresentados na literatura (BOLAÑOS et al., 2017). Outras pesquisas que utilizaram a membrana da SIS demonstram resultados satisfatórios quanto a capacidade de estímulo osteogênico e angiogênico (LI et al., 2017; SUN et al., 2018). Porém existem poucos estudos com a membrana derivada da serosa de intestino porcino, recentemente demonstrada como promissora por MACHADO (2018).

Os resultados histomorfométricos demonstraram um aumento do volume ósseo de 817% da membrana de colágeno em comparação com o grupo controle, já a associação com hidroxapatita e BMP houve um decréscimo de 72 e 38%, respectivamente, em relação a membrana isolada.

5.3.3 Comparação da capacidade osteorregenerativa entre colágeno x elastina

A membrana colágeno de intestino porcino demonstrou superioridade na capacidade osteoregenerativa frente à elastina. Isto pode estar relacionado a sua maior rugosidade, melhor equilíbrio hidrofílico/hidrofóbico e consequentemente, maior velocidade de degradação concomitante ao processo de neoformação óssea (ROCHA et al., 2002; JANICKI; SCHMIDMAIER, 2011; CARDOSO et al., 2016). Outra questão a ser analisada é se as membranas de elastina e colágeno realmente necessitam da adição de outro material, para alavancar a sua capacidade osteorregenerativa.

Os estudos com BMP têm demonstrado seu enorme potencial para reparação óssea. Particularmente a BMP-2 utilizada neste estudo, que atua na proliferação de fatores de crescimento, diferenciação de células mesenquimais, na invasão vascular e também, na remodelação óssea através da atividade dos osteoclastos (ISSA et al., 2016; AGRAWAL; SINHA, 2017). O bom resultado da BMP-2 depende principalmente de seu *scaffold*, sendo a membrana de colágeno já aprovada para utilização clínica em seres humanos pelo Food and Drug Administration (FDA). (GAUTSCHI; FREY; ZELLWEGER, 2007; YAN L et al., 2014).

O fato da BMP-2 não ter produzido o resultado esperado pode estar relacionado ao fato da utilização de uma dose mais baixa. A literatura demonstra alguns estudos com BMP em baixa e alta dose em associação com biomateriais, contudo, KIM et al., (2014) revelaram que a baixa dosagem não demonstrou resultado positivo e com significância estatística, apesar de não descrever a dose ideal da BMP que pode variar de acordo com o local a ser utilizada (KIM et al., 2014; AGRAWAL; SINHA, 2017).

Assim como a BMP, a hidroxiapatita pode ser utilizada isoladamente ou em compósitos na engenharia de tecidos, devido 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, este biomaterial osteocondutor apresenta composição mineral semelhante a do osso, favorecendo a osteointegração (ZIMMERMANN; MOGHADDAM, 2011; GERMAINI et al., 2017; RATNAYAKE; MUCALO; DIAS, 2017). Quando atuam em compósitos porosos, apresentam importante contribuição

no processo de regeneração ósseos (KURIEN; PEARSON; SCAMMELL, 2013; DAHABREH et al., 2014; VELASCO; NARVAEZ-TOVAR; GARZON- ALVARADO, 2015; PRAKASAM et al., 2017). A ausência de poros nas membranas estudadas nessa pesquisa, pode justificar os resultados insatisfatórios com a adição de hidroxiapatita.

Os biomateriais utilizados podem ser considerados como um suporte para o crescimento celular durante o processo de regeneração óssea considerando que: 1) neoformação óssea superior ao grupo controle; 2) maturação óssea; 3) organização das fibras de colágeno demonstrado pela luz polarizada. Entretanto houve resultados inesperados quando associado essas membranas com hidroxiapatita e BMP. Assim, novas pesquisas continuam sendo necessárias para encontrar um biomaterial ideal que possa ser utilizado de maneira isolada ou em associação, otimizando sua capacidade osteorregenerativa. A busca de padronização da estrutura tridimensional do enxerto, tamanho dos poros, rugosidade, equilíbrio hidrofílico/hidrofóbico e a composição bioquímica dos tecidos bovino e porcino usados para a confecção das membranas permanece como um objetivo a ser alcançado num futuro próximo.

6 CONCLUSÕES

- As membranas demonstraram biocompatibilidade nos defeitos ósseos provocados na região calvária de ratos, visto a ausência das características de processo inflamatório no estudo histológico;
- O processo de reabsorção foi mais intenso nas membranas de colágeno de intestino porcino, sendo evidenciado maiores resquícios nos estudos com a membrana de elastina;
- Houve neoformação óssea com características de osso imaturo e maduro com fibras de colágeno organizadas, sugerindo assim, remodelação óssea e atividade osteoblástica, porém circundado por tecido conectivo;
- A membrana isolada do colágeno de intestino porcino foi a que apresentou melhor resultado histológico e a associação das membranas com a BMP demonstrou boa mineralização óssea sendo superior a com hidroxiapatita.

REFERÊNCIAS

- 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.
- 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. et al. Biofabrication strategies for tissue engineering. In: FERNANDES, P.; BÁRTOLO, P. (Eds.). **Advances on modeling in tissue engineering**. Springer: Dordrecht, 2011. p. 137-176. (Computational methods in applied sciences, v. 20).
- BILLSTRÖM, G. H. et al. Application of scaffolds for bone regeneration strategies: current trends and future directions. **Injury**, v. 44, p. S28-S33, 2013.
- BLOKHUIS, T. J.; ARTS, J. J. Bioactive and osteoinductive bone graft substitutes: definitions, facts and myths. **Injury**, v. 42, n. 2, p. S26-S29, 2011.
- BLOKHUIS, T.J.; LINDNER, T. Allograft and bone morphogenetic proteins: an overview. **Injury**, v. 39, n. 2, p. S33-S36, 2008.
- BOLAÑOS, M. A. C.; BUTTIGIEG, J.; TRIANA, J. C. B. Development and characterization of a novel porous small intestine submucosa-hydroxyapatite scaffold for bone regeneration. **Materials Science and Engineering: C**, v. 72, p. 519-25, 2017.
- BOULER, J. M. et al. Biphasic calcium phosphate ceramics for bone reconstruction: a review of biological response. **Acta Biomaterialia**, v. 53, p. 1-12, 2017.
- BRITO, A. F. et al. Osteogenic capacity of alkali-free bioactive glasses: in vitro studies. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 105, n. 8, p. 2360-2365, 2016.
- CALDINI, E.G. **Manual de técnicas em histologia e biologia celular do laboratório de biologia celular da FMUSP**. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2002.

CARDOSO, G. B. et al. Oleic acid surfactant in polycaprolactone/hydroxyapatite-composites for bone tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 104, n. 6, p. 1076-82, 2016.

GERMAINI, M.-M. et al. Osteoblast and osteoclast responses to A/B type carbonate-substituted hydroxyapatite ceramics for bone regeneration. **Biomedical Materials**, v. 12, n. 3, p.1-18, 2017.

CHEN, Y. J. et al. Evaluation of new biphasic calcium phosphate bone substitute: rabbit femur defect model and preliminary clinical results. **Journal of Medical and Biological Engineering**, v. 37, n. 1, p. 85-93, 2017.

COMÍN, R. et al. Titanium-hydroxyapatite composites sintered at low temperature for tissue engineering: in vitro cell support and biocompatibility. **Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials**, v. 15, n. 2, p. 176-183, 2017.

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. da. **Implantes subperiostais de hidroxiapatita em ratos submetidos à ingestão crônica de álcool**. 2001. 88 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

_____. **Implantes tridimensionais de colágeno polianiónico em falhas ósseas produzidas no fêmur de ratas ovariectomizadas**. 2006. 126 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) - 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 in Medicine**, v. 19, n. 3, p. 1341-1348, 2008.

CUNHA, M. R. et al. 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.

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

EBRAHIMI, M.; BOTELHO, M. G.; DOROZHUKIN, S. V. Biphasic calcium phosphates bioceramics (HA/TCP): concept, physicochemical properties and the impact of standardization of study protocols in biomaterials research. **Materials Science and Engineering: C**, v. 71, p. 1293-312, 2017.

EGOL, K. A. et al. Bone grafting: sourcing, timing, strategies, and alternatives. **Journal of Orthopaedic Trauma**, v. 29, n. 12, p. S10-S14, 2015.

EL BIALY, I.; JISKOOT, W.; NEJADNIK, M. R. Formulation, delivery and stability of bone morphogenetic proteins for effective bone regeneration. **Pharmaceutical Research**, v. 34, n. 6, p. 1152-1170, 2017.

EMADEDIN, M. et al. Percutaneous autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell implantation is safe for reconstruction of human lower limb long bone atrophic nonunion. **Cell Journal**, v. 19, n. 1, p. 159-165, 2017.

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

GALDEANO, E. A. et al. Membrana de elastina derivada da cartilagem auricular em terapias de regeneração óssea. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA, 24., 2014, Uberlândia. **Anais...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Engenharia Biomédica, 2014. p. 213-216.

GAO, C. et al. Bone biomaterials and interactions with stem cells. **Bone Research**, v. 5, 2017.

GARG, P. et al. Prospective review of mesenchymal stem cells differentiation into osteoblasts. **Orthopaedic Surgery**, v. 9, n. 1, p. 13-19, 2017.

GARRISON, K. R. et al. Bone morphogenetic protein (BMP) for fracture healing in adults. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 6, 2010.

GAUTSCHI, O. P.; FREY, S. P.; ZELLWEGGER, R. Bone morphogenetic proteins in clinical applications. **ANZ Journal of Surgery**, v. 77, n. 8, p. 626-631, 2007.

GERMAINI, M. M. et al. Osteoblast and osteoclast responses to A/B type carbonate-substituted hydroxyapatite ceramics for bone regeneration. **Biomedical Materials**, v. 12, n. 3, 2017.

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

GOISSIS, G. et al. Preparation and characterization of anionic collagen: P(VDF/TrFE) composites. **Polymer Engineering 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 the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 10, p. 62-74, 2012.

GUO, B.; MA, P. X. Conducting polymers for tissue engineering. **Biomacromolecules**, v. 19, n. 6, p. 1764-1782, 2018.

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.

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

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.

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**, v. 46, n. 7, p. 1215-1222, 2015.

HIXON, K. et al. The calcification potential of cryogel scaffolds incorporated with various forms of hydroxyapatite for bone regeneration. **Biomedical Materials**, v.12, n. 2, 2017.

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.

HORNER, E. A. et al. Long bone defect models for tissue engineering applications: criteria for choice. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 16, n. 2, p. 263-271, 2010.

HSUEH, Y. S. et al. Design and synthesis of elastin-like polypeptides for an ideal nerve conduit in peripheral nerve regeneration. **Materials Science and Engineering: C**, v. 38, p. 119-126, 2014.

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. 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.

JANG, S. J. et al. Bone regeneration of hydroxyapatite with granular form or porous scaffold in canine alveolar sockets. **In vivo**, v. 31, n. 3, p. 335-341, 2017.

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**, v. 42, n. 2, p. S77-S81, 2011.

JUNG, T. et al. Effect of BMP-2 delivery mode on osteogenic differentiation of stem cells. **Stem Cells International**, v. 2017, p. 7859184, 2017.

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

KHAN, S. N. et al. The biology of bone grafting. **Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 13, n. 1, p. 77-86, 2005.

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

KIM, M. S. et al. Low-dose recombinant human bone morphogenetic protein-2 to enhance the osteogenic potential of the Schneiderian membrane in the early healing phase: in vitro and in vivo studies. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 72, n. 8, p. 1480-94, 2014.

KÖNIG JÚNIOR, 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.

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

LEBRE, F. et al. The shape and size of hydroxyapatite particles dictate inflammatory responses following implantation. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 2922, 2017.

LI, M. et al. Controlled delivery of icariin on small intestine submucosa for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C**, v. 71, p. 260-67, 2017.

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 Translational Research**, v. 7, n. 8, p. 1417-1428, 2015.

MACHADO, E. G. **Reparo de defeito femoral em ratos através do uso de polímeros de colágeno e elastina associados a hidroxiapatita e proteína morfogenética óssea**. 2018. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo; São Carlos, 2018.

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.
MARUPANTHORN, K. et al. Bone morphogenetic protein-2 enhances the osteogenic differentiation capacity of mesenchymal stromal cells derived from human bone marrow and umbilical cord. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 39, n. 3, p. 654–62, 2017.

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

MCCARTHY, B.; YUAN, Y.; KORIA, P. Elastin-like-polypeptide based fusion proteins for osteogenic factor delivery in bone healing. **Biotechnology Progress**, v. 32, n. 4, p. 1029–1037, 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. 1-15, 2017.

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

MOCZAR, M.; MOCZAR, E.; ROBERT, L. Peptides obtained from elastin by hydrolysis with aqueous ethanolic potassium hydroxide. **Connect Tissue Research**, v. 6, n. 4, p. 207-213, 1979.

MORAES, R. de. **Utilização da membrana de elastina associada a hidroxiapatita e proteína morfogenética óssea no reparo de defeitos cranianos de ratos**. 2017. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de São Carlos, 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.

MOREIRA, P. L. et al. 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.

MOURIÑO, V.; BOCCACCINI, A. R. Bone tissue engineering therapeutics: controlled drug delivery in three-dimensional scaffolds. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 7, n. 43, p. 209-227, 2010.

MUMCUOGLU, D. et al. Collagen I derived recombinant protein microspheres as a novel delivery vehicles for bone morphogenetic protein-2. **Materials Science and Engineering: C**, v. 84, p. 271-280, 2018.

MUNHOZ, M. A. S. **Utilização de blendas poliméricas no reparo de defeitos cranianos de ratos**. 2013. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo; São Carlos 2013.

NASCIMENTO, D. L. et al. Mineralização de matriz derivada de cartilagem auricular. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ÓRGÃOS ARTIFICIAIS E BIOMATERIAIS, 7., 2012, Natal. **Anais...** [S.l.: s.n.], 2012. p. 1-6.

ORCIANI, M. et al. Biofabrication and bone tissue regeneration: cell source, approaches, and challenges. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 5, p. 17, 2017.

ORTH, M. et al. BMP-2-coated mineral coated microparticles improve bone repair in atrophic non-unions. **Eur Cells Mater**, v. 33, n. 1, p. 1-12, 2017.

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

OZSVAR, J. et al. Elastin-based biomaterials and mesenchymal stem cells. **Biomaterials Science**, v. 3, n. 6, p.800-809, 2015.

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.

PRAKASAM, M. et al. Biodegradable Materials and metallic implants-a review. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 8, n. 4, 2017.

QUINLAN, E. et al. Long-term controlled delivery of rhBMP-2 from collagen–hydroxyapatite scaffolds for superior bone tissue regeneration. **Journal of Controlled Release**, v. 207, p. 112-119, 2015.

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

RAGNONI, E. et al. Coacervation of α -elastin studied by ultrafast nonlinear infrared spectroscopy. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 18, n. 40, p. 27981-27990, 2016.

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

RAINA, D. B. et al. Gelatin- hydroxyapatite - calcium sulphate based biomaterial for long term sustained delivery of bone morphogenic protein-2 and zoledronic acid for increased bone formation: In-vitro and in-vivo carrier properties. **Journal of Controlled Release**, v. 28, n. 272, p. 83-96, 2018.

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.

ROCHA L. B.; GOISSIS, G.; ROSSI, M. A. Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. **Biomaterials**, v. 23, n.2, p. 449-56, 2002.

ROCHA, L. B. et al. Efficacy of polyanionic collagen matrices for bone defect healing. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 71, n. 2, p. 355-359, 2004.

ROCHA, L. B. et al. Biomineralization of polyanionic collagen-elastin matrices during cavial bone repair. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 79, n. 2, p. 237-245, 2006.

RODEO S. A. et al. 2011 AOA symposium: tissue engineering and tissue regeneration: AOA critical issues. **The Journal of Bone and Joint Surgery American**, v. 95, n. 15, 2013.

RONG, J. et al. Biocompatibility of porcine small intestinal submucosa and rat endothelial progenitor cells in vitro. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 2, p. 1282-1291, 2015.

RYABENKOVA, Y. et al. The relationship between particle morphology and rheological properties in injectable nano-hydroxyapatite bone graft substitutes. **Materials Science and Engineering: C**, v. 75, p. 1083–1090, 2017.

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

SALVAGNI, E. et al. A bioactive elastin - like recombinamer reduces unspecific protein adsorption and enhances cell response on titanium surfaces. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, p. 225-233, 2014.

SASKA, S. et al. Biopolymer-based membranes associated with osteogenic growth peptide for guided boneregeneration. **Biomedical Materials**, v. 13, n. 3, 2018.

SCHARIN-MEHLMANN, M. et al. Nano- and micro-patterned S-, H-, and X-PDMS for cell-based applications: comparison of wettability, roughness, and cell-derived parameters. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 6, 2018.

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

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

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.

SPRIO, S. et al. Osteointegration in cranial bone reconstruction: a goal to achieve. **Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials**, v. 14, n. 4, p. 470-476, 2016.

STOCK, U. A.; VACANTI, J. P. Current state and prospects. **Annual Review of Medicine**, v. 52, p. 443-451, 2001.

SUN, T. et al. Biomimetic composite scaffold containing small intestinal submucosa and mesoporous bioactive glass exhibits high osteogenic and angiogenic capacity. **Tissue Engineering**, v. 24, n. 13-14, p. 1044-1056, 2018.

TANG, Y. et al. Fabrication and in vitro biological properties of piezoelectric bioceramics for bone regeneration. **Scientific Reports**, v. 7, 2017.

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

VAN GAALEN, S. M. et al. Use of fluorochrome labels in in vivo bone tissue engineering research. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 16, n. 2, p. 209-217, 2010.

VELASCO, M. A.; NARVÁEZ-TOVAR, C. A.; GARZÓN-ALVARADO, D. A. Design, materials, and mechanobiology of biodegradable scaffolds for bone tissue engineering. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-21, 2015.

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, 2017.

WANG, H. et al. Tunable control of hydrogel microstructure by kinetic competition between self-assembly and crosslinking of elastin-like proteins. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 10, n. 26, p. 21808-21815, 2018.

XIE, H. et al. Treatment of burn and surgical wounds with recombinant human tropoelastin produces new elastin fibers in scars. **Journal of Burn Care & Research**, v. 38, n. 5, p. 859-867, 2017.

YAN, L. et al. Efficacy of rhBMP-2 versus iliac crest bone graft for posterior C1-C2 fusion in patient older than 60 years. **Orthopedics**, v. 37, n. 1, p. 51-57, 2014.

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

ZHU, D. et al. Elastin-like protein-hyaluronic acid (ELP-HA) hydrogels with decoupled mechanical and biochemical cues for cartilage regeneration. **Biomaterials**, v. 127, p. 132-140, 2017.

ZIMMERMANN, G.; MOGHADDAM, A. Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. **Injury**, v. 42, Suppl 2, p. 16-21, 2011.

ANEXO A - Preparação dos biomateriais

Membrana de elastina

Cartilagem auricular bovina foi lavada com solução salina 0,9% (NaCl) e água destilada, e tratada com uma solução alcalina (hidrólise) contendo sais (sulfatos e cloretos) e hidróxidos de metais alcalinos e alcalinos terrosos, por um período de 24h a temperatura de 37°C. Esse procedimento foi feito pelo Grupo de Bioquímica e Biomateriais do Instituto de Química de São Carlos – USP por adaptação do utilizado para obtenção de colágeno (HORN; MARTINS; PLEPIS et al., 2009). Após esse período de tempo, 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 a 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.

Matriz de colágeno de serosa

A matriz de colágeno foi obtida a partir de serosa de intestino porcino pelo mesmo procedimento para a obtenção da matriz de elastina, mas a temperatura de 25°C.

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 mantido em agitação durante 24 h à temperatura ambiente.

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

Tanto as membranas de elastina e de colágeno, quanto à 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).

Figura 44 - Fotomicrografias por MEV para Matriz de elastina após tratamento alcalino a 37°C. Aumento de 200 e 1000 vezes

Figura 45 - Fotomicrografias por MEV para Matriz de serosa porcina após tratamento alcalino a 25°C. Aumento de 200 e 1000 vezes

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

FACULDADE DE MEDICINA DE JUNDIAÍ

Autarquia Municipal criada por Lei Municipal Nº 1506 de 12 de março de 1968 - C.N.P.J. Nº 50.985.266/0001-09
Reconhecimento Federal Decreto Nº 71656 de 04/01/1973

R. Francisco Telles, 250 - CEP: 13.202-550 - 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, 04 de maio de 2017.

Ilustríssimo Senhor
MARCELO RODRIGUES DA CUNHA

Informamos que o projeto de pesquisa: Estudo comparativo de membrana serosa porcino e de elastina no reparo de defeitos na calvária de ratos" está inserido dentro do protocolo 56/2015, como parte integrante da pesquisa temática.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Evaldo Marchi', is written over a faint circular official stamp of the FMJ.

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

Desde 1968