



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE MATERIAIS DENTÁRIOS E PRÓTESE**



**AVALIAÇÃO DA REPARAÇÃO ÓSSEA EM CALVÁRIA DE COELHOS APÓS  
CIRURGIA COM USO DE ELASTINA RECOMBINANTE (ELRs)**

**Aluna: Marina Ribeiro Paulini**

**Orientador: Prof. Dr. João Paulo Mardegan Issa**

**Ribeirão Preto  
2021**



**MARINA RIBEIRO PAULINI**

**AVALIAÇÃO DA REPARAÇÃO ÓSSEA EM CALVÁRIA DE COELHOS APÓS  
CIRURGIA COM USO DE ELASTINA RECOMBINANTE (ELRs)**

**Versão Corrigida**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Reabilitação Oral.

**Área de Concentração: Reabilitação Oral**

**Orientador: Prof. Dr. João Paulo Mardegan Issa**

**Ribeirão Preto  
2021**

Autorização a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citadas à fonte.

Paulini, Marina Ribeiro

Avaliação da reparação óssea em calvária de coelhos após cirurgia com uso de elastina recombinante (ELRs).

Orientador: João Paulo Mardegan Issa, Ribeirão Preto-2021.

68 p.:il + 1DVD

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de Concentração: Reabilitação Oral.

DVD: cópia eletrônica da dissertação

Versão Corrigida

1.ELRs; 2. Calvária; 3. Coelho; 4. Regeneração Óssea; 5. Biocompatibilidade.

**PAULINI, Ribeiro Marina**

**AVALIAÇÃO DA REPARAÇÃO ÓSSEA EM CALVÁRIA DE COELHOS APÓS  
CIRURGIA COM USO DE ELASTINA RECOMBINANTE (ELRS).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Reabilitação Oral. Área de Concentração: Reabilitação Oral.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Banca Examinadora**

Presidente:

Prof.(a) Dr.(a): \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof.(a). Dr.(a).: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof.(a). Dr.(a).: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof.(a). Dr.(a).: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Dedico este trabalho,  
À **Deus**, nada sou sem Ele;  
Aos meus pais, **Alexandre** e **Claudete**, pela  
educação e valores que sigo em vida;  
Ao meu noivo **Diego Augusto** pelo apoio, carinho,  
dedicação e paciência;  
Ao meu irmão **Alex e família** pelo amor.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador **Prof. Dr. João Paulo Mardegan Issa** pela a oportunidade, confiança, dedicação, companheirismo e amizade ao longo desta caminhada.

Agradeço aos professores que aceitaram fazer parte desta banca.

Agradeço a **Profa. Dra. Sara Feldman** da Faculdade Ciências Médicas da Universidade Nacional de Rosário, Argentina (LABOATEM) pela oportunidade em trabalhar junto a sua equipe de pesquisa, parceria e apoio.

Agradeço aos **Prof. Dr. Carlos Rodrigues Cabello e Profa. Dra Matilde Alonso** da Faculdade de Valladolid, Espanha (BIOFORGE) pela parceria e compnaherismo.

Agradeço aos Professores do Departamento de Materiais Dentário e Prótese da Forp **Profa. Dra. Andréa Cândido dos Reis, Prof. Dr. Ricardo Faria Ribeiro e Profa. Dra. Rossana Pereira de Almeida.**

Agradeço a **Profa. Dra. Valéria Oliveira Pagnano de Souza** por ser minha relatora e por todas as considerações feitas ao meu projeto.

Agradeço ao técnico do laboratório **Dimitrius Leonardo Pitol** por sua competência de trabalho e seu conhecimento compartilhado.

Aos meus colegas de pós-graduação: Murilo Campos, Letícia Montarele, Brenda Gonçalves, Caroline Fortes, Victor da Mata, Daniel Zuluaga pela amizade.

Aos meus familiares.

Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro da bolsa de Mestrado (Processo:149981/2019-8) para realização desta pesquisa.

## RESUMO

PAULINI, M.R. **Avaliação da reparação óssea em calvária de coelhos após cirurgia com uso de elastina recombinante (ELRs)**. 2021. 68 p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2021.

**Introdução:** Na área médica e odontológica é observado a importância e a necessidade do estudo de materiais para utilização como enxertos ósseos em áreas lesionadas devido a presença de fraturas, infecções ou tumores que ocasionam perda extensa de tecido ósseo. As ELRs (*elastin-like recombinamers*) atualmente estão sendo estudadas como uma opção para substrato na regeneração tecidual. Assim, o objetivo do presente estudo foi a avaliação de fatores osteogênicos e osteoclastogênicos sobre os efeitos da elastina recombinante no reparo ósseo em defeitos cirúrgicos através da técnica de cirurgia em calvárias de coelhos. **Material e métodos:** 5 coelhos da linhagem Nova Zelândia (4 meses), sexo feminino, sendo que na mesma calvária de cada coelho foram realizados dois defeitos cirúrgicos, sendo o lado Direito da calvária o Grupo Controle (GRUPO D) e o lado Esquerdo da calvária o Grupo tratado com ELRs (GRUPO E). O tempo de sacrifício dos animais foram de 130 dias, após a criação cirúrgica do defeito ósseo na calvária de 10 mm de diâmetro de cada lado. As amostras das calvárias foram destinadas a análise de tomografia computadorizada e análises histológicas de microscopia de luz para quantificação de tecido ósseo neoformado, fibras colágenas e vasos sanguíneos. Foi realizada análise estatística dos dados histológicos através dos testes de *Kolmogorov-Smirnov* e *Shapiro-Wilk*. Para a análise tomográfica foi realizado o teste de Wilcoxon. Os dados foram testados quanto a normalidade, e uma vez que apresentaram distribuição normal foi realizado teste t pareado. Foi adotado nível de significância de 5%. **Resultados:** Em relação à análise histológica foi encontrada diferença significativa entre os grupos (Fibras  $p=0,001$ ; Vasos  $p<0,001$ ; Tecido ósseo neoformado  $p=0,001$ ) com maiores valores para o lado tratado com ELRs. Já na análise tomográfica foi encontrada diferença significativa entre os grupos ( $p<0,01$ ). **Conclusão:** neste modelo experimental a ELRs contribuiu positivamente na formação de tecido ósseo neoformado, dados comprovados através histologia pela quantificação do trabeculado ósseo formado na área de lesão da calvária, fibras colágenas e vasos sanguíneos e também pelos dados radiográficos através da tomografia. Portanto, o biomaterial estudado apresenta capacidade osteogênica e houve osteointegração na falha óssea induzida experimentalmente; e, biocompatibilidade.

**Palavras-chave:** ELRs; calvária; coelho; regeneração óssea; biocompatibilidade.



## ABSTRACT

PAULINI, M.R. **Bone repair assessment in rabbit calvaria after surgery with the use of recombinant elastin (ELRs)**. 2021. 68 p. Thesis (Master's degree). Graduate Program of the Department of Dental Materials and Prosthesis, Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 2021.

**Introduction:** In the medical and dental field, the importance and the need to study materials for use as bone grafts in injured areas due to the presence of fractures, infections or tumors that cause extensive loss of bone tissue are observed. ELRs (*elastin-like recombinamers*) are currently being studied as an option for substrate in tissue regeneration. Thus, the aim of the present study was to evaluate osteogenic and osteoclastogenic factors on the effects of recombinant elastin on bone repair in surgical defects through the technique of surgery on rabbit's head. **Material and methods:** 5 rabbits of the New Zealand lineage (4 months) female, and in the same calvary of each rabbit, two surgical defects were performed, the right side of the calvary being the Control Group (GROUP D) and the left side of the calvary the Group treated with Elastin (GROUP E). The sacrifice time of the animals was 130 days, after the surgical creation of the bone defect in the 10 mm diameter calvary on each side. Calvary samples were destined for radiographic analysis by means of computed tomography and histological analysis of light microscopy to quantify neoformed bone tissue, collagen fibers and blood vessels. Statistical analysis of histological data was performed using the Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk tests. For tomographic analysis, the Wilcoxon test was performed. The data were tested for normality, and once they had a normal distribution, a paired t-test was performed. A significance level of 5% was adopted. **Results:** A significant difference was found between the groups (Fibers  $p = 0.001$ ; Vases  $p < 0.001$ ; Neoformed bone tissue  $p = 0.001$ ) with higher values for the treated side. In the tomographic analysis, a significant difference was found between the groups ( $p < 0.01$ ). **Conclusion:** in this experimental model, Recombiner Elastin contributed positively to the formation of newly formed bone tissue, data proven through histology by quantifying the bone trabeculate formed in the area of calvary injury, collagen fibers and blood vessels and also by radiographic data through tomography. Therefore, the biomaterial studied has osteogenic capacity and there was osteintegration in the experimentally induced bone failure; and, biocompatibility.

**Keywords:** ELRs; calvaria; bunny; bone regeneration; biocompatibility.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da preparação e seleção das Matrizes; e, ERL quimicamente ativado.....	30
Figura 2: Esquema da preparação e formação do Hidrogel.....	31
Figura 3: Sequência da Técnica Cirúrgica- A) Solução de iodopovidona a 10,0%; B/C) Incisão cutânea longitudinal de aproximadamente 4 cm; D) Divulsão dos tecidos; E/F) Broca trefina montada em motor elétrico estéril.....	33
Figura 4: Sequência da Técnica Cirúrgica- A) Profundidade da lesão não superior a 3mm e com 10 mm de diâmetro em cada lado da calvária; B) Lado Direito não recebeu o hidrogel e Lado Esquerdo o hidrogel foi implantado rapidamente, observando se o processo de gelificação.....	33
Figura 5: Modelo experimental utilizado neste estudo.....	35
Figura 6: Fotomicrografia de uma lâmina histológica corada por Tricrômio de Masson da calvária do grupo tratado com ELRs ilustrando o tecido ósseo neoformado (TO), destacando a presença de fibras colágenas (FC), vasos sanguíneos (VS) e tecido adiposo (TA) , aumento real de 20 vezes, através microscópio de luz acoplado a uma câmera digital, Axioimager Z2 Zeiss e software AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).....	38
Figura 7: Fotomicrografia da lâmina da calvária do coelho corada com Tricômio de Masson.....	39
Figura 8: Fotomicrografia da lâmina da calvária do lado do grupo tratado com ERLs corada com Tricrômio de Masson. A área circundada pela cor verde representa a área identificada pelo Software AxioVision 4.8 (Zeiss, 5X).....	40
Figura 9: Fotomicrografia da lâmina da calvária do lado do grupo tratado com ERLs corada com Tricrômio de Masson. A região marcada em verde foi transformada em pontos para correta leitura e quantificação de tecido ósseo. O resultado obtido em $\mu\text{m}^2/\text{área}$ - Software AxioVision 4.8 (Zeiss,5X).....	40
Imagem 10: Lâmina histológica do Grupo Tratado com ELRs para quantificação de Fibras Colágenas. Coloração em Tricrômio de Masson. Aumento de 20 vezes.....	41
Imagem 11: Sequência para quantificação de fibras colágenas através do Programa <i>Image J</i> . A) Programa <i>ImageJ</i> , com o filtro FastRed Fast Blue DAB	

para identificação das fibras colágenas; B) Sequência do programa para identificação de fibras colágenas; C) Análise quantitativa de fibras colágenas por imagem em % área.....	42
Imagem 12: Lâmina histológica do Grupo tratado com ELRs para quantificação de Vasos Sanguíneos. Coloração em Tricrômio de Masson. Objetiva de 20.....	43
Imagem 13: Sequência para quantificação de Vasos Sanguíneos através do Programa <i>Image J</i> . A) Programa <i>ImageJ</i> , com colocação de grades (17821 pixels área por ponto); B) Contagem dos pontos na área de intersecção; C) Número de vasos quantificados pelo programa.....	44
Figura 14: Esquema de fotomicrografias de uma lâmina histológica do Grupo Tratado com ELRs corado por Tricrômio de Masson, em diferentes aumentos, ilustrando a formação do tecido ósseo em seta azul (TO), destacando a presença fibras colágenas em seta amarela (FC), tecido adiposo em seta verde (TA) e vasos sanguíneos em seta vermelha (VS)- Software AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Oberkohen,Alemanha).....	47
Figura 15:Grupo Controle- Fotomicrografias das lâminas das calvárias coradas com Tricômio de Masson do grupo controle, onde: (A) Imagem panorâmica com objetiva de 5, no qual pode-se observar Tecido Ósseo Neoformado e Tecido Mineralizado (Ósseo Maduro); (B) Tecido Ósseo Neoformado, Fibras Colágenas e Vasos Sanguíneos- objetiva de 20; (C) Tecido Adiposo- objetiva de 20. Software AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Oberkohen, Alemanha).....	49
Figura 16:Grupo Tratado- Fotomicrografias das lâminas das calvárias coradas com Tricômio de Masson do grupo tratado com ELRs, onde: (A) Imagem panorâmica com objetiva de 5, no qual pode-se observar em maior aumento representado pela seta: (B) Tecido Ósseo Neoformado- objetiva de 20; (C) Tecido Adiposo- Objetiva de 20; (D) vasos Sanguíneos e Fibras Colágenas-objetiva de 40; (E) Osteoblastos- objetiva de 100. Software AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Oberkohen, Alemanha).....	49
Figura 17: Gráficos comparação grupo controle com grupo tratado isoladamente. Não foi encontrada diferença significativa para o tecido adiposo entre os grupos ( $p=0,836$ ). Para as demais variáveis foi encontrada diferença significativa entre os grupos (Fibras $p=0,001$ ; Vasos $p<0,001$ ; Tecido ósseo neoformado $p=0,001$ )	

com maiores valores para o lado Tratado.....	51
Imagem 18: Imagens da Tomografia Computadorizada, sendo lado direito o grupo Controle e o lado esquerdo o grupo tratado com ELRs, equipamento Activion16-Toshiba.....	52
Imagem 19: Resultado Estatístico Tomografia Computadorizada- O diâmetro Lesão com Implante x Lesão Sem Implante foi comparado por meio do teste de Wilcoxon, onde foram observadas diferenças significativas, com p abaixo de 0,01.....	53

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição dos grupos experimentais: Lado Direito (D) grupo controle e Lado Esquerdo (E) grupo tratado com Elastina.....	34
Tabela 2: Teste de Normalidade ( <i>Kolmogorov-Smirnov</i> e <i>Shapiro-Wilk</i> ), nível de significância de 5%. Tecido Ósseo Neoformado, Tecido Adiposo, Fibras Colágenas e Vasos Sanguíneos.....	50
Tabela 3: Média (desvio padrão) entre os grupos Controle (Lado Direito da Calvária) e Tratado com Elastina (Lado esquerdo da Calvária) -Análise Tecido Ósseo Neoformado, Fibras Colágenas, Vasos Sanguíneos e Tecido Adiposo.....	50
Tabela 4: Apresenta o resultado do teste t pareado para cada variável. Não foi encontrada diferença significativa para o tecido adiposo entre os grupos ( $p=0,836$ ). Para as demais variáveis foi encontrada diferença significativa entre os grupos (Fibras $p=0,001$ ; Vasos $p<0,001$ ; Tecido Ósseo neoformado $p=0,001$ ) com maiores valores para o lado Tratado.....	51
Tabela 5: Resultados Tomografia.....	53

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>BMP</b>	Proteína óssea morfogenética
<b>CEUA</b>	Comitê de Ética para Uso de Animais
<b>DO</b>	Defeito ósseo
<b>E</b>	Elastina
<b>ELRs</b>	<i>Elastin like recombinamers</i>
<b>FC</b>	Fibras Colágenas
<b>FORP</b>	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
<b>IL-1</b>	Interleucina tipo 1
<b>IL-6</b>	Interleucina tipo 6
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>MOD</b>	Matriz óssea desmineralizada
<b>O</b>	Osso
<b>OVX</b>	Ovariectomia
<b>RANK</b>	Receptor ativador do fator nuclear beta
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator de transformação do crescimento tipo beta
<b>TA</b>	Tecido Adiposo
<b>TM</b>	Tricômio de Masson
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral tipo alfa
<b>TO</b>	Tecido Ósseo
<b>USP</b>	Universidade de São Paulo
<b>VS</b>	Vasos Sanguíneos

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Tecido Ósseo.....</b>	<b>19</b>
2.1.1 Osteoblastos .....	19
2.1.2 Osteócitos .....	20
2.1.3 Osteoclastos.....	21
2.1.4 Matriz óssea .....	21
2.1.5 Reparação Óssea .....	23
<b>2.2 Engenharia Tecidual .....</b>	<b>24</b>
2.2.1 Engenharia Tecidual e Regeneração de Tecido Ósseo .....	25
<b>2.3 Elastina.....</b>	<b>26</b>
2.3.1 Elastin-like recombinamers (ELRs) .....	27
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
<b>3.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>28</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
<b>4.1 Preparação e Seleção das matrizes.....</b>	<b>29</b>
<b>4.2 ELR quimicamente ativado.....</b>	<b>30</b>
<b>4.3 Preparação do hidrogel .....</b>	<b>31</b>
4.3.1 Preparação de hidrogéis ELR para administração in vivo.....	31
<b>4.4 Seleção dos animais .....</b>	<b>32</b>
<b>4.5 Preparação pré-operatória.....</b>	<b>32</b>
<b>4.6 Técnica Cirúrgica .....</b>	<b>32</b>
<b>4.7 Planejamento experimental.....</b>	<b>34</b>
<b>4.8 Cuidados pós-operatórios.....</b>	<b>36</b>
<b>4.9 Eutanásia dos animais e obtenção das amostras.....</b>	<b>36</b>
<b>4.10 Processamento Histológico .....</b>	<b>36</b>
<b>4.11 Coloração dos cortes para análise histológica .....</b>	<b>37</b>
<b>4.12 Análise por microscopia de luz.....</b>	<b>39</b>
4.12.1 Tecido Ósseo Neoformado.....	39
4.12.2 Fibras colágenas .....	41
4.12.3 Vasos Sanguíneos .....	43

<b>4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>45</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
<b>5.1 Análise clínica dos animais.....</b>	<b>46</b>
<b>5.2 Análise histológica qualitativa .....</b>	<b>46</b>
<b>5.3 Análise quantitativa histológica.....</b>	<b>48</b>
<b>5.4 Análise tomográfica .....</b>	<b>52</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>60</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>68</b>
<b>COMITÊ DE ÉTICA.....</b>	<b>68</b>



## 1 INTRODUÇÃO

O osso é um tecido conjuntivo especializado, vascularizado e dinâmico que se modifica ao longo da vida do organismo (JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J, 2017). Quando lesado, possui uma capacidade única de regeneração e reparação sem a presença de cicatrizes, mas em algumas situações devido ao tamanho do defeito, o tecido ósseo não se regenera por completo (LUDWING SC *et al.*, 2020).

Na área médico-odontológica têm sido realizadas diferentes pesquisas na procura de materiais naturais ou sintéticas que possam substituir tanto tecidos moles quanto tecidos duros (HENCH *et al.*, 1986; VON AT *et al.*, 2001).

Em específico na odontologia observa-se a importância da falta de osso em rebordos alveolares podendo gerar um grande problema na recuperação estético-funcional em pacientes que tenham sofrido traumatismos dento-alveolares, extrações dentárias traumáticas, ausência dentária congênita, patologias que envolvam maxila e mandíbula, além de infecções e colocação de implantes (TOLEDO JL *et al.*, 2001). A perda óssea pode ocorrer também por doença periodontal, cirurgias traumáticas, ou até mesmo por razões fisiológicas devido à falta de função do rebordo ou carga protética inadequada (MENDES VC *et al.*, 2000).

Dessa maneira, devido a sua importância, existe um grande desenvolvimento nas abordagens terapêuticas para o tratamento de defeitos ósseos através de estudos que incluem auto-enxertos, alo-enxertos e materiais artificiais utilizados isolados ou em associação ao enxerto ósseo. No entanto, essas técnicas também apresentam algumas desvantagens, como por exemplo, os auto-enxertos geralmente oferecem suprimento de tecido insuficiente, resultando em morbidade do sítio doador; e, os alo-enxertos podem resultar em rejeição imunológica e inflamação. Assim, felizmente, a engenharia tecidual tem sido bastante explorada, com a finalidade de superar essas restrições, associando, portanto, com outros biomateriais na tentativa de influenciar positivamente a resposta tecidual (LEI H *et al.*, 2009).

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

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

A elastina é uma proteína presente na matriz extracelular com a característica principal a elasticidade, presente mais em vasos sanguíneos, ligamentos e pele (MUNHOZ MA *et al.*, 2013; OZSVAR J *et al.*, 2015). A formação é através de ligações cruzadas do seu monômero precursor tropoelastina, formando um arcabouço tridimensional (GROVER CN *et al.*, 2012). Algumas características da elastina a credenciam para utilização como biomaterial: estabilidade estrutural, elasticidade, bioatividade e automontagem (YEO GC *et al.*, 2015) (CONTESSOTTO P *et al.*, 2020).

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 DW *et al.*, 1997)

Algumas propriedades da elastina ainda continuam incertas, como a tendência de calcificação apresentados em próteses cardíacas. Essa característica despertou interesse para a utilização desse gel 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 (CUNHA MR *et al.*, 2008)

Os biomateriais 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 (ZHU D *et al.*, 2017).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Tecido Ósseo

O tecido ósseo apresenta funções como suporte, proteção e locomoção e está sob o controle de fatores sistêmicos, como os hormônios, e fatores locais, como os fatores de crescimento e citocinas (KATCHBURIAN E *et al.*, 2004). A homeostase do sistema esquelético está na dependência de uma remodelação óssea equilibrada, ou seja, da dinâmica balanceada entre a atividade dos osteoblastos, células de formação óssea, e osteoclastos, células de reabsorção óssea (TAKAYANAGI H *et al.*, 2005). Nos processos de formação, reabsorção, manutenção e remodelação óssea, participam três tipos celulares distintos que derivam de duas linhagens: os osteoblastos (células relacionadas à formação e manutenção); os osteócitos (células de revestimento ósseo); e, os osteoclastos (células de reabsorção óssea) (JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J., 2017).

#### 2.1.1 Osteoblastos

São as células responsáveis pela produção da matriz orgânica do osso (CERRI PS *et al.*, 2005). Sintetizam a matriz orgânica, constituída de várias proteínas colágenas e não colágenas, tais como colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina, proteoglicanas, fosfoproteínas e citocinas. Estes componentes interagem entre si e se organizam permitindo a deposição de sais minerais. (RAISZ LG *et al.*, 1998).

Os osteoblastos também funcionam como receptores e transmissores de sinais para remodelação, pois possuem receptores para hormônios. Secretam fatores de regulação, como por exemplo, a Interleucina-6 (IL-6) e fatores de crescimento como TGF- $\beta$  (Fator de transformação do crescimento tipo beta) que são fatores locais que agem na proliferação, diferenciação e atividade osteoblástica (ARANA VE *et al.*, 2001).

Além disso, os osteoblastos têm a capacidade de modificar a matriz adjacente, removendo ou alterando as proteoglicanas. Iniciam, dessa maneira, a mineralização da matriz, através da secreção de vários reguladores como Interleucina 6, Fator de transformação do crescimento tipo beta (TGF- $\beta$ ) e

Interferon- $\gamma$  (CAMAL IN *et al.*, 2020). Em condições fisiológicas, a apoptose de osteoblastos parece exercer um importante papel no controle do crescimento ósseo. A apoptose é um mecanismo de morte celular, sendo, portanto, responsável pelo equilíbrio populacional de células nos tecidos e em órgãos. A apoptose, quando desencadeada, ativa uma complexa cascata proteolítica intracelular que coordena todo o processo de morte celular. Como consequência da ativação das proteínas intracelulares promotoras da apoptose, a célula fragmenta-se originando os corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos expressam em sua membrana plasmática, entre outras moléculas, a fosfatidilserina que atrai os fagócitos e estes rapidamente internalizam os corpos apoptóticos. Recentemente, foi mostrado que os osteoblastos, além de participar na formação e mineralização da matriz óssea, podem também fagocitar os corpos apoptóticos oriundos de osteoblastos e/ou células de revestimento ósseo, durante o início da formação óssea (PALUMBO C *et al.*, 2003).

### 2.1.2 Osteócitos

Os osteócitos são o tipo celular mais abundante no tecido ósseo (MANOLAGAS SC *et al.*, 2010). São células elípticas, menores que os osteoblastos, que possuem diversos prolongamentos citoplasmáticos, situados no interior de pequenos canais denominados canalículos ósseos. Estes prolongamentos citoplasmáticos se estendem em direção aos prolongamentos de outros osteócitos adjacentes, aos dos osteoblastos e células de revestimento ósseo do endóstio e perióstio, estabelecendo junções (tipo gap) entre estas células. Estas junções do tipo gap entre os prolongamentos dos osteócitos e entre os prolongamentos dos osteoblastos permitem que mesmo os osteócitos localizados nas porções mais profundas do osso possam responder às modificações sistêmicas, bem como às modificações na superfície óssea. Dessa maneira, os canalículos ósseos constituem uma complexa rede que interconecta a superfície óssea às porções mais internas, rede esta que é a responsável pela manutenção e vitalidade da matriz óssea (RAISZ LG *et al.*, 1998). Portanto, os osteócitos são considerados essenciais para a manutenção bem como para a remodelação óssea, desde que tem sido sugerido que a apoptose dos osteócitos pode atrair e estimular a atividade dos osteoclastos (JILKA RL *et al.*, 1998).

### 2.1.3 Osteoclastos

Os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção óssea, promovendo escavações na superfície óssea. O processo de reabsorção pode ser auto-regulável, devido à dissolução mineral que precede a degradação da matriz orgânica, o que significaria o desenvolvimento de uma matriz porosa adjacente à borda em escova do osteoclasto. Esta matriz porosa pode provocar o rompimento da adesão do osteoclasto, resultando em um descolamento deste (TEN CATE AR., 1988).

Além disso, após a reabsorção, os osteoclastos podem migrar para outros sítios onde o tecido ósseo deve ser reabsorvido, bem como se deslocar da superfície óssea e permanecer como células inativas. Os osteoclastos inativos são células gigantes, multinucleadas, porém não apresentam borda em escova e zona clara, estruturas intimamente relacionadas à atividade reabsortiva dos osteoclastos. Assim, o fator de crescimento tumoral (TGF- $\beta$ ) e o estrógeno parecem promover a apoptose, enquanto o paratormônio (PTH) e a Interleucina-1 (IL-1) podem agir como supressores da apoptose, prolongando a atividade osteoclástica (SODEK KL *et al.*, 2000). Apesar de a função principal do osteoclasto ser promover a desmineralização e a degradação da matriz óssea, evidências têm reforçado a idéia de que os osteoclastos são capazes de internalizar e digerir células e/ou restos celulares (SODEK J *et al.*, 1992). Assim, os osteoclastos podem internalizar osteócitos liberados durante a reabsorção óssea. Tem sido sugerido também que osteoblastos em apoptose, possivelmente, podem estimular a migração de osteoclastos para determinados sítios que devem ser reabsorvidos. Os osteoclastos atraídos para o local imediatamente reconhecem e internalizam os osteoblastos e/ou osteócitos em apoptose (CERRI PS *et al.*, 2003).

### 2.1.4 Matriz óssea

O osso é constituído de uma parte orgânica e de outra inorgânica. A matriz orgânica é formada de colágeno, principalmente tipo I, proteoglicanas e glicoproteínas adesivas, e a inorgânica por íons fosfato, cálcio e em menor

quantidade, bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato. A união do fosfato e do cálcio forma cristais com estrutura de hidroxiapatita que, associados às fibras colágenas, fornecem a resistência e dureza características do tecido ósseo (JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J., 2017).

Algumas proteínas não colágenas, típicas dos tecidos mineralizados, como a osteocalcina e a sialoproteína óssea e osteopontina que têm uma distribuição mais generalizada, são liberadas do osso durante a sua desmineralização. Há, ainda, proteínas derivadas do sangue e fluidos teciduais que são concentrados no osso devido à sua afinidade com os cristais minerais, como a albumina e imunoglobulinas (SODEK KL *et al.*, 2000).

Um importante grupo de glicoproteínas, extraídas da matriz óssea desmineralizada, são as proteínas ósseas morfogenéticas-BMPs que são responsáveis pela indução óssea (URIST MR *et al.*, 1984). Classificadas como uma subfamília dentro da família dos fatores de crescimento e transformação- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), podem ser encontradas, além do tecido ósseo, em vários outros tecidos, como cérebro, coração, pulmão, rim, baço e fígado, apresentando papel importante, não só no desenvolvimento do esqueleto, mas também em outros processos fisiológicos, durante a embriogênese (DIMITRIOU R *et al.*, 2005). Pesquisas demonstram que, dentre as mais de 20 BMPs descobertas até o presente momento, há diferenças entre elas na capacidade de induzir a osteogênese.

As BMPs 2, 6 e 9 parecem ter maior potencial na indução da diferenciação osteoblástica a partir das células mesenquimais progenitoras; a BMP-2, quando injetada localmente sobre a superfície da calvária de ratos, induz formação óssea periosteal, sem a formação prévia de cartilagem. “In vivo”, regulam alguns dos processos do desenvolvimento embrionário, incluindo cartilagem e formação óssea. No adulto, as BMPs regulam a proliferação e diferenciação, bem como a apoptose de vários tipos de células, tais como células mesenquimais, osteoblastos, condroblastos, células epiteliais e do tecido nervoso. O alvo final das BMPs é a alteração da expressão gênica no núcleo, mudando, assim, a atividade celular, incluindo o crescimento, diferenciação e síntese de matriz extracelular (MARDEGAN MISSA JP *et al.*, 2019).

### 2.1.5 Reparação Óssea

A osteogênese em defeitos ósseos é um processo de reconstrução tecidual que geralmente demanda tempo (BLUMENFELD Z *et al.*, 2002). O processo de reparo ósseo inicia-se com a formação de uma ferida, levando a uma cascata inflamatória que ativa o processo de hemostasia. Plaquetas formam uma barreira inicial ao meio externo a essa lesão e secreta fatores de crescimento. Associado a isso, fibrinogênio é convertido em fibrina, uma proteína insolúvel criando um coágulo sólido, o que promove suporte para outras células inflamatórias. Após isso, vários outros fatores quimiotáticos como: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento epidermal, histamina e fator von Willebrand são secretados. Todos esses sinais atraem macrófagos e outros leucócitos, retirando tecidos necróticos e bactérias locais e terminando com a fase inflamatória deste processo (COTRELL M *et al.*, 2016).

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

Em um ambiente com condições fisiológicas favoráveis, é comum a cura espontânea desses defeitos, devido à capacidade de regeneração do tecido ósseo local. Entretanto, esse tempo variável para a cura do defeito ósseo pode ser longo devido à lentidão da formação do novo osso, dependendo do suporte sanguíneo local e dos substratos para fortalecer e amadurecer esse osso neoformado. Somando-se à isso, outras alterações podem ocasionar falha de consolidação como: forças adicionais de estresse aplicado no local, alterações hormonais ou nutricionais e instabilidades biomecânicas. Além dessas alterações, perdas ósseas extensas, causam diminuição das propriedades mecânicas, diminuindo a habilidade de formação de calo secundário. Como a maioria das fraturas se consolidam através do calo secundário, o estímulo

mecânico limitado durante este período inicial, aumenta a formação desorganizada deste calo, ao mesmo tempo que o movimento na mesma área contribui para a não consolidação nas últimas fases de reparo da fratura (GASTON MS *et al.*, 2007)

Defeito ósseo de tamanho crítico tem sido definido nas últimas décadas como defeitos que não se curam espontaneamente ou defeitos com tamanho de 2,5 vezes o raio do osso, caracterizando um defeito ósseo crítico, constitui um problema significativo para a formação de osso novo e consolidação óssea. Modelos de defeito crítico avaliam a performance *in vivo* de enxertos ou biomateriais utilizados para seu preenchimento em termos de neoformação óssea, remodelamento, reabsorção do implante e efeitos biológicos locais baseados em estudo radiográfico e histológico. Um modelo de defeito ósseo crítico permite uma avaliação robusta da resposta *in vivo* de um material e se ele pode atingir o objetivo clínico de resolução de um defeito que não cicatriza espontaneamente (COTRELL *et al.*, 2016).

## 2.2 Engenharia Tecidual

Engenharia de tecidos é uma área biotecnológica cujo termo surgiu há aproximadamente 27 anos, para definir um campo de estudos multidisciplinar, que inclui o conhecimento da engenharia de materiais e das ciências biomédicas, ou seja, envolve o conhecimento de várias disciplinas como física, química, biologia e que visa reconstituir, substituir e / ou regenerar tecidos ou órgãos específicos através da implementação de materiais eficazes e práticos, que visam manter a estrutura residual existente bem como permitir o crescimento do tecido, agindo como suportes que promovem a proliferação de tecidos vivos (WINTERMANTEL E *et al.*, 1986) (STOCK UA *et al.*, 2006).

Diversos materiais biodegradáveis têm sido desenvolvidos, com grande versatilidade para modificar diversos parâmetros como velocidade de degradação, propriedades mecânicas, porosidade e tamanho dos poros entre outros, de acordo com as características exigidas para cada aplicação (OREFICE RL *et al.*, 2012).



As matrizes assim desenvolvidas são chamadas de terceira geração. Elas têm propriedades biológicas e físicas compatíveis com as condições fisiológicas *in vitro* e *in vivo* do tecido danificado. Em outras palavras, visa oferecer um suporte temporário com integridade mecânica suficiente para manter a estrutura, e então levar à proliferação, diferenciação e biossíntese celular específica do local onde foi implantado. Para isso, deve apresentar propriedades como ser atóxico, biocompatível, biodegradável, promover e reorganizar as células desejadas, apresentar porosidade adequada para celularização e estar interligado (MIZUNO K *et al.*, 2005)

Para serem assim considerados, os biomateriais de terceira geração devem combinar propriedades de bioabsorvibilidade e bioatividade dentro de um mesmo material, sendo esta última entendida como tendo a capacidade de induzir, estimular, provocar ou modular uma determinada ação biológica no tecido receptor. Um material bioativo é aquele que possibilita uma resposta biológica específica em sua interface com os tecidos, favorecendo a ligação de ambos (OREFICE RL *et al.*, 2012).

Também buscam a estimulação de diferentes respostas celulares a partir de suas características superficiais, de forma que sua função seja, portanto, temporária, uma vez que o material é chamado para ser reabsorvido assim que a função do tecido for restaurada (OREFICE RL *et al.*, 2012).

### 2.2.1 Engenharia Tecidual e Regeneração de Tecido Ósseo

A engenharia de tecidos aplicada ao reparo do tecido ósseo deve garantir que os materiais utilizados como matrizes sejam potencialmente osteoindutores, ou seja, capazes de promover a diferenciação das células progenitoras em células osteoblásticas, osteocondutoras, ou seja, que induzam o crescimento do osso circundante, e ser capaz de osseointegrar, ou seja, de se integrar ao tecido ósseo adjacente, buscando reparar o tecido que está com seu estado biomecânico intacto (CÍCERO AM *et al.*, 2017).

A matriz a ser utilizada como andaime de implante deve apresentar uma arquitetura na qual as células se organizem, promovendo um perfil biomecânico inicial para reposição tecidual até que as células produzam uma matriz

extracelular adequada e a matriz inicial seja degradada ou metabolizada, produzindo o tecido de novo (COINTRY G *et al.*, 2017).

Tudo isso deve ser feito no menor tempo possível, evitando complicações por imobilidade, contaminação e reduzindo os custos sociais e de saúde associados (SODEK KL *et al.*, 2000).

No caso dos materiais de reparo ósseo, a ideia é criar um material que seja capaz de suportar as cargas iniciais e degrada gradativamente, transferindo gradativamente as cargas para o novo osso. A taxa de degradação de uma matriz usada na engenharia de tecido ósseo deve ser lenta, a fim de manter a própria resistência mecânica do tecido até que o tecido ósseo seja regenerado de novo. Desta forma, evita-se um segundo procedimento cirúrgico para a retirada do implante. Os materiais devem ter características que estimulem respostas celulares adequadas e também sejam substituídos gradativamente pelo novo tecido, de forma que sua função seja temporária (IKADA Y *et al.*, 2004; MUSCHLER GF *et al.*, 2007).

### 2.3 Elastina

Os polímeros de proteína são um tipo de polipeptídeos de alto peso molecular cujo design é inspirado por uma série de peptídeos que aparecem repetidamente em algumas proteínas naturais. Hoje, os polímeros de proteínas podem ser produzidos como proteínas recombinantes a partir de uma construção de DNA sintético: recombinantes (RODRÍGUEZ CABELLO JC *et al.*, 2005)

Graças aos recentes avanços na biologia molecular e biotecnologia, o grau de complexidade e controle alcançado na composição final dos recombinâmeros pode ser extraordinariamente alto, muito maior do que aquele alcançado pelos métodos químicos mais avançados na ciência dos polímeros (URRY DW *et al.*, 1991). Portanto, por esses métodos, os polímeros de proteína podem incorporar qualquer função presente em proteínas naturais, como sequências de adesão celular, alvos de protease específicos ou domínios de peso molecular mais alto, como fatores de crescimento (RODRÍGUEZ CABELLO JC *et al.*, 2007).

Vale destacar a família dos recombinâmeros do tipo elastina (ELRs - das palavras inglesas *elastin-like recombinamers*, que significam recombinâmeros

do tipo elastina), especialmente estudados no setor biomédico no qual têm demonstrado grande aplicação e relevância. A própria composição dos ELRs, baseada na repetição de alguns peptídeos encontrados na elastina natural, confere ao material uma série de propriedades que são difíceis de encontrar em outras famílias de polímeros: biocompatibilidade extrema, forte responsividade a estímulos externos, self-montagem e propriedades mecânicas adequadas de seus hidrogéis (DREHER MR *et al.*, 2008) (GARCIA Y *et al.*, 2009).

### 2.3.1 Elastin-like recombinamers (ELRs)

ELRs são uma classe de biomateriais recombinantes sintéticos que derivam da repetição do pentapeptídeo Val-Pro-Gly-X-Gly (VPGXG) encontrado na elastina natural, onde X pode ser qualquer aminoácido, exceto L-Pro. Um estudo de alto impacto sobre o potencial osteorregenerativo de alguns desses recombinâmeros do tipo elastina já foi publicado (COLETTA D *et al.*, 2017)

Neste trabalho utilizaremos um novo tipo de recombinantes ELRs. A inclusão de reticulação e domínios bioativos dentro do polipeptídeo ELR aumenta substancialmente a gama de aplicações para este biomaterial. No primeiro caso, a introdução de resíduos de lisina com grupos amina que podem ser modificados para suportar grupos capazes de se reticular covalentemente por meio de estratégias de 'química de clique', como a cicloadição alcino-azida promovida por cepa (SPAAC), permite a formação de hidrogéis estáveis (GONZÁLEZ TI *et al.*, 2016) (RODRÍGUEZ CABELLO JC *et al.*, 2014).

Por outro lado, diferentes motivos bioativos podem ser adicionados para aumentar a biocompatibilidade dos ELRs, como a adesão celular com o tripeptídeo Arg-Gly-Asp (RGD) e a biodegradação com domínios sensíveis à protease. A este respeito, uma sequência de múltiplos alvos reconhecida pela metaloproteinase da matriz (MMP) -2, 9 e 13 recentemente mostrou resultados ótimos em permitir a regeneração do músculo esquelético (IBÁÑEZ IF *et al.*, 2020). Essas funcionalidades adquiridas, juntamente com suas características inerentes de alta biocompatibilidade (IBÁÑEZ IF *et al.*, 2018), indução de polarização para macrófagos pró-regenerativos tipo 2, estabilidade mecânica e injetabilidade, permitiram que os hidrogéis ELR fossem usados em medicina regenerativa (STAUBLI SM *et al.*, 2017).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

O objetivo do presente estudo foi investigar a ação da ELRs (*Elastin like recombinamers*) e sua resposta de reparo em defeitos ósseos na calvária de coelhos mediante as análises de histologia qualitativa e quantitativa por estereologia; e, tomográfica.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar a biocompatibilidade do material utilizados no reparo de defeitos ósseos na calvária de coelhos, através das análises microscópicas e tomográfica da área cirúrgica;
- Avaliar a reabsorção do biomaterial simultaneamente ao processo de osteogênese na área cirúrgica;
- Caracterizar a morfologia do tecido ósseo neoformado na área da lesão;
- Quantificar o tecido ósseo neoformado por análise histológica;
- Quantificar fibras colágenas e vasos sanguíneos na lesão óssea por análise histológica;
- Analisar radiograficamente da lesão por meio de tomografia computadorizada.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Preparação e Seleção das matrizes

As ELRs (*elastin-like recombinamers*) usadas neste trabalho foram biossintetizadas por métodos de engenharia genética, conforme realizado no trabalho de Rodríguez Cabello *et al.*, 2012.

O gene que codifica para o recombinâmero foi clonado em um vetor de plasmídeo pET-25b (+) (Novagen, Merck, Alemanha) que foi usado para transformar a cepa de *Escherichia coli* (BLR (DE3); Novagen, Merck, Alemanha). Em seguida, um clone que expressa ELR foi cultivado em um biorreator de 15 L (Applikon Biotechnology BV, Holanda) e o ELR foi purificado por vários ciclos de resfriamento e aquecimento, incluindo centrifugação.

Em seguida, a solução de ELR altamente pura foi dialisada com água ultra-pura e filtrada através de filtros de 0,22µm (Nalgene, Thermo Fisher Scientific, EUA) para esterilização. A solução foi liofilizada antes do armazenamento.

As ELRs usadas foram HRGD6 e HE5 (COSTA RR *et al.*, 2009) (CONTESSOTTO P *et al.*, 2020).

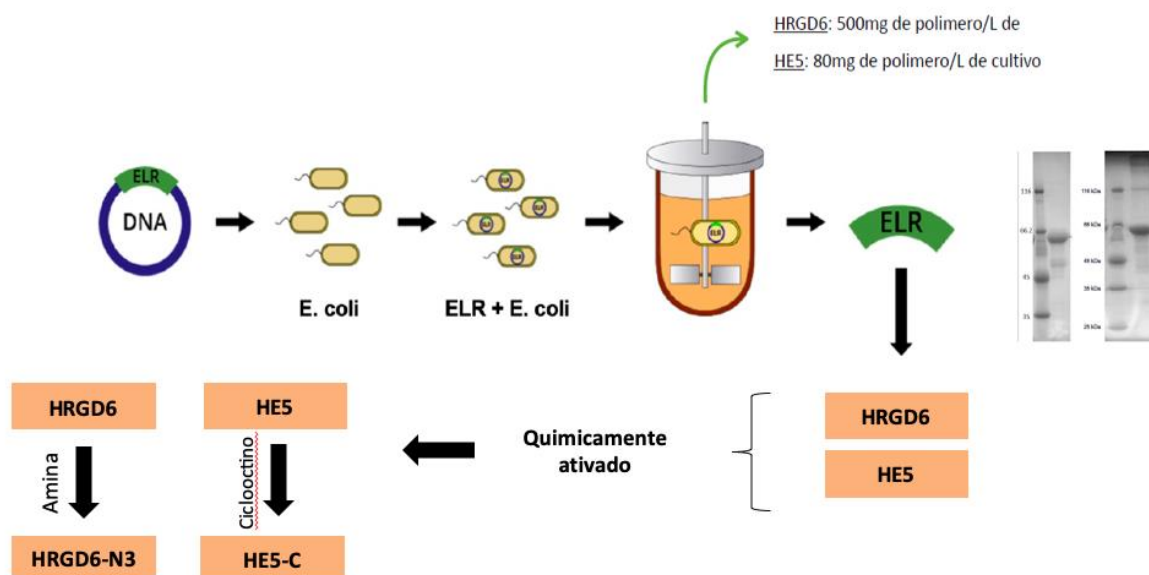
HRGD6 contém sequências de adesão celular (RGD), enquanto HE5 inclui domínios sensíveis a MMP para biodegradação. Ambos compreendem domínios ricos em lisina para modificação química e subsequente reticulação covalente para formação de hidrogel.

Os métodos de caracterização para cada lote de ELR incluirão eletroforese em gel de poliacrilamida de sulfato de sódio (SDS-PAGE) e tempo de ionização a laser assistido por matriz (MALDI-TOF) para a avaliação da pureza e do peso molecular, HPLC para determinar a composição de aminoácidos e calorimetria de varredura diferencial (DSC) para o cálculo da temperatura de transição. Os níveis de endotoxina foram avaliados pelo ensaio *limulus ameobocyte lysate* com o sistema Endosafe®-PTS (Charles River Laboratories, Inc., EUA) e estarão sempre abaixo de 1 unidade de endotoxina / mg de ELR.

## 4.2 ELR quimicamente ativado

A modificação química das ELRs foi realizada conforme descrito anteriormente para a reticulação mediada por SPAAC (BELLIDO T *et al.*, 2013). Por um lado, o ELR contendo domínios de adesão celular RGD (HRGD6) foi quimicamente modificado com grupos amida por meio da transformação do grupo  $\epsilon$ -amina encontrado na cadeia lateral de resíduos de lisina, alcançando 55-65% de modificação (de 14 a 16 lisinas modificadas, de 24), e dando um HRGD6-N3. Por outro lado, o ELR compreendendo motivos sensíveis a MMP (HE5) foi modificado de forma semelhante, neste caso para conter grupos ciclo-octino (alcino ativado), resultando em 30-40% de modificação (3 a 4 lisinas modificadas, de 9) e denominado HE5-C. Esses ELRs modificados foram usados para a formação de hidrogéis ELR reticulados covalentemente (Figura 1).

Figura 1: Esquema da preparação e seleção das matrizes; e, ERL quimicamente ativado.

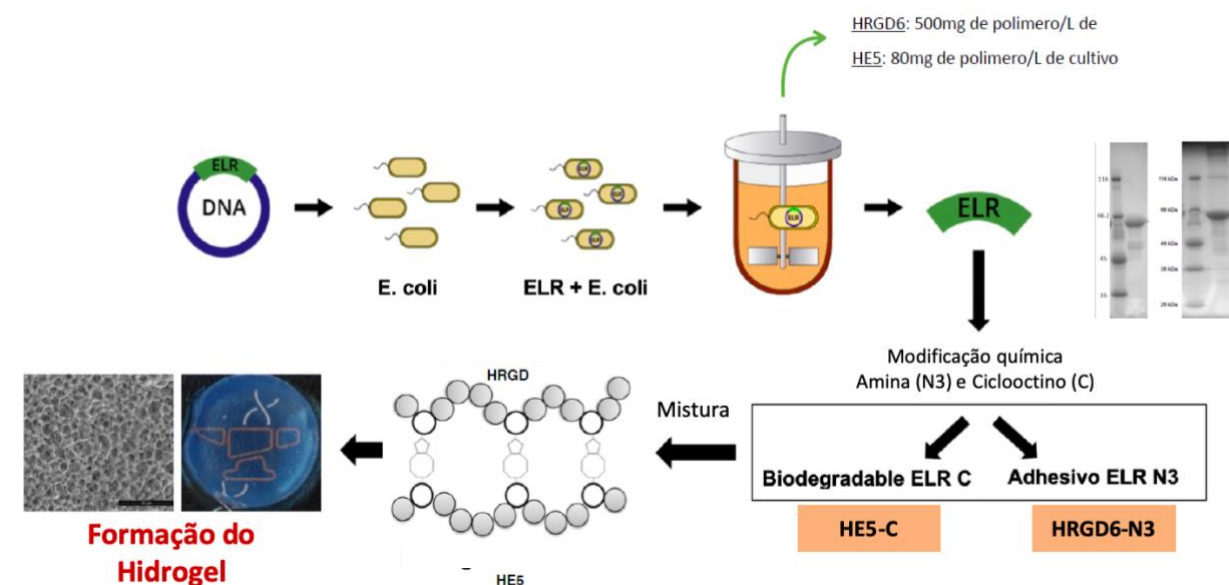


## 4.3 Preparação do hidrogel

### 4.3.1 Preparação de hidrogéis ELR para administração *in vivo*

HRGD6-N3 e HE5-C foram dissolvidos em PBS 1X frio estéril em tubos separados por 16-24 h. Em seguida, eles foram misturados antes da injeção na proporção de 1: 1, que era a proporção ideal para formar hidrogéis estáveis a 50 mg/mL, considerando sua diferença de peso molecular e percentagem de modificação química. A mistura foi incubada por 8 minutos em um banho de gelo para reticulação inicial homogênea e, posteriormente, pipetada para o local da lesão, onde o processo de formação do hidrogel será concluído (Figura 2).

Figura 2: Esquema da preparação e formação do Hidrogel.



#### 4.4 Seleção dos animais

Foram utilizados 5 coelhos da linhagem Nova Zelândia (4 meses) sexo feminino, mantidos em gaiolas individuais e em ambiente com temperatura estável ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro), alimentados com comida específica para coelhos e água *ad libitum*, na Argentina (LABOATEM). Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nacional de Rosário, resolução número 6838/2019, que seguiu os padrões internacionais para manejo e seleção de animais (**Anexo A**).

#### 4.5 Preparação pré-operatória

Um ambiente cirúrgico estéril foi preparado por irradiação ultravioleta. O material cirúrgico foi esterilizado com óxido de etileno. Profilaxia antibiótica antes do procedimento cirúrgico com Cefazolina na dose de 50 mg / kg / dia por via intramuscular. Os animais foram pesados para proporcionar corretamente a dose do anestésico. Para todos os procedimentos experimentais os animais receberam anestesia geral, com a associação de 35 mg/kg de Cloridrato de Cetamina e 18 mg/kg de Cloridrato de Xilazina. Nos casos em que não houve o efeito necessário do anestésico, a anestesia foi suplementada com a metade da dose inicial aplicada.

#### 4.6 Técnica Cirúrgica

A área a ser intervencionada foi raspada com máquina elétrica e foi escovada com solução de iodopovidona a 10,0%, coberta com campos estéreis inteiros e fenestrados (Figura 3A).

A intervenção teve início com uma incisão cutânea longitudinal de aproximadamente 4 cm, na área a ser lesada (Figura 3B). O ponto central da perfuração foi demarcado com sodela e imediatamente foi feita com trefina montada em motor elétrico estéril, atingindo profundidade não superior a 3mm e



com 10 mm (Figura 3C) de diâmetro em cada lado da calvária (Figura 3D). Os ELRS foram mantidos em condições estéreis em meio com gelo picado e foram misturados antes da colocação no local do implante, as pontas para colocação no local do implante foram mantidas em condições estéreis em *freezer* em  $-4^{\circ}\text{C}$  antes de usar.

Uma vez combinados os dois ELRS, o hidrogel foi implantado rapidamente, em lesões não superiores de 3mm e com 10 mm de diâmetro (Figura 4A), observando se ocorrem processos de gelificação ao entrar em contato com a temperatura corporal, sendo o lado direito da calvária não recebeu o hidrogel, formando o grupo controle e o lado esquerdo recebeu o hidrogel formando o grupo tratado com ELRs (Figura 4B).

Figura 3: Sequência da Técnica Cirúrgica- A) Solução de iodopovidona a 10,0%; B/C) Incisão cutânea longitudinal de aproximadamente 4 cm; D) Divulsão dos tecidos; E/F) Broca trefina montada em motor elétrico estéril.

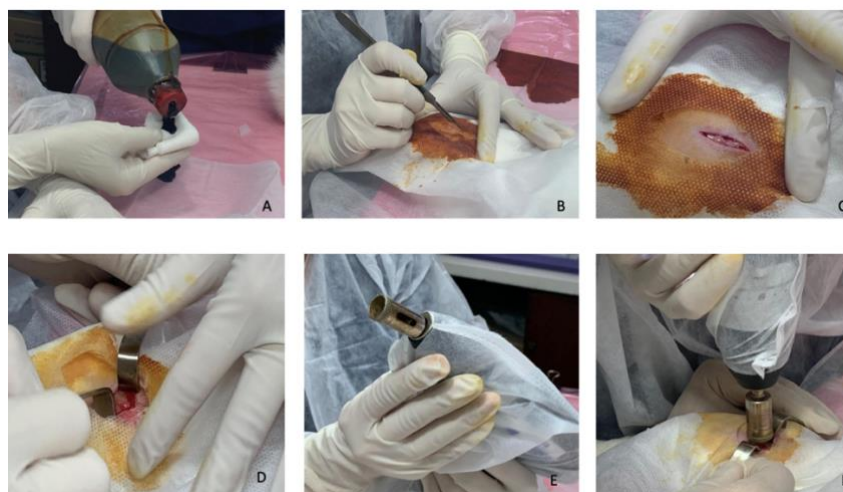
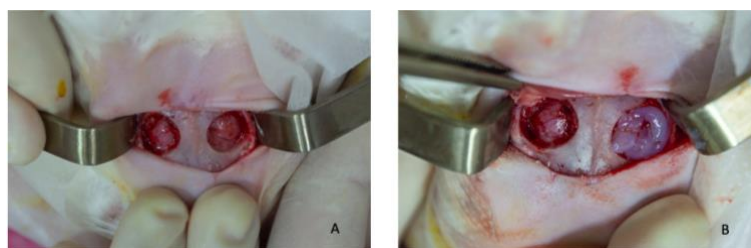


Figura 4: Sequência da Técnica Cirúrgica- A) Profundidade da lesão não superior a 3mm e com 10 mm de diâmetro em cada lado da calvária; B) Lado Direito não recebeu o hidrogel e Lado Esquerdo o hidrogel foi implantado rapidamente, observando se o processo de gelificação.



#### 4.7 Planejamento experimental

Para cada um dos testes os coelhos foram divididos em dois grupos (n = 5 para cada grupo). Foi realizada uma lesão na calvária de cada lado. O lado direito não recebeu nenhum tipo de implante (Grupo D- Controle). E o lado esquerdo recebeu 200  $\mu$ l de Hidrogel (Grupo E- tratado com ELRs) (Tabela 1) (Figura 5).

Tabela 1. Distribuição dos grupos experimentais: Lado Direito (D) grupo controle e Lado Esquerdo (E) grupo tratado com Elastina.



Grupos	Grupo Controle	Grupo Tratado com ELRs
Animais	Lado Direito (D)	Lado Esquerdo (E)
Coelho 1	D1	E1
Coelho 2	D2	E2
Coelho 3	D3	E3
Coelho 4	D4	E4
Coelho 5	D5	E5

Figura 5: Modelo experimental utilizado neste estudo.


## PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

**5 coelhos**  
Linhagem Nova Zelândia  
4 meses  
Sexo feminino


**Os animais foram submetidos a procedimento cirúrgico na calvária:**

Incisão cutânea longitudinal de aproximadamente 4 cm



Profundidade da lesão não superior a 3mm e com 10 mm de diâmetro em cada lado da calvária



Lado Direito não recebeu o hidrogel (Controle);  
Lado Esquerdo com hidrogel de Elastina (Grupo Tratado).

Os animais receberam antibiótico. O ambiente foi controlado com ciclo de luz claro/escuro e com dieta ração comum e água *ad libitum*.

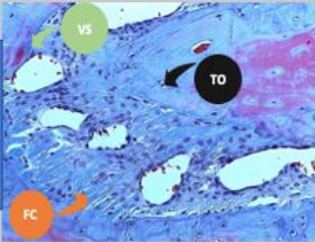
**Cada animal com 2 grupos experimentais**

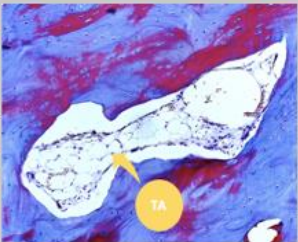
	Lado Direito (D) da calvária- CONTROLE	Lado Esquerdo (E) da calvária- TRATADO com ERLs
	Grupo Controle	Grupo Elastina
	Lado Direito (D)	Lado Esquerdo (E)
Animais		
Coelho 1	D1	E1
Coelho 2	D2	E2
Coelho 3	D3	E3
Coelho 4	D4	E4
Coelho 5	D5	E5

**Eutanásia dos animais indolor por anestesia após 130 dias (LABOATEM)**

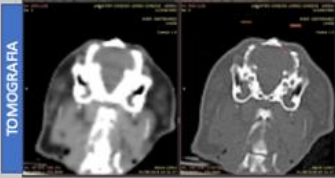
**Análises Histológicas e Tomográficas**

HISTOLOGIA





TOMOGRAFIA



TO: Tecido Ósseo  
VS: Vasos Sanguíneos  
FC: Fibras Colágenas  
TA: Tecido Adiposo

Fonte: próprio autor.

#### **4.8 Cuidados pós-operatórios**

Após o tratamento, as bordas do tecido cutâneo incisado foram reposicionadas na linha mediana e unidas, por meio de sutura com fio de seda 4.0 de modo a refazer a integridade do tecido cutâneo. Em seguida, cada animal recebeu o tratamento com analgésico Tramadol 100mg/kg peso animal, injeção subcutânea e do antibiótico Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, injeção intramuscular, no volume de 0,1 mL/100 g de peso continuou por 5 dias.

#### **4.9 Eutanásia dos animais e obtenção das amostras**

Após o período pré-determinado de 130 dias de criação do defeito ósseo, os animais foram anestesiados com a associação Xylazina + Ketamina (75-100mg/Kg e 5-10mg/Kg, respectivamente), injetada por via intramuscular. Após a confirmação das perdas do reflexo postural e da sensibilidade à dor, os animais foram decapitados e a cabeça dissecada para a obtenção da calvária. As amostras da calvária foram destinadas para as análises histológica e radiográficas para os fatores considerados.

#### **4.10 Processamento Histológico**

A calvária foi removida, utilizando-se para isso tesouras e pinças adequadas. Os tecidos moles presentes foram cuidadosamente separados deste tecido ósseo do crânio, para a obtenção do fragmento ósseo contendo o defeito com margem de segurança.

As calvárias foram divididas ao meio (Grupo D e Grupo E) e esses fragmentos foram imersos na mesma solução fixadora por 24 horas. O preparo das amostras para microscopia de luz foi realizado no Departamento de Morfologia, Fisiologia e Patologia Básica (DMFPB) da FORP.

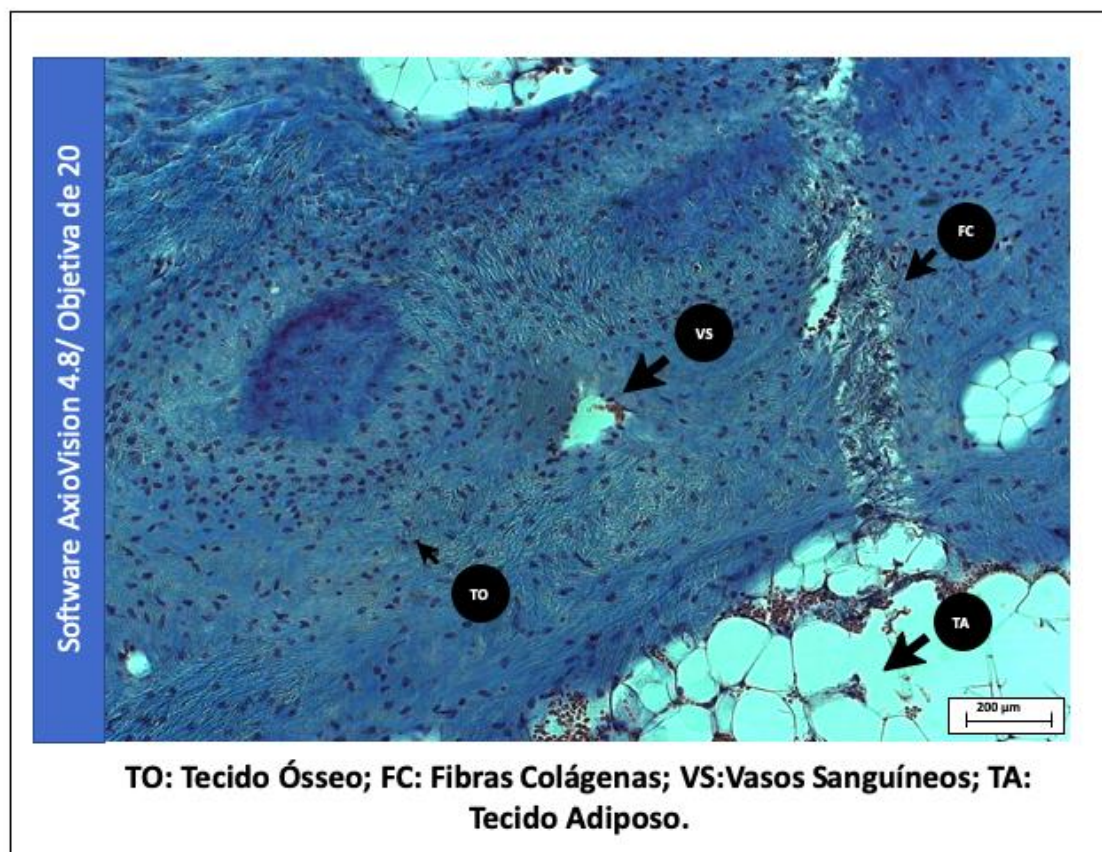
Após a fixação por 24 horas, as amostras foram lavadas em água corrente e imersas em solução de etileno-diamino-tetracetato-dissódico (EDTA) a 10% – solução descalcificante. Durante o período de descalcificação as amostras foram mantidas em frascos individuais com tal solução em volume vinte vezes superior

ao seu, à temperatura ambiente e sob agitação. Com o objetivo de neutralizar a ação do EDTA, após a descalcificação, as amostras foram imersas em sulfato de sódio a 5%, durante 24 horas. O preparo seguiu com desidratação das amostras – feita com banhos em álcoois em uma série de concentrações crescentes: 70%, 90%, 95% e 100% - permanecendo as amostras 2 horas em cada solução. Finalizada a desidratação, as amostras foram diafanizadas em xilol – por meio de três banhos com duração de 2 horas cada e incluídas em parafina no sentido cranial para apical. Os blocos contendo os ossos da calvária foram cortados sagitalmente em micrótomo (Leica RM2255®) – cortes seriados de 5 micrometros ( $\mu\text{m}$ ) e, posteriormente, corados com Tricrômio de Masson. Para cada animal foram feitos 20 cortes.

#### **4.11 Coloração dos cortes para análise histológica**

A coloração para histologia foi feita por Tricrômio de Masson (Figura 6). Para que os cortes pudessem ser corados foram desparafinizados através de soluções de xilol – três banhos com duração de 10 minutos cada. Em seguida foi realizada a hidratação desses cortes – feita com álcoois em concentrações decrescentes: 100%, 100%, 100%, 90% e 70% - cada imersão durou 3 minutos e lavagem em água corrente por 3 minutos. Na sequência as lâminas foram imersas em solução de hematoxilina de Groat por 10 minutos e lavadas em água corrente e água acética a 1% (água destilada + ácido acético glacial). A seguir, as lâminas foram imersas em solução rouge de Mallory por 5 minutos e lavadas com solução de água acética a 1% durante 3 minutos, por duas vezes. As lâminas então foram imersas em solução de ácido fosfomolibídico a 10% e lavadas em solução de água acética. Em continuação, as lâminas foram colocadas em solução de azul de anilina por 10 minutos e lavadas em solução de água acética a 1% (três vezes durante três minutos cada). O procedimento foi finalizado com imersões em álcool absoluto – três banhos de três minutos cada. E três banhos de xilol de 5 minutos cada. Posteriormente foi realizada a montagem das lâminas – estabilização da lamínula com Entellan.

Figura 6. Fotomicrografia de uma lâmina histológica corada por Tricrômio de Masson da calvária do grupo tratado com ELRs ilustrando o tecido ósseo neoformado (TO), destacando a presença de fibras colágenas (FC), vasos sanguíneos (VS) e tecido adiposo (TA) , aumento real de 20 vezes, através microscópio de luz acoplado a uma câmera digital, Axioimager Z2 Zeiss e software AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).



## 4.12 Análise por microscopia de luz

### 4.12.1 Tecido Ósseo Neoformado

A análise quantitativa óssea foi realizada por meio de fotomicrografias das lâminas histológicas das calvárias do lado direito e esquerdo de cada animal. As imagens das lâminas coradas por Tricrômio de Masson (Figura 7) foram capturadas com o auxílio de uma câmera digital acoplada ao microscópio de luz Zeiss Axiomager Z2 (Oberkochen, Alemanha) auxiliado por uma Estação de trabalho DELL Precision T3500 (DELL, São Paulo, Brasil), na objetiva de 5, para ter uma imagem mais panorâmica da lâmina possível. Foram usadas 10 lâminas por cada grupo experimental, e em cada lâmina 5 fotos, sendo 4 fotos periféricas e 1 foto central. Total foram 50 fotos por grupo experimental para quantificação.

O software AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), após calibração técnica inicial, reconhece os tons de azul da coloração, sendo dessa maneira o osso neoformado, utilizada por meio da pré-seleção com o cursor do “mouse” o tom de azul a ser quantificado, conforme exemplificado na figuras 8. A área óssea foi circundada e seus valores gerados foram utilizados para os testes estatísticos em  $\mu\text{m}^2$  / área (Figura 9).

Figura 7: Fotomicrografia da lâmina da calvária do coelho corada com Tricrômio de Masson.

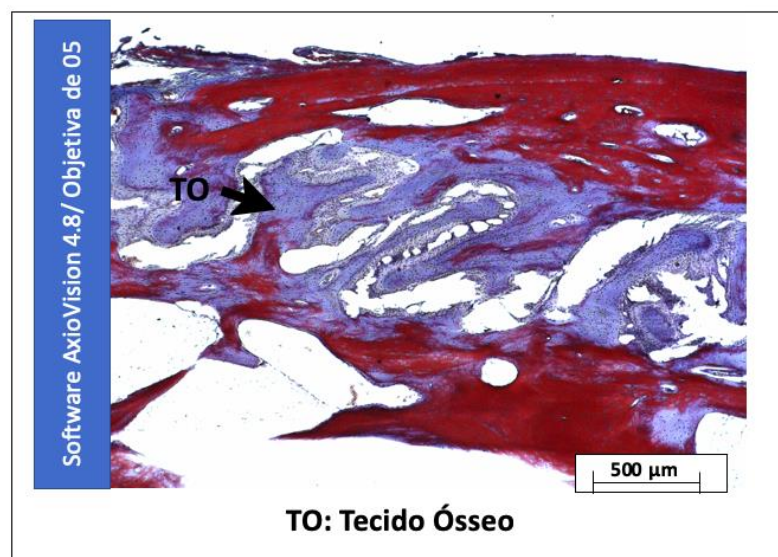


Figura 8: Fotomicrografia da lâmina da calvária do lado do grupo tratado com ERLs corada com Tricrômio de Masson. A área circundada pela cor verde representa a área identificada pelo Software AxioVision 4.8 (Zeiss, 5X).

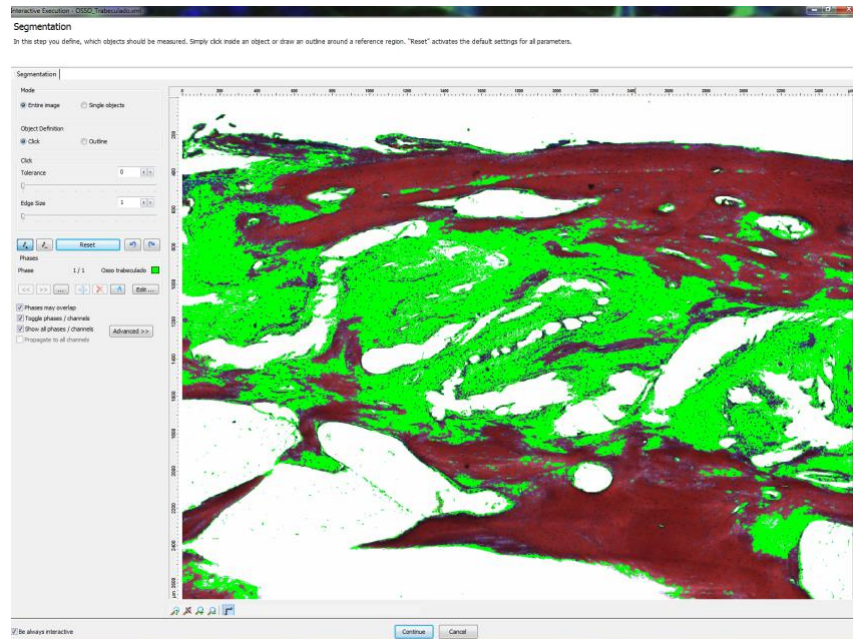
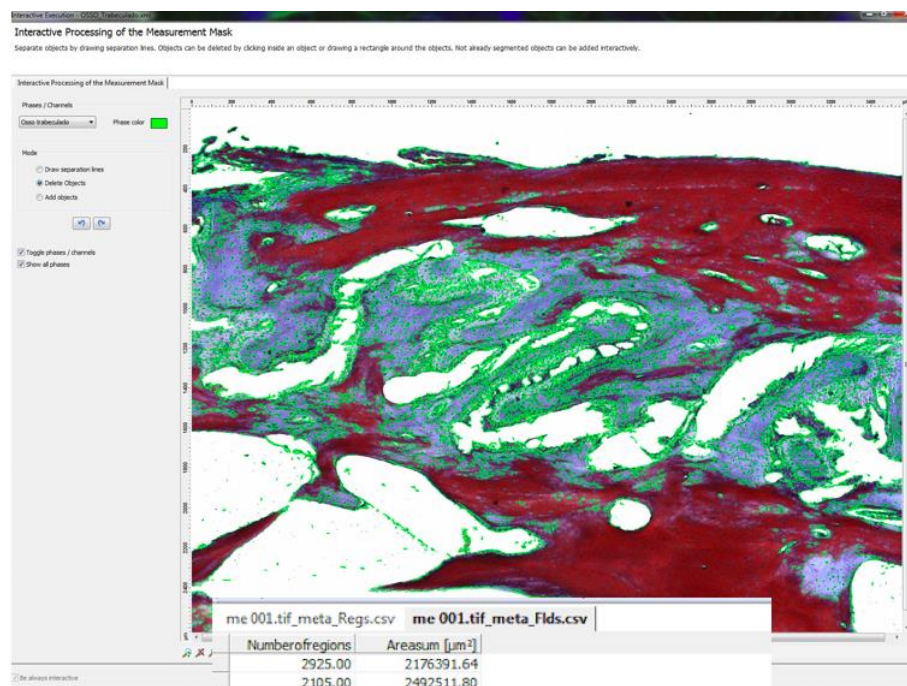


Figura 9: Fotomicrografia da lâmina da calvária do lado do grupo tratado com ERLs corada com Tricrômio de Masson. A região marcada em verde foi transformada em pontos para correta leitura e quantificação de tecido ósseo. O resultado obtido em  $\mu\text{m}^2$  / área- Software AxioVision 4.8 (Zeiss,5X).





#### 4.12.2 Fibras colágenas

Para a análise das fibras colágenas as lâminas histológicas foram coradas com a coloração de Tricrômio de Masson (Imagem 10) que permitiu observar as fibras colágenas do tipo I e III através do programa *ImageJ*. Para esta análise quantitativa destas fibras foram capturados 05 campos histológicos na área de tecido ósseo neoformado, sendo 1 campo central e 4 campos periféricos. Foram capturadas 20 imagens para cada grupo experimental.

Foi realizada a análise de densitometria óptica das fibras colágenas tipo I e III através do programa *ImageJ* que captou as fibras colágenas através do Filtro *FastRed FastBlue DAB*. Ao aplicar o filtro alguns pontos, que não são fibras, também podem ser identificados, devendo ter o cuidado em apagá-los. Em sequência, foi feita a mensuração da área com fibras colágenas de cada corte histológico (Imagem 11). Os resultados em porcentagem área foram colados em tabelas no Excel para análise estatística.

Imagem 10: Lâmina histológica do Grupo Tratado com ELRs para quantificação de Fibras Colágenas. Coloração em Tricrômio de Masson. Aumento de 20 vezes.

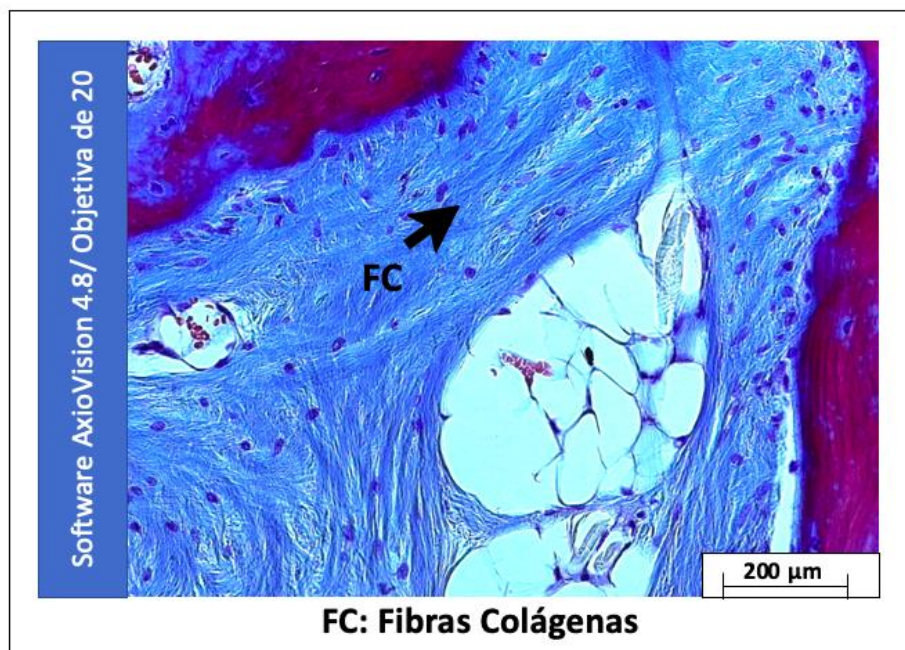
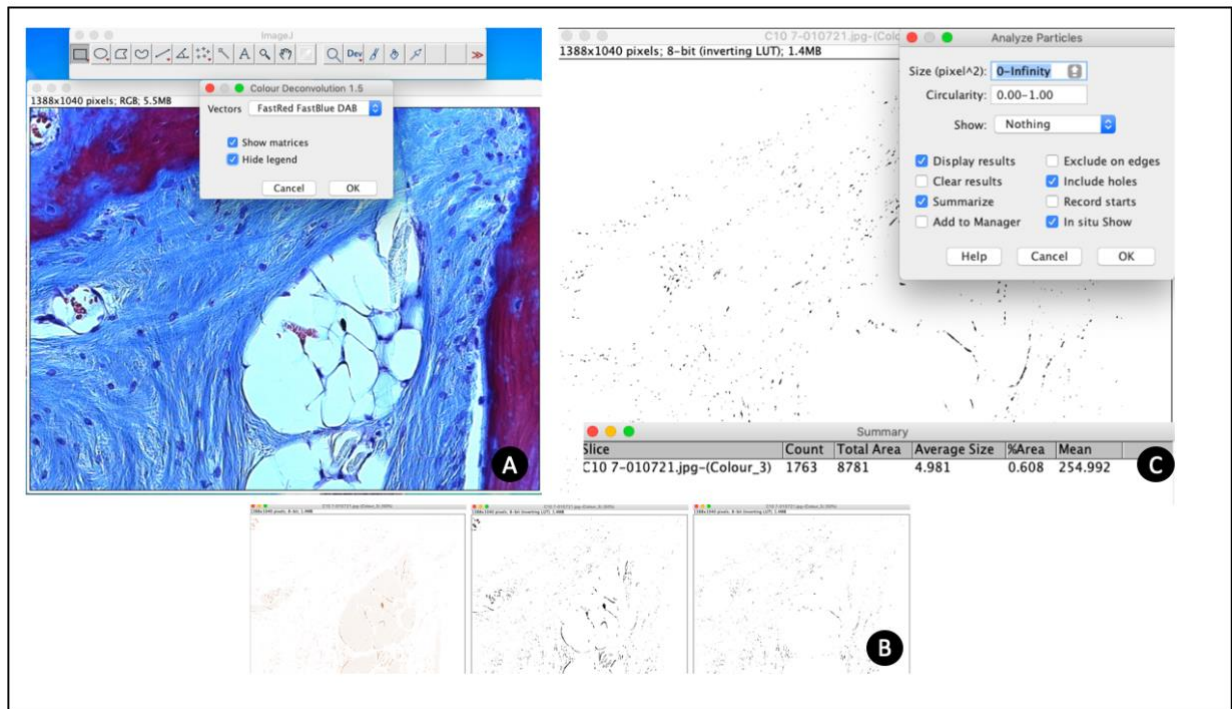


Imagem 11: Sequência para quantificação de fibras colágenas através do Programa *Image J*.

A) Programa *ImageJ*, com o filtro FastRed Fast Blue DAB para identificação das fibras colágenas; B) Sequência do programa para identificação de fibras colágenas; C) Análise quantitativa de fibras colágenas por imagem em % área.



### 4.12.3 Vasos Sanguíneos

Para a análise de vasos sanguíneos as lâminas histológicas foram coradas com a coloração de Tricrômio de Masson (Imagem 12) que permitiu observar através do programa *ImageJ*. Para esta análise quantitativa foram capturadas 20 imagens histológicas na objetiva de 20, de forma aleatória, de cada animal. Para a quantificação de vasos foi realizado uma proporção através de grades por 17821 pixels área por ponto. Em sequência, foi feita a mensuração da intersecção de pontos dentro dos vasos e através de regra de três foram obtidos a quantidade de vaso por porcentagem área da imagem (Imagem 13). Os resultados foram colados em tabelas no Excel para análise estatística.

Imagem 12: Lâmina histológica do Grupo tratado com ELRs para quantificação de Vasos Sanguíneos. Coloração em Tricrômio de Masson. Objetiva de 20.

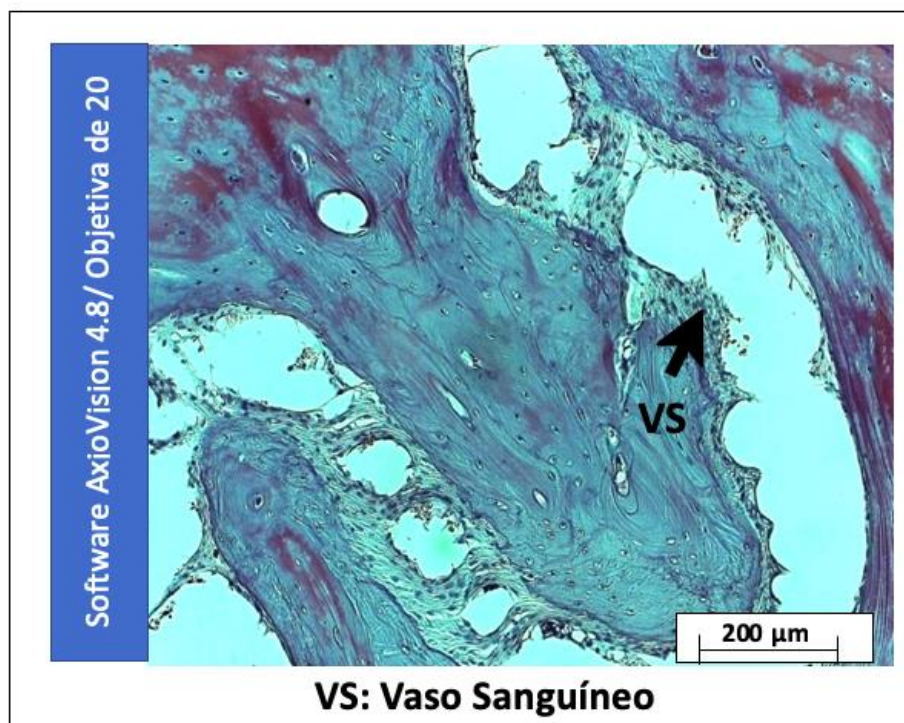
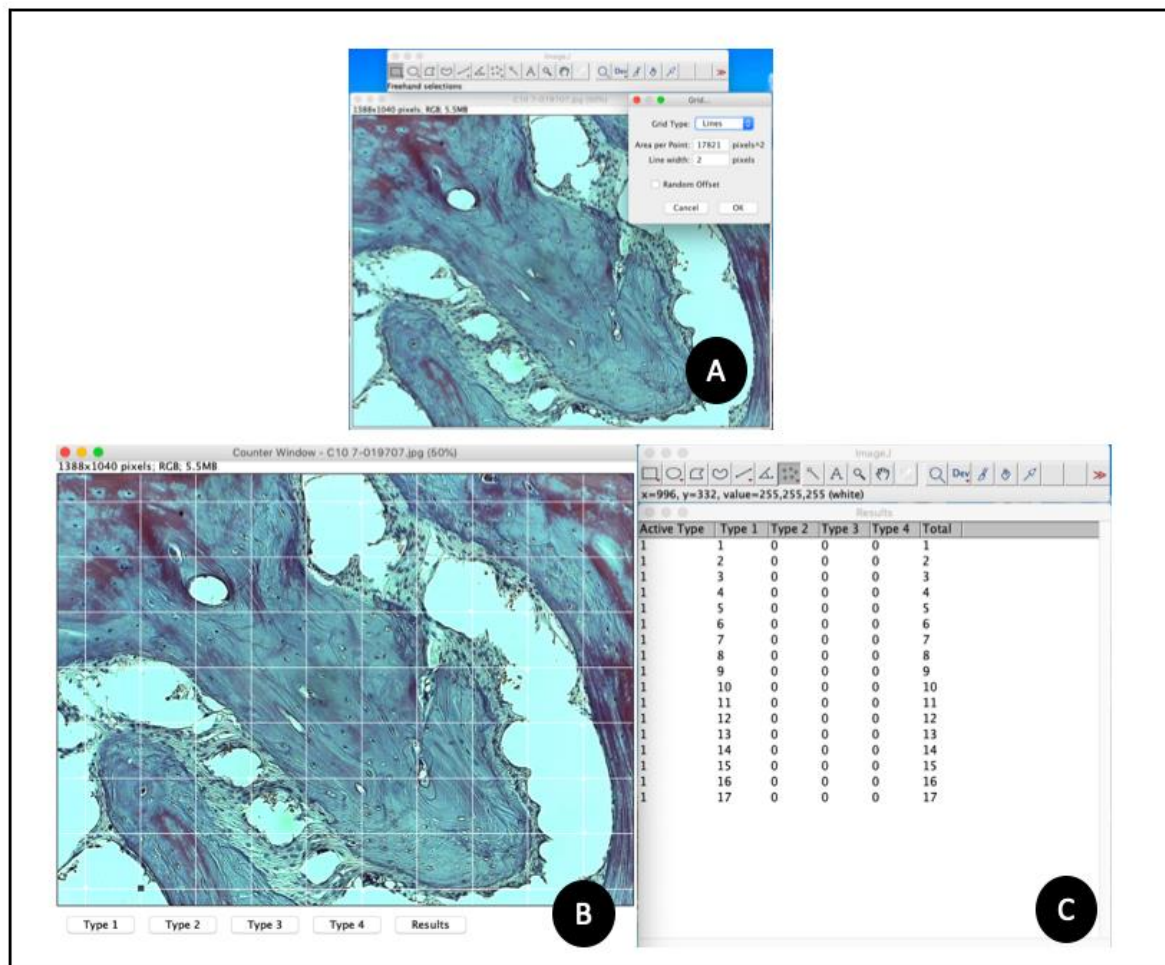


Imagem 13: Sequência para quantificação de Vasos Sanguíneos através do Programa *Image J*.  
 J. A) Programa *ImageJ*, com colocação de grades (17821 pixels área por ponto); B) Contagem dos pontos na área de intersecção; C) Número de vasos quantificados pelo programa.



#### **4.13 Análise estatística**

Para análise estatística dos dados histológicos (neoformação óssea; fibras colágenas; e, vasos sanguíneos) foram realizados os testes de *Kolmogorov-Smirnov* e *Shapiro-Wilk*. Para a análise tomográfica foi realizado o teste de Test de Wilcoxon. Os dados foram testados quanto a normalidade, e uma vez que apresentaram distribuição normal foi realizado teste t pareado. Foi adotado nível de significância de 5%.

## 5 Resultados

### 5.1 Análise clínica dos animais

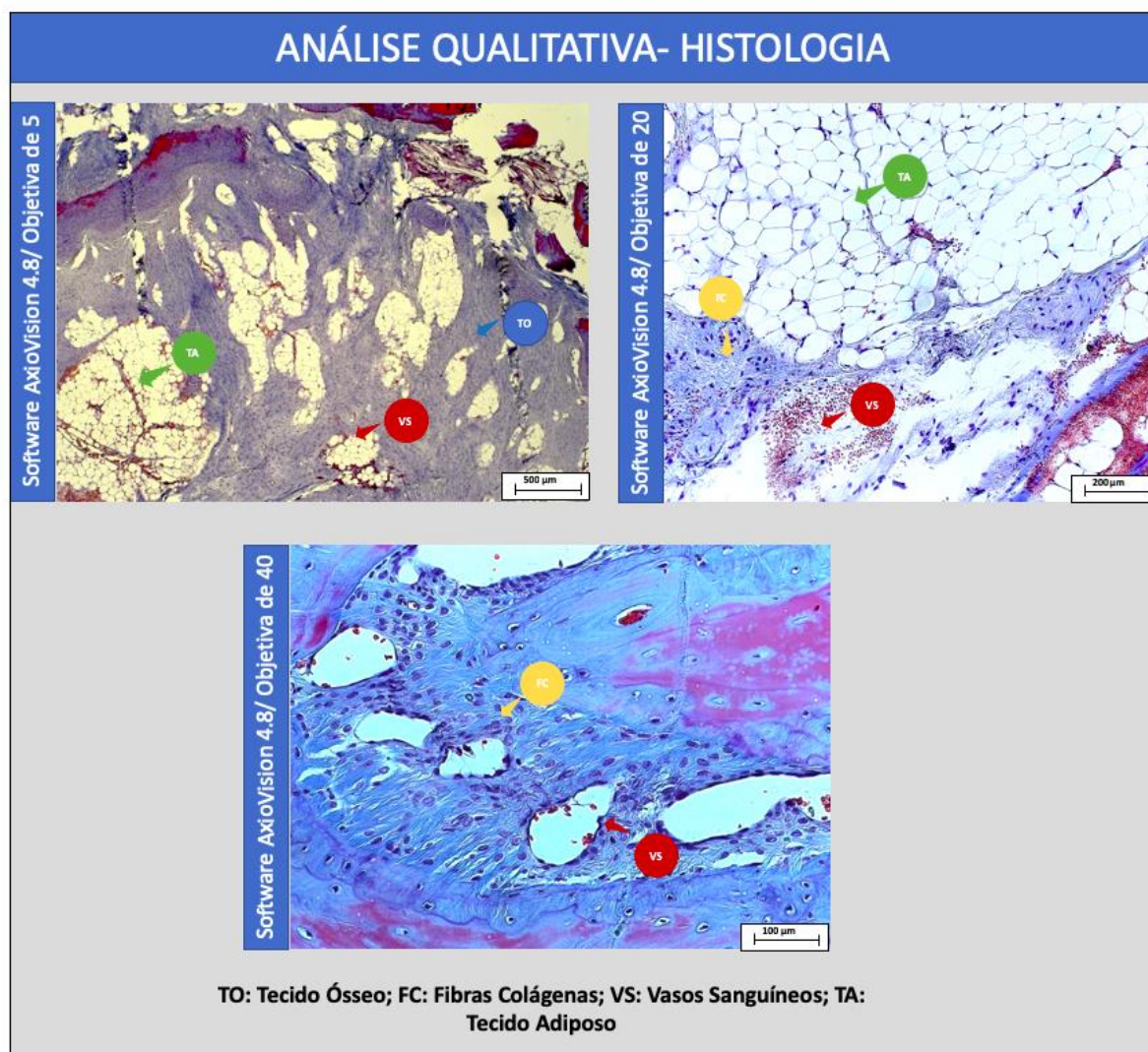
Os resultados demonstraram que na comparação clínica entre os animais do grupo Controle e os animais do grupo Tratados com ELRs não apresentaram diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) quanto à massa corporal, variando entre 3 a 3,5 Kg; temperatura corporal entre 38,5 e 40,5 °C; e, cicatrização da ferida entre período de aproximadamente 15 dias. Não houve perda de nenhum animal, todos estavam perfeitos no mesmo dia após reanimação da anestesia. Foram mantidos em gaiolas individuais, no qual se alimentaram normalmente com ração própria e água *ad libitum*.

### 5.2 Análise histológica qualitativa

A análise qualitativa dos cortes histológicos da área do enxerto permitiu avaliar o processo do reparo da falha óssea através da observação das características do osso neoformado. Foi utilizado microscópio de luz acoplado a uma câmera digital, Axioimager Z2 Zeiss (Alemanha) auxiliado por uma Estação de trabalho DELL Precision T3500 (DELL, São Paulo, Brasil) instalados na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP/USP). As imagens digitais obtidas a partir da coloração de Tricrômio de Masson foram analisadas pelo software AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

Com objetiva de 05 de aumento em lâminas do grupo tratado com ELRs foi possível observar a presença de tecido ósseo neoformado (TO) em grande quantidade. Além de tecido ósseo, uma grande quantidade de fibras colágenas (FC) e vasos sanguíneos (VS) também foram encontrados, ilustrado no esquema da Figura 14. Em sequência foram analisados e quantificados através do Programa *Image J* (NIH, EUA), utilizando os plugins necessários para este feito, conforme descrito anteriormente em Material e Métodos (4.12- Análise por microscopia de luz).

Figura 14: Esquema de fotomicrografias de uma lâmina histológica do Grupo Tratado com ELRs corado por Tricrômio de Masson, em diferentes aumentos, ilustrando a formação do tecido ósseo em seta azul (TO), destacando a presença fibras colágenas em seta amarela (FC), tecido adiposo em seta verde (TA) e vasos sanguíneos em seta vermelha (VS)- Software AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).



Fonte: próprio autor.

### 5.3 Análise quantitativa histológica

A análise quantitativa foi realizada através das médias percentuais obtidas após a quantificação de tecido ósseo neoformado, fibras colágenas, vasos sanguíneos e tecido adiposo, por meio de fotomicrografias das lâminas histológicas, exemplificadas na figura 15 para o grupo controle e na figura 18 para o grupo tratado com ELRs, utilizando o software *Axion Vision 4.8* (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), descrito anteriormente em Material e Métodos- Análise por microscopia de luz.

Na figura 15 tem uma sequência de fotomicrografias das lâminas coradas com Tricômio de Masson do grupo controle, no qual pode-se observar em uma imagem panorâmica (Figura 15A), com objetiva 5, a presença de tecido ósseo neoformado e osso maduro. Verificou com maior aumento, objetiva de 20, as estruturas histológicas de fibras colágenas e vasos sanguíneos (Figura 15B) e tecido adiposo (Figura 15C).

Já para o grupo tratado com ELRs a sequência de fotomicrografias das lâminas coradas com Tricômio de Masson foi representada pela Figura 16. Em uma imagem panorâmica, com objetiva de 5, observa-se o tecido ósseo neoformado, osso maduro, fibras colágenas, vasos sanguíneos, tecido adiposo (Figura 16A). Verificou com maior aumento as demais estruturas: Tecido Ósseo Neoformado- objetiva de 20 (Figura 16B); Tecido Adiposo- Objetiva de 20 (Figura 16C); Vasos Sanguíneos e Fibras Colágenas- objetiva de 40 (Figura 16D); e, as células dos Osteoblastos- objetiva de 100 (Figura 16E) depositando próximo a matriz óssea.



Figura 15: Grupo Controle- Fotomicrografias das lâminas das calvárias coradas com Tricômio de Masson do grupo controle, onde: (A) Imagem panorâmica com objetiva de 5, no qual pode-se observar Tecido Ósseo Neoformado e Tecido Mineralizado (Ósseo Maduro); (B) Tecido Ósseo Neoformado, Fibras Colágenas e Vasos Sanguíneos- objetiva de 20; (C) Tecido Adiposo- objetiva de 20. Software AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

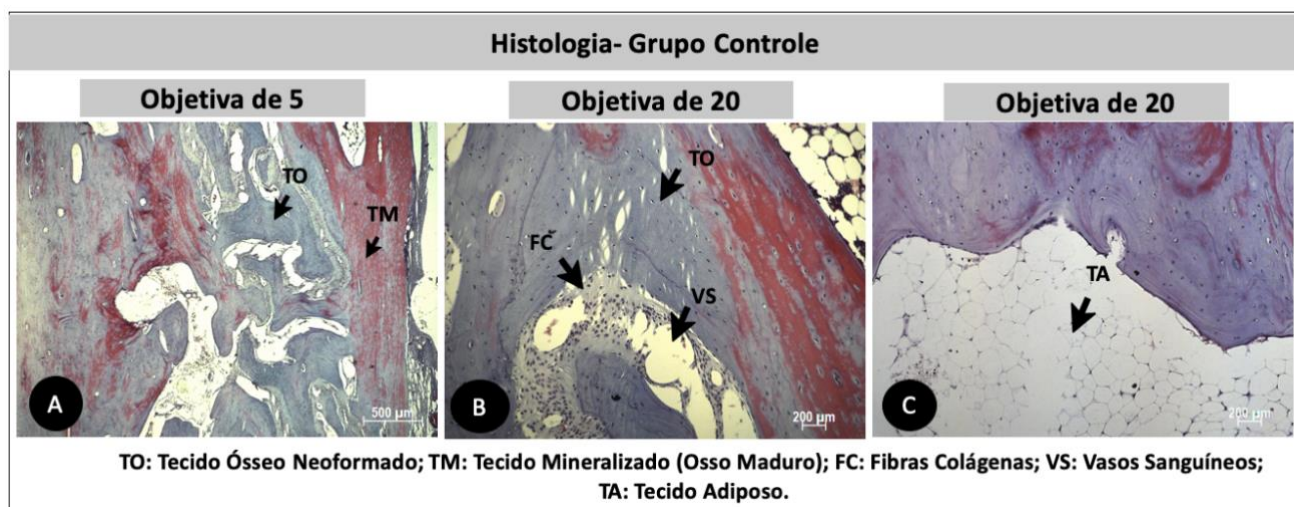
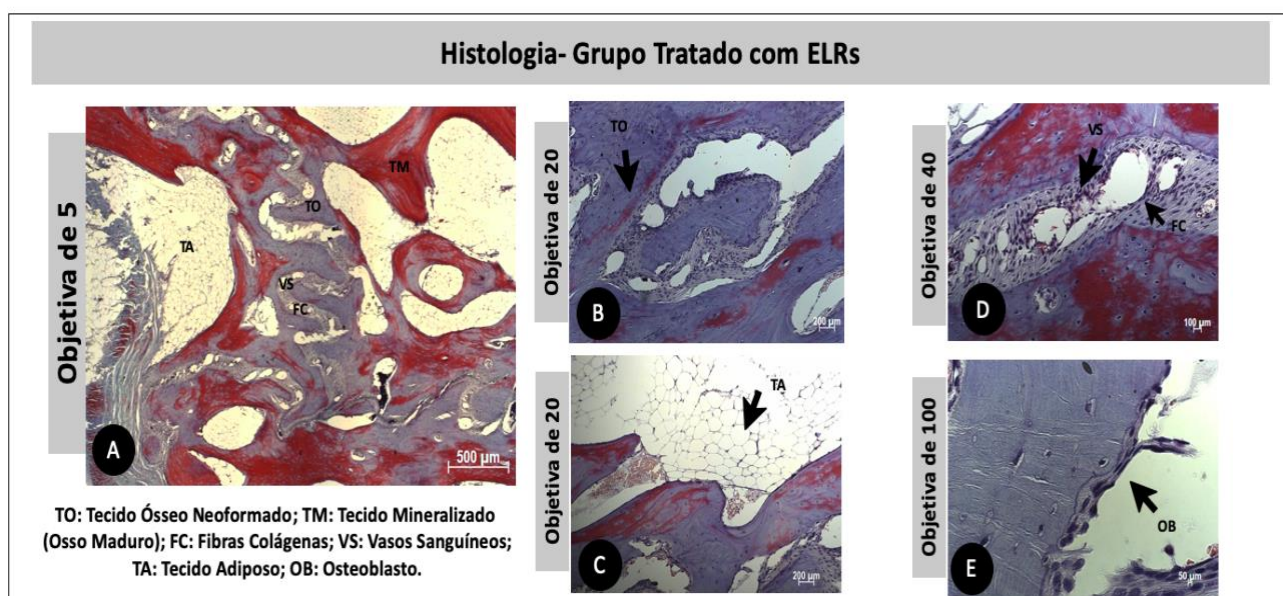


Figura 16: Grupo Tratado- Fotomicrografias das lâminas das calvárias coradas com Tricômio de Masson do grupo tratado com ELRs, onde: (A) Imagem panorâmica com objetiva de 5, no qual pode-se observar em maior aumento representado pela seta: (B) Tecido Ósseo Neoformado- objetiva de 20; (C) Tecido Adiposo- Objetiva de 20; (D) vasos Sanguíneos e Fibras Colágenas- objetiva de 40; (E) Osteoblastos- objetiva de 100. Software AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).



Os resultados obtidos através das quantificações foram testados quanto a normalidade, e uma vez que apresentaram distribuição normal foi realizado teste t pareado. Foi adotado nível de significância de 5% (Tabela 2).

Tabela 2: Teste de Normalidade (*Kolmogorov-Smirnov* e *Shapiro-Wilk*), nível de significância de 5%. Tecido Ósseo Neoformado, Tecido Adiposo, Fibras Colágenas e Vasos Sanguíneos.

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
FB.T	,296	5	,175	,827	5	,133
FB.C	,229	5	,200*	,918	5	,518
VA.T	,275	5	,200*	,895	5	,384
VA.C	,330	5	,079	,792	5	,070
OS.T	,218	5	,200*	,894	5	,375
OS.C	,199	5	,200*	,962	5	,819

\*. Este é um limite inferior do verdadeiro significado.

a. Correção de significância de Lilliefors.

Os valores médios (desvio padrão) estão apresentados nos gráficos abaixo na Figura 17 e na Tabela 3. Não foi encontrada diferença significativa para o tecido adiposo entre os grupos ( $p=0,836$ ). Para as demais variáveis foi encontrada diferença significativa entre os grupos (Fibras  $p=0,001$ ; Vasos  $p<0,001$ ; Tecido neoformado  $p=0,001$ ) com maiores valores para o lado Tratado. A tabela 4 apresenta o resultado do teste t pareado para cada variável.

Tabela 3: Média (desvio padrão) entre os grupos Controle (Lado Direito da Calvária) e Tratado com ELRs (Lado esquerdo da Calvária) -Análise Tecido Ósseo Neoformado, Fibras Colágenas, Vasos Sanguíneos e Tecido Adiposo.

	Média (desvio padrão)	
	Controle	Tratado
Fibra Colágena	1,73 (0,21)	3,44 (0,54)
Proporção de Vaso	14,23 (0,57)	23,06 (0,69)
Tecido ósseo neoformado	7,14 (0,55)	9,90 (0,18)

Figura 17: Gráficos comparação grupo controle com grupo tratado isoladamente. Não foi encontrada diferença significativa para o tecido adiposo entre os grupos ( $p=0,836$ ). Para as demais variáveis foi encontrada diferença significativa entre os grupos (Fibras  $p=0,001$ ; Vasos  $p<0,001$ ; Tecido ósseo neoformado  $p=0,001$ ) com maiores valores para o lado Tratado.

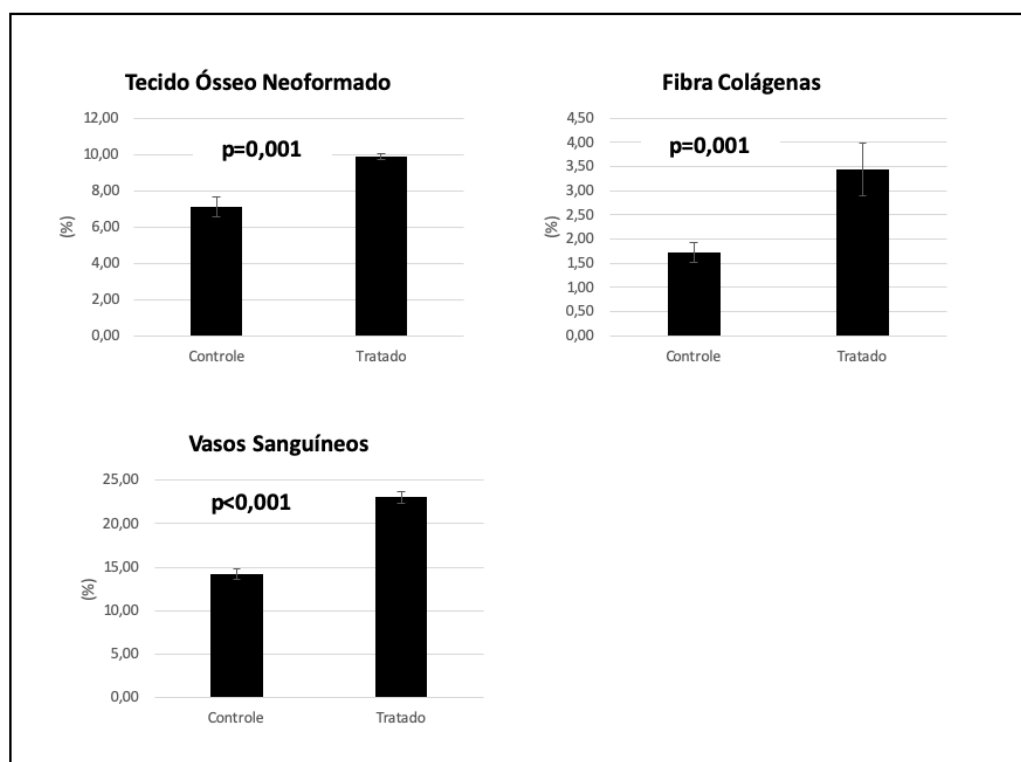


Tabela 4: Apresenta o resultado do teste t pareado para cada variável. Não foi encontrada diferença significativa para o tecido adiposo entre os grupos ( $p=0,836$ ). Para as demais variáveis foi encontrada diferença significativa entre os grupos (Fibras  $p=0,001$ ; Vasos  $p<0,001$ ; Tecido Ósseo neoformado  $p=0,001$ ) com maiores valores para o lado Tratado.

Tete t pareado									
Diferenças pareadas									
		Média	Desvio padrão	Erro padrão da média	95% Intervalo de confiança da diferença		t	df	Sig. (2-tailed)
					Limite Inferior	Limite Superior			
Pair 2	FB.T - FB.C	1,71320	0,41329	0,18483	1,20003	2,22637	9,269	4	0,001
Pair 3	VA.T - VA.C	8,83750	0,66819	0,29883	8,00783	9,66717	29,574	4	<0,001
Pair 4	OS.T - OS.C	2,75894	0,63889	0,28572	1,96566	3,55222	9,656	4	0,001

## 5.4 Análise tomográfica

A tomografia computadorizada foi realizada em equipamento Activion16-Toshiba, com aquisição isotrópica, com reconstruções nos planos axial, sagital e coronal, com filtro especial para estruturas ósseas e para tecidos moles realizados no LABOATEM (Imagem 18) (Tabela 5).

Nos cortes das calvárias avaliadas foi encontrada uma diferença em favor das lesões implantadas em relação àquelas sem implante. Nas imagens do grupo tratado com ELRs, o tecido apresentou uma densidade semelhante ao tecido mineralizado. No grupo controle, o tecido mole foi principalmente não mineralizado. O diâmetro Lesão com Implante x Lesão Sem Implante foi comparado por meio do teste de Wilcoxon, onde foram observadas diferenças significativas, com  $p$  bem abaixo de 0,05 (Imagem 19).

Imagem 18: Imagens da Tomografia Computadorizada, sendo lado direito o grupo Controle e o lado esquerdo o grupo tratado com ELRs, equipamento Activion16- Toshiba.

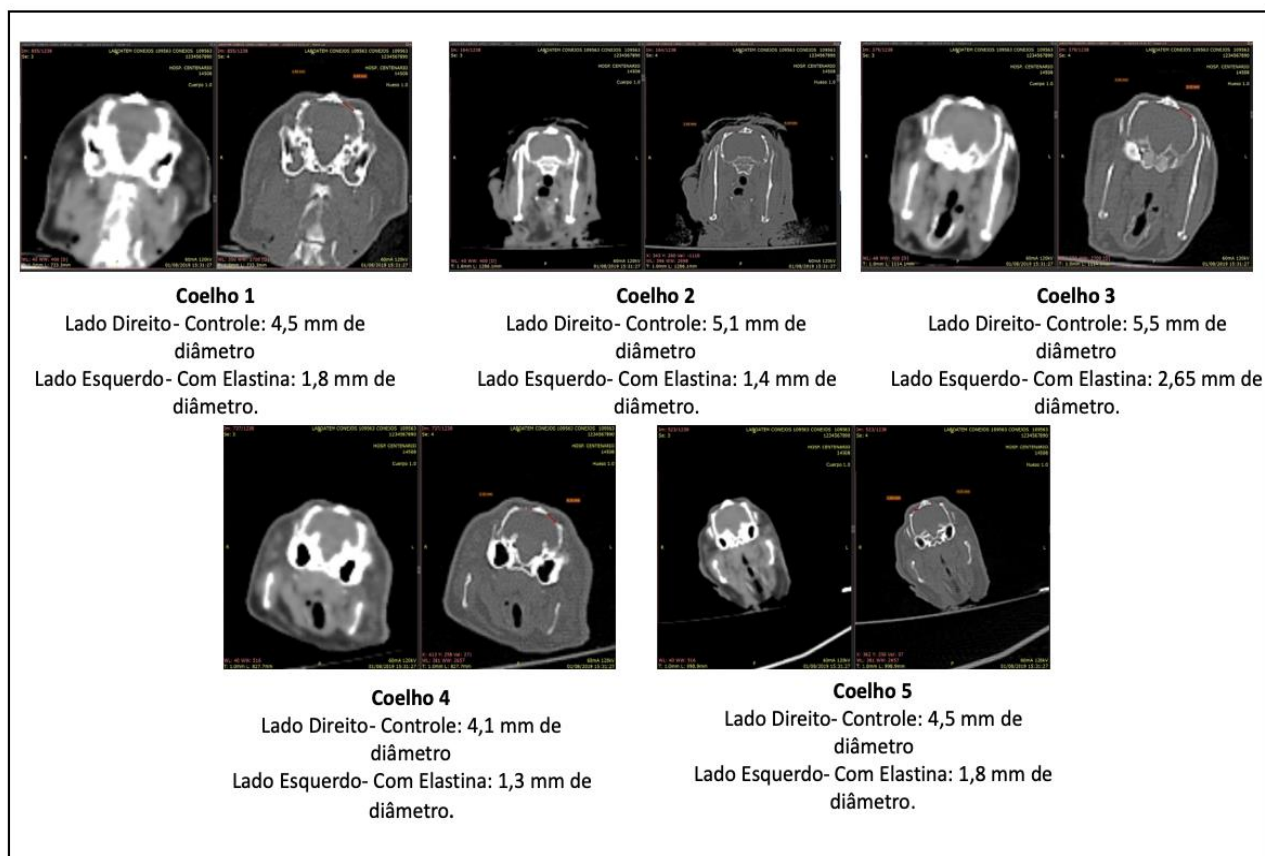
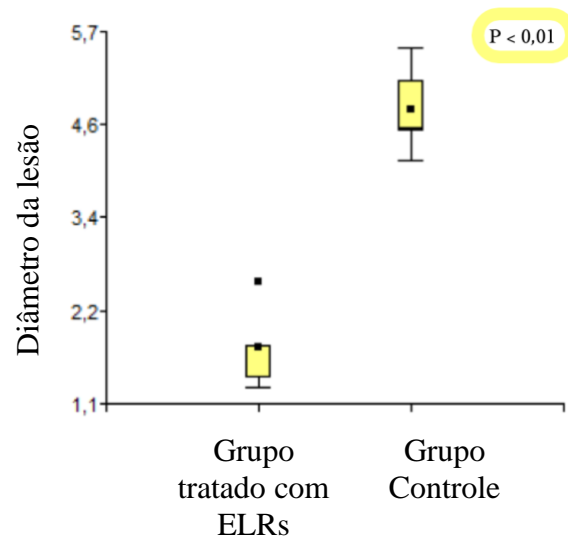


Tabela 5: Resultados Tomografia.

COELHO 1	Diâmetro da lesão (mm)	Score
Direito (Controle)	4,5	3
Esquerdo (com Elastina)	1,8	2
COELHO 2	Diâmetro da lesão (mm)	Score
Direito (Controle)	5,1	3
Esquerdo (com Elastina)	1,4	2
COELHO 3	Diâmetro da lesão (mm)	Score
Direito (Controle)	5,5	3
Esquerdo (com Elastina)	2,65	2
COELHO 4	Diâmetro da lesão (mm)	Score
Direito (Controle)	4,1	3
Esquerdo (com Elastina)	1,3	2
COELHO 5	Diâmetro da lesão (mm)	Score
Direito (Controle)	4,5	3
Esquerdo (com Elastina)	1,8	2

Imagem 19: Resultado Estatístico Tomografia Computadorizada- O diâmetro Lesão com Implante x Lesão Sem Implante foi comparado por meio do teste de Wilcoxon, onde foram observadas diferenças significativas, com p menor que 0,01.



## 6 Discussão

Neste estudo utilizou-se o modelo experimental com coelhos brancos do sexo feminino da linhagem da Nova Zelândia. A literatura aponta que o coelho é um modelo adequado e viável para estudos experimentais para várias áreas da medicina e odontologia, por apresentarem como vantagens animais fáceis de serem manuseados e observados; apresentarem ciclos vitais curtos de gestação, lactação e puberdade (sexo feminino); permitirem padronização genética; e, permitirem transplante ou transmissão de tumores. No entanto, a pesquisa com coelhos apresenta também algumas desvantagens, como por exemplo o custo animal, sendo dessa maneira a razão pela qual usamos o número de 5 (cinco) coelhos para a pesquisa aproveitando em um mesmo coelho os dois lados da calvária, sendo o lado direito da calvária o grupo controle e o lado esquerdo da calvária o grupo tratado com ELRs (CALASANS MAIA MD *et al.*, 2009).

Neste trabalho foi utilizado técnicas de engenharia de tecidos que corresponde uma área de atuação multidisciplinar que desperta interesse crescente com objetivo de auxiliar na reparação de tecidos lesionados com a ajuda de biomateriais. Foi utilizada a ELRs no qual são materiais modificados através de um processo de preparação com hidrólise alcalina. A literatura aponta que este método promove a remoção das células teciduais que poderiam provocar rejeição imunológica melhorando a biocompatibilidade do material e ainda transforma a matriz nativa em uma estrutura porosa (MASSIMINO LC *et al.*, 2017; FELDMAN SARA *et al.*, 2020). Estes resultados estão de acordo com nosso estudo, evidenciando adequada biocompatibilidade dos aloenxertos baseados na matriz extracelular submetidos a hidrólise alcalina (HIRATA HH *et al.*, 2015) (MORAES R *et al.*, 2017). Estes resultados também podem estar relacionados a baixa imunogenicidade das membranas obtidas pela remoção das células através deste tipo de tratamento químico das matrizes.

Em relação a análise histológica é importante discutir sobre o corte de maneira sagital e também a coloração usada através de Tricômio de Masson.

Foi usado de maneira inédita o corte sagital das calvárias dos coelhos neste estudo. Não tendo relatos na literatura sobre esse tipo de corte na região anatômica, foi observado que houve uma certa dificuldade no momento da execução do corte e, como consequência, perda considerável de material. Ao serem analisadas posteriormente no microscópio também não foi observada nenhuma contribuição diferente a ser discutida.

Quanto a coloração foi usada a de Tricômio de Masson. De acordo com a literatura, o termo Tricômio é utilizado para soluções que apresentam três corantes em sua composição, sendo elas Fucsina Ácida, Ponceau de Xilidina e Orange G. O método Tricômio de Masson é considerado “Padrão Ouro”, sendo um dos melhores, principalmente por caracterizar e discriminar diferentes tecidos conjuntivos e componentes de tecidos moles, combinando com a técnica mais precisa das hematoxilinas (ferro de Heidenhain hematoxilina) com uma coloração citoplasmática confiável que dá uma riqueza de detalhes (Fucsina Ácida com Ponceau de Xilidina), e um efeito muito seletivo para corar tecido conjuntivo (verde claro ou azul anilina). Dessa maneira, com a coloração de Tricômio de Masson foi possível identificar nas nossas lâminas a presença de tecido ósseo neoformado, tecido ósseo maduro, fibras colágenas, tecido adiposo e vasos sanguíneos (SIQUEIRA MM *et al.*, 2018).

Nossos resultados de histologia demonstraram que o lado da calvária tratada com ELRs apresentou maiores resultados com a formação de tecido ósseo, fibras colágenas e vasos sanguíneos. Em relação a presença de vasos sanguíneos pode-se sugerir, de acordo com a literatura, uma resposta inflamatória dos tecidos circunjacentes ao tecido ósseo (GEORGE C *et al.*, 2017).

Já em relação a grande quantidade de vasos sanguíneos observado na análise histológica deste trabalho para o grupo tratado pode ser justificada na literatura através do trabalho de Kishor K. Sivaraj e Ralf H. Adams (2016) no qual mostrou que além de seu papel convencional como um sistema de conduíte para gases, nutrientes, resíduos de produtos ou células, os vasos sanguíneos no sistema esquelético desempenham papéis ativos no controle de vários aspectos da formação óssea e fornecem nichos para células-tronco hematopoiéticas que



residem dentro do medula óssea. Além disso, outros estudos também destacaram papéis para vasos sanguíneos durante a consolidação óssea, porém demonstrado em ossos longos. No caso deste trabalho foi realizada em calvária (OLIVEIRA GR *et al.*, 2019). Dessa maneira, a formação e a homeostase do sistema esquelético dependem da atividade integrada de vários diferentes tipos de células. Esta ligação entre osteogênese e angiogênese também tem implicações importantes para a compreensão de doenças ósseas e envelhecimento. Os ossos passam por constantes remodelações em todo a vida do organismo, e isso envolve a atividade contínua de células osteogênicas e osteoclastos. O equilíbrio entre os ossos formação e reabsorção é a chave para manter forte e totalmente ossos funcionais ao longo da vida e, conseqüentemente, um desequilíbrio entre esses processos pode resultar em reduções ósseas relacionadas à idade densidade mineral (osteopenia), perda óssea osteoporótica e aumento risco de fratura (SIVARAJ KK *et al.*, 2016).

Ainda neste estudo foi observado maior quantidade de formação de tecido ósseo neoformado e fibras colágenas em maior quantidade no grupo tratado com diferença estatística está de acordo com a literatura. Ficou evidente a presença da regeneração óssea concomitante com presença de fibras de colágeno, estando de acordo com Prakasam *et al.* (2017), que reafirmou a necessidade da biodegradabilidade dos materiais, como um processo ao longo de um período de tempo suficiente para auxiliar a regeneração tecidual. Os biomateriais utilizados na cicatrização tecidual proporcionam um substrato provisório para a migração e diferenciação celular e deposição de uma nova matriz extracelular. Dessa maneira o biomaterial apresenta uma velocidade de degradação contínua, proporcionando um novo ambiente para a infiltração e proliferação celular tecidual regenerativa. Além disso, os produtos da degradação devem ser metabolizados e eliminados sem causar toxicidade local ou sistêmica (PRAKASAM *et al.*, 2017). Os resultados histológicos dos grupos com lesões ósseas tratadas com ELRs (Lado Esquerdo), seguiram o padrão esperado apresentando maior neoformação óssea (MACHADO, 2018). Ao analisar estudos progressos 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 osteogenerativa 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 (MACHADO EG, 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 K *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 MD *et al.*, 2015).

Além destes achados, na análise tomográfica dos gupos tratados com ELRs notou a cicatrização da lesão óssea produzida experimentalmente, com bordas regulares, sem áreas de rarefação, e o centro com imagem radiolúcida e linhas radiopacas esparsas. Este aspecto pode ser indicativo de presença de tecido ósseo neoformado ou resquícios dos biomateriais implantados, cuja radiopacidade é insuficiente para ser perceptível ao exame radiográfico conforme descrito na literatura (CUNHA MR *et al.*, 2011). Estes achados indicaram a ausência de sinais radiológicos típicos sinalizadores de rejeição imunológica, além da manutenção da integridade da calvária.

A biodegradabilidade observada nesta pesquisa está de acordo com os resultados esperados quanto a boa qualidade do material enxertado, podendo ser comprovada ao notar-se o maior volume neoformado nos grupos enxertados em relação ao grupo controle. Notou-se da mesma forma no presente estudo, características de baixa imunogenicidade e toxicidade dos produtos da degradação das membranas, uma vez que não foram evidenciadas áreas de reabsorção óssea nas bordas dos defeitos ósseos enxertados, devido aos achados das análises radiográficas e histológicas. Além disso, a tropoelastina, o monômero precursor da elastina, alterna sítios hidrofílicos e hidrofóbicos em sua estrutura. Diversos trabalhos sugeriram que a propriedade hidrofóbica da superfície do material diminuiria a velocidade de degradação, melhorando a sua capacidade regenerativa (ISSA JP *et al.*, 2016). Dessa maneira a biodegradabilidade observada nesta pesquisa está de acordo com os resultados esperados quanto a boa qualidade do material enxertado, podendo ser comprovada ao notar-se o maior volume neoformado nos grupos enxertados em relação ao grupo controle.

## **7 Conclusão**

Neste modelo experimental a ELRs contribuiu positivamente na formação de tecido ósseo neoformado, dados comprovados através histologia pela quantificação do trabeculado ósseo formado na área de lesão da calvária, fibras colágenas e vasos sanguíneos e também pelos dados radiográficos através da tomografia. Portanto, o biomaterial estudado apresentou capacidade osteogênica e houve osteointegração na falha óssea induzida experimentalmente; e, biocompatibilidade. Dessa maneira salienta-se a necessidade da realização novas pesquisas a fim de avançar os conhecimentos sobre as diversas variáveis envolvidas na capacidade osteorregenerativa comparando com outros biomaterias, permanece como um objetivo a ser alcançado num futuro próximo à pesquisa.

## REFERÊNCIAS

AMRUTHWAR, Shruti S.; JANORKAR, Amol 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.

ARANA-CHAVEZ, Victor E.; MASSA, Luciana F. Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 36, n. 8, p. 1367-1373, 2004.

BELLIDO, Teresita; SAINI, Vaibhav; PAJEVIC, Paola Divieti. Effects of PTH on osteocyte function. **Bone**, v. 54, n. 2, p. 250-257, 2013.

BITTENCOURT, Athelson Stefanon et al. Coloração de espécimes anatômicos para aplicação no processo de plastinação por meio de corantes histológicos: Floxina B, Safranina, Fucsina Fenicada e Tricrômico de Masson.

BLUMENFELD, Z. et al. Fertility after treatment for Hodgkin's disease. **Annals of Oncology**, v. 13, p. 138-147, 2002.

BOABAID, F.; CERRI, Paulo Sérgio; KATCHBURIAN, E. Apoptotic bone cells may be engulfed by osteoclasts during alveolar bone resorption in young rats. **Tissue and Cell**, v. 33, n. 4, p. 318-325, 2001.

CALASANS-MAIA, M. D. et al. O coelho como modelo animal para cirurgia experimental. **Acta Cir Bras**, v. 24, p. 325-328, 2009.

CERRI, Paulo Sérgio. Osteoblasts engulf apoptotic bodies during alveolar bone formation in the rat maxilla. **The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology: An Official Publication of the American Association of Anatomists**, v. 286, n. 1, p. 833-840, 2005.

CERRI, Paulo Sérgio; BOABAID, F.; KATCHBURIAN, E. Combined TUNEL and TRAP methods suggest that apoptotic bone cells are inside vacuoles of alveolar bone osteoclasts in young rats. **Journal of periodontal research**, v. 38, n. 2, p. 223- 226, 2003.

CÍCERO, Andrés Mauricio; ISSA, João Paulo Mardegan; FELDMAN, Sara. **Matrices de tercera generación en la ingeniería de tejidos óseos**. 2017.

COINTRY, G. et al. Los huesos son estructuras genéticas, metabólicas, biomecánicas, o todo a la vez. **Actualizaciones en Osteología**, v. 5, n. 3, p. 185- 195, 2009.

CONTESSOTTO, Paolo et al. Elastin-like recombinamers-based hydrogel modulates post-ischemic remodeling in a non-transmural myocardial infarction in sheep. **Science Translational Medicine**, v. 13, n. 581, 2021.

CONTI, Ario et al. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *Journal of pineal research*, v. 28, n. 4, p. 193-202, 2000. COSTA, Rui R. et al. Stimuli-responsive thin coatings using elastin-like polymers for biomedical applications. ***Advanced Functional Materials***, v. 19, n. 20, p. 3210- 3218, 2009.

COTTRELL, Michelle A. et al. Real-time telerehabilitation for the treatment of musculoskeletal conditions is effective and comparable to standard practice: a systematic review and meta-analysis. ***Clinical rehabilitation***, v. 31, n. 5, p. 625-638, 2017.

CUNHA, Marcelo Rodrigues da et al. Implantes subperiosteais de hidroxiapatita em ratos submetidos a ingestão crônica de álcool. 2001. CUNHA, Marcelo Rodrigues 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.

DAAMEN, Wilhelmina Francisca et al. Elastin as a biomaterial for tissue engineering. *Biomaterials*, v. 28, n. 30, p. 4378-4398, 2007. DE TORRE, Israel González et al. Elastin-like recombinamer catalyst-free click gels: characterization of poroelastic and intrinsic viscoelastic properties. ***Acta biomaterialia***, v. 10, n. 6, p. 2495-2505, 2014.

DIMITRIOU, Rozalia; GIANNOUDIS, Peter V. Discovery and development of BMPs. ***Injury***, v. 36, n. 3, p. S28-S33, 2005.

DO NASCIMENTO, Daniel L. et al. Mineralização de matriz derivada de cartilagem auricular. 2012.

DREHER, Matthew R. et al. Temperature triggered self-assembly of polypeptides into multivalent spherical micelles. ***Journal of the American Chemical Society***, v. 130, n. 2, p. 687-694, 2008.

FORELL, Elaine B.; STRAW, R. C. Bone morphogenetic proteins and bone derived growth factors. ***Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology***, v. 6, n. 03, p. 166-171, 1993.

GARCIA, Yolanda et al. In vitro characterization of a collagen scaffold enzymatically cross-linked with a tailored elastin-like polymer. ***Tissue Engineering Part A***, v. 15, n. 4, p. 887-899, 2009.

GARDIN, Chiara et al. Decellularization and delipidation protocols of bovine bone and pericardium for bone grafting and guided bone regeneration procedures. ***PloS one***, v. 10, n. 7, p. e0132344, 2015.

GASTON, M. S.; SIMPSON, A. H. R. W. Inhibition of fracture healing. *The Journal of bone and joint surgery*. ***British volume***, v. 89, n. 12, p. 1553-1560, 2007.

GÓMEZ-MORENO, Gerardo et al. Outcomes of topical applications of melatonin in implant dentistry: a systematic review. ***Implant dentistry***, v. 24, n. 1, p. 25-30, 2015.

GREENSPAN, S. L. et al. Diurnal variation of bone mineral turnover in elderly men and women. **Calcified tissue international**, v. 60, n. 5, p. 419-423, 1997.

GROVER, Chloe N.; CAMERON, Ruth E.; BEST, Serena 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.

GRUBER, Reinhard; STADLINGER, Bernd; TERHEYDEN, Hendrik. Cell-to-cell communication in guided bone regeneration: molecular and cellular mechanisms. **Clinical oral implants research**, v. 28, n. 9, p. 1139-1146, 2017.

HABIBOVIC, Pamela. Strategic directions in osteoinduction and biomimetics. **Tissue Engineering Part A**, v. 23, n. 23-24, p. 1295-1296, 2017.

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.

HSUEH, Yu-Sheng 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.

IBÁÑEZ-FONSECA, Arturo et al. Biocompatibility of two model elastin-like recombinamer-based hydrogels formed through physical or chemical cross-linking for various applications in tissue engineering and regenerative medicine. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 12, n. 3, p. e1450-e1460, 2018.

IBÁÑEZ-FONSECA, Arturo et al. Elastin-like recombinamer hydrogels for improved skeletal muscle healing through modulation of macrophage polarization. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 8, p. 413, 2020.

IKADA, Yoshito. Challenges in tissue engineering. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 3, n. 10, p. 589-601, 2006.

ISSA, João Paulo et al. Bone repair of critical size defects treated with autogenic, allogenic, or xenogenic bone grafts alone or in combination with rh BMP-2. **Clinical oral implants research**, v. 27, n. 5, p. 558-566, 2016.

ISSA, João Paulo Mardegan et al. Evaluation of rhBMP-2 and natural latex as potential osteogenic proteins in critical size defects by histomorphometric methods. **The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology**, v. 293, n. 5, p. 794-801, 2010.

JILKA, Robert L. et al. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. **Journal of bone and mineral research**, v. 13, n. 5, p. 793-802, 1998.

- JUNQUEIRA, Luiz C.; CARNEIRO, José. Histologia básica. 10ª edição. Rio de Janeiro, 2004.
- KATCHBURIAN, E.; CERRI, P. S. Formação e destruição óssea. Cardoso RJA, Gonçalves EAN. **Cirurgia para implantes. São Paulo: Artes Médicas**, p. 437-45, 2002.
- KATCHBURIAN, E.; CERRI, P. S. Formação e destruição óssea. Cardoso RJA, Gonçalves EAN. **Cirurgia para implantes. São Paulo: Artes Médicas**, p. 437-45, 2002.
- LEI, Hua; GUI, Lai; XIAO, Ran. The effect of anticoagulants on the quality and biological efficacy of platelet-rich plasma. **Clinical biochemistry**, v. 42, n. 13-14, p. 1452-1460, 2009.
- LIN, Sheldon S.; YERANOSIAN, Michael G. The Role of Orthobiologics in Fracture Healing and Arthrodesis. **Foot and ankle clinics**, v. 21, n. 4, p. 727-737, 2016.
- LUDWIG, Steven C.; KOWALSKI, Joseph M.; BODEN, Scott D. Osteoinductive bone graft substitutes. **European Spine Journal**, v. 9, n. 1, p. S119-S125, 2000.
- MACHADO, Eduardo Gomes 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.
- MADL, Christopher M.; KATZ, Lily M.; HEILSHORN, Sarah C. Bio-orthogonally crosslinked, engineered protein hydrogels with tunable mechanics and biochemistry for cell encapsulation. **Advanced functional materials**, v. 26, n. 21, p. 3612-3620, 2016.
- MARSELL, Richard; EINHORN, Thomas A. Emerging bone healing therapies. **Journal of orthopaedic trauma**, v. 24, p. S4-S8, 2010.
- MARUPANTHORN, Kulisara 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. 654-662, 2017.
- MARZOLA, Clóvis. Os enxertos ósseos e de Biomateriais e os Implantes Osseointegrados. **Revista Brasileira de Cirurgia e Implantodontia**, v. 8, n. 30, p. 126-140, 2001.
- MCCARTHY, Bryce; YUAN, Yuan; KORJA, Piyush. Elastin-like-polypeptide based fusion proteins for osteogenic factor delivery in bone healing. **Biotechnology progress**, v. 32, n. 4, p. 1029-1037, 2016.
- MEDIERO, Aránzazu et al. Direct or indirect stimulation of adenosine A2A receptors enhances bone regeneration as well as bone morphogenetic protein-2. **The FASEB Journal**, v. 29, n. 4, p. 1577-1590, 2015.



MENDES, Vanessa Cristina. Influência da matriz de esmalte dentário (Emdogain R) sobre o processo de reparo alveolar: análise histológica e histométrica em ratos. 2000.

MIZUNO, K. et al. Osawa. Control of degradation rate of porous biodegradable polymers. In: Proceedings of the 8th polymer for advanced technologies international symposium, Budapest, Hungary. 2005. p. 13-16.

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

MORAES, Renato de. Utilização da membrana de elastina associada a hidroxiapatita e proteína morfogenética óssea no reparo de defeitos cranianos de ratos. 2017. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo.

MUNHOZ, Marcelo de Azevedo et al. Utilização de blendas poliméricas no reparo de defeitos cranianos de ratos. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo.

MUSCHLER, George F.; NAKAMOTO, Chizu; GRIFFITH, Linda G. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. **JBJS**, v. 86, n. 7, p. 1541-1558, 2004.

OLIVEIRA, Gustavo Ribeiro et al. Lycopene influences osteoblast functional activity and prevents femur bone loss in female rats submitted to an experimental model of osteoporosis. **Journal of bone and mineral metabolism**, v. 37, n. 4, p. 658-667, 2019.

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

PALUMBO, Carla; FERRETTI, Marzia; DE POL, Anto. Apoptosis during intramembranous ossification. **Journal of anatomy**, v. 203, n. 6, p. 589-598, 2003.

PLIKUS, Maksim V. et al. Regeneration of fat cells from myofibroblasts during wound healing. **Science**, v. 355, n. 6326, p. 748-752, 2017.

PRAKASAM, Mythili et al. Biodegradable materials and metallic implants a review. **Journal of functional biomaterials**, v. 8, n. 4, p. 44, 2017.

RAHMAN, Md Shaifur et al. TGF- $\beta$ /BMP signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation. **Bone research**, v. 3, n. 1, p. 1- 20, 2015.

RAISZ, Lawrence G.; RODAN, Gideon A. Embryology and cellular biology of bone. In: Metabolic bone disease and clinically related disorders. **Academic Press**, 1998. p. 1-22.

RATNER, Buddy D. et al. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. **Elsevier**, 2004.

ROCHA, Lenaldo B. et al. Biomineralization of polyanionic collagen–elastin matrices during cavariar bone repair. **Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials**, v. 79, n. 2, p. 237-245, 2006.

RODRÍGUEZ-CABELLO, J. Carlos et al. Developing functionality in elastin-like polymers by increasing their molecular complexity: the power of the genetic engineering approach. **Progress in Polymer Science**, v. 30, n. 11, p. 1119-1145, 2005.

RODRÍGUEZ-CABELLO, J. et al. Protein-Based Smart Polymers. *Smart Polymers: Applications in Biotechnology and Biomedicine*; Galaev, I., Mattiasson, B., Eds, p. 177-209, 2008.

RODRÍGUEZ-CABELLO, José Carlos et al. Synthesis of genetically engineered protein polymers (recombinamers) as an example of advanced self-assembled smart materials. In: *Nanotechnology in Regenerative Medicine*. **Humana Press**, 2012. p. 17-38.

RUGGIERI, Iván Nadir Camal et al. Bone fracture healing: Perspectives according to molecular basis. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 39, n. 3, p. 311-331, 2021.

RUGGIERI, Iván Nadir Camal et al. Bone fracture healing: Perspectives according to molecular basis. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 39, n. 3, p. 311-331, 2021.

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

SIVARAJ, Kishor K.; ADAMS, Ralf H. Blood vessel formation and function in bone. **Development**, v. 143, n. 15, p. 2706-2715, 2016.

SODEK, J.; OVERALL, C. M. Matrix metalloproteinases in periodontal tissue remodelling. *Matrix (Stuttgart, Germany)*. **Supplement**, v. 1, p. 352-362, 1992.

SODEK, K. L. et al. Relationships between bone protein and mineral in developing porcine long bone and calvaria. *Bone*, v. 26, n. 2, p. 189-198, 2000. STAUBLI, Sebastian Manuel et al. Control of angiogenesis and host response by modulating the cell adhesion properties of an Elastin-Like Recombinamer-based hydrogel. **Biomaterials**, v. 135, p. 30-41, 2017.

STOCK, Ulrich A.; VACANTI, Joseph P. Tissue engineering: current state and prospects. **Annual review of medicine**, v. 52, n. 1, p. 443-451, 2001.

TAKAYANAGI, Hiroshi. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. **Journal of periodontal research**, v. 40, n. 4, p. 287-293, 2005.

TEN CATE, Arnold Richard. *Histologia bucal: desenvolvimento, estrutura e função*. Guanabara-Koogan, 1988.

TURRI, Alberto et al. Guided bone regeneration is promoted by the molecular events in the membrane compartment. **Biomaterials**, v. 84, p. 167-183, 2016.

URIST, Mx' R. et al. Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, n. 2, p. 371-375, 1984.

URRY, Dan W. et al. Biocompatibility of the bioelastic materials, poly (GVGVP) and its  $\gamma$ -irradiation cross-linked matrix: summary of generic biological test results. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 6, n. 3, p. 263-282, 1991.

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

VON ARX, Thomas et al. Lateral ridge augmentation using different bone fillers and barrier membrane application: a histologic and histomorphometric pilot study in the canine mandible. **Clinical oral implants research**, v. 12, n. 3, p. 260-269, 2001.

WINTERMANTEL, E. et al. Tissue engineering scaffolds using superstructures. **Biomaterials**, v. 17, n. 2, p. 83-91, 1996.

XIE, Hua 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. e859-e867, 2017. YEO, Giselle C. et al. Fabricated elastin. **Advanced healthcare materials**, v. 4, n. 16, p. 2530-2556, 2015.

ZHU, Danqing 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.

## ANEXO

## COMITÉ DE ÉTICA



FACULTAD DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Universidad Nacional de Rosario

2019 - "Año de la Exportación"  
**CUDI-FCM. N° 5314/2018**

ROSARIO, 11 de febrero de 2019

**VISTO:** las presentes actuaciones por las que la Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación de esta Casa de Estudios eleva a consideración el proyecto de Investigación titulado: "80020180300112UR - INGENIERIA DE TEJIDOS OSEOS Y/O CARTILAGINOSOS II" y

**QUE,** el Proyecto de referencia se realizará en Dependencias de la Facultad de Ciencia Médicas; y

**CONSIDERANDO:**

**QUE,** la Comisión de Bioética de esta Facultad ha emitido su opinión en estos actuados, informe que obra a fs. 26 de estos actuados;

**QUE,** el Proyecto en cuestión cuenta con la opinión favorable del Comité de Bioseguridad, a fs. 28;

**POR ELLO,**

**EL DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS  
RESUELVE:**

**ARTICULO 1ro.-** Autorizar la realización del Proyecto de Investigación titulado: "80020180300112UR - INGENIERIA DE TEJIDOS OSEOS Y/O CARTILAGINOSOS II", dirigido por la Dra. Sara FELDMAN (D.N.I. N° 14.287.096), por los motivos enunciados precedentemente.-

**ARTICULO 2do.-** Regístrese, comuníquese y pase a Secretaría de Ciencia Tecnología e Innovación, quien notificará fehacientemente a la interesada. Cumplido, archívese.-

**RESOLUCION N° 6838/2019**

**Prof. Dr. Ricardo Nidd  
Decano**

Grb./sbb.-