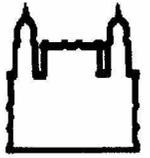




UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA HUMANA**



FIOCRUZ

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL OSTEOGÊNICO DE MATRIZES
TRIDIMENSIONAIS COLAGÊNICAS ANIÔNICAS, RETICULADAS
OU NÃO EM GLUTARALDEÍDO, NA REGENERAÇÃO DE
DEFEITOS CRÍTICOS, EM CALVÁRIA DE RATO**

FÚLVIO BORGES MIGUEL

Salvador
2008



004177

FÚLVIO BORGES MIGUEL

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL OSTEOGÊNICO DE MATRIZES TRIDIMENSIONAIS COLAGÊNICAS ANIÔNICAS, RETICULADAS OU NÃO EM GLUTARALDEÍDO, NA REGENERAÇÃO DE DEFEITOS CRÍTICOS, EM CALVÁRIA DE RATO

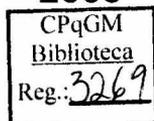
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Humana da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia/Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Patologia Humana, área de concentração Patologia Experimental.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Fabiana Paim Rosa

Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz Antônio R. de Freitas

Salvador

2008



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ – Salvador – Bahia.

M636a Miguel, Fúlvio Borges.
Avaliação do potencial osteogênico de matrizes tridimensionais colagênicas
aniônicas, reticuladas ou não, em glutaraldeído, na regeneração de defeitos
críticos, em calvária de rato [manuscrito] / Fúlvio Borges Miguel. – 2008.
158 f.: il.; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Tese (doutorado) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina.
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2008.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiana Paim Rosa.
Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Antônio R. de Freitas.

1. Glutaraldeído. 2. Colágeno. 3. Bioengenharia. 4 Regeneração Óssea. 5.
Rato. I. Título.

CDU 547.962.9:616.71

547.962.9:616.71
M636a

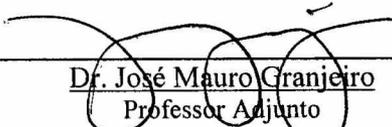
PHL
MFN 3269
004177

"Avaliação do potencial osteogênico de matrizes tridimensionais colagênicas aniônicas, reticuladas ou não em glutaraldeído, na regeneração de defeitos críticos, em calvária de rato"

FULVIO BORGES MIGUEL

FOLHA DE APROVAÇÃO

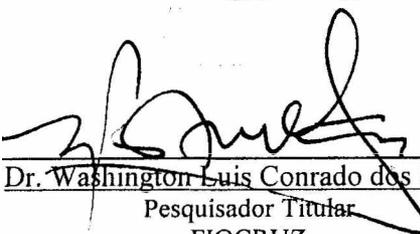
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. José Mauro Granjeiro
Professor Adjunto
UFF



Dr. Alexandre Malta Rossi
Pesquisador Titular
CBPF-RJ



Dr. Washington Luis Conrado dos Santos
Pesquisador Titular
FIOCRUZ



Dr. Iguaracyra Bárreto de Araújo
Professora Adjunta
UFBA



Dr. Fabiana Paim Rosa
Professora Adjunta
UFBA

Dedico este trabalho...

..... À minha mãe, **Marilda Borges Vieira**, incentivadora dos meus sonhos e ideais de vida, pelo seu amor incondicional e ensinamentos que me proporcionaram, desde criança, maturidade para superar as dificuldades e valorizar as conquistas, sem, no entanto, esquecer a humildade. Seu amor foi fundamental para a formação do meu caráter. Esta vitória também é sua. *Te amo muito!*

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

A *Deus*, pois tudo em minha vida tem sido cuidadosamente conduzido por Ele.

À minha orientadora *Prof^a. Dr^a. Fabiana Paim Rosa*, pela contínua participação em minha vida acadêmica desde minhas primeiras atividades científicas. Suas orientações, sugestões, críticas, conselhos e incentivos foram essenciais para meu crescimento profissional e pessoal. Obrigado pela confiança em mim depositada.

Ao meu co-orientador *Prof. Dr. Luiz Antônio Rodrigues de Freitas*, por suas contribuições no decorrer deste trabalho.

Ao *Prof. Dr. Aryon de Almeida Barbosa Júnior*, por suas essenciais e valiosas contribuições na análise histopatológica e morfométrica deste trabalho, bem como na documentação fotográfica dos achados histológicos.

À *Prof. Dra. Christina Maeda Takiya*, pela acolhida no Laboratório de Patologia Celular do Departamento de Embriologia e Histologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro e por suas grandiosas e fundamentais contribuições no desenvolvimento, análise e documentação dos resultados imunoistoquímicos.

Ao *Prof. Dr. Gilberto Goissis*, da Proline Biomédica[®], pelo fornecimento das matrizes colagênicas aniônicas, objeto de estudo desta pesquisa.

À *Dr^a. Isabel Maria Santana Ramos de Freitas Amaral*, do Instituto de Engenharia Biomédica da Universidade do Porto, Porto, Portugal, pelo preparo, caracterização e fornecimento das matrizes de colágeno neutro.

À *Profa. Dra. Maria Eugênia Leite Duarte*, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela concessão do protocolo de processamento histológico em resina de metil-metacrilato.

À *Profa. Dra. Maria das Graças Farias Pinto*, Coordenadora do Centro de Criação de Animais de Experimentação da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, e sua equipe, pela cessão do espaço físico para o desenvolvimento da etapa experimental desta pesquisa.

Ao meu amigo *Victor Luiz Correia Nunes*, pela amizade, carinho e atenção com que me acolheu em sua casa, estando sempre disposto a me ajudar, mesmo com tantos trabalhos a fazer. E à sua mãe, *Zélia Augusta*, pelo carinho de mãe para comigo.

À amiga *Lucilene Brito*, não tenho palavras para lhe agradecer às suas essenciais ajudas, sem as quais esta tese não teria sido finalizada, por sua prazerosa companhia nas madrugadas de muito trabalho, em todas elas me estimulando e me acalmando, sempre com palavras dóceis. Com certeza sua presença tornou meu trabalho mais leve. Obrigado pelas gostosas risadas, ensinamentos e correções gramaticais. Serei sempre grato por tudo.

À minha amiga *Fabiana Lopes de Paula* pela prazerosa convivência durante o desenvolvimento da fase experimental deste trabalho e pelos momentos de descontração, especialmente aquele após o término dos procedimentos cirúrgicos. Aproveito a oportunidade para lhe pedir desculpas pela ausência no seu casamento.

À minha amiga *Isabela Barreto*, pelas horas de enlevo científico vividas em conjunto com Fabiana Lopes, as quais jamais serão esquecidas. A maneira como lidamos com as dificuldades tornou nossa caminhada mais alegre e leve. Obrigado pelas ajudas nos momentos finais na elaboração deste trabalho. Agradeço também aos seus pais, Osvaldo e Ervene, pelo carinho com que sempre me receberam em sua casa.

À amiga *Rhyna Carla*, por ter estado presente, desde minha chegada na Bahia, em todos os momentos peremptórios de minha vida profissional e pessoal, e pelo carinho e deferência com que sempre me acolhe. Seus ensinamentos, conselhos e palavras de incentivo, compartilhados durante toda nossa amizade, foram muito importantes para mim. Agradeço também as ajudas nos momentos finais da realização deste trabalho.

À minha irmã *Ana Karina Cardoso*, pelo amor e carinho dedicado a mim desde meu primeiro dia em Salvador. Kakinha, seu amor fraterno foi e é muito importante para o meu bem-estar. Sempre me senti muito bem acolhido por você e por toda a sua família.

À amiga *Edmália Barreto*, pelo carinho com que sempre me recebe e me acolhe. Sua doçura e meiguice seduzem qualquer pessoa. Obrigado pelas fotos.

À nova amiga *Cláudia Valle*, pelo carinho com que sempre me trata e por suas incansáveis e valiosas explicações sobre a bioquímica do colágeno, que me permitiram uma melhor análise e entendimento das reações ocorridas com o biomaterial objeto de estudo deste trabalho. E também à sua essencial contribuição na revisão das referências.

À *Profª. Drª. Telma Martins de Araújo*, a quem estimo muito, pelas palavras de carinho e conforto durante minhas consultas ortodônticas e pelos conselhos profissionais.

A *Raphael Mello de Andrade* pela valiosa conferência das listas de abreviaturas e siglas e lista de símbolos.

Aos *meus familiares*, pelo incentivo, apoio e carinho, os quais me fizeram crescer, acima de tudo, como pessoa. O estímulo que vocês sempre me proporcionaram foi e é muito importante em minha caminhada.

Às *monitoras de Histologia Humana*, pelo carinho e confiança em mim depositados, e compreensão por minhas ausências durante este semestre, em especial, a *Deise Kelly* e *Franciane* pelo incomensurável apoio na elaboração das referências bibliográficas.

À *Srª. Rita de Cássia Pinheiro*, pela competência, carinho e amizade com que sempre me acolheu. Suas palavras de aconchego me fizeram muito bem. *Ritinha, você é muito especial.*

Ao amigo *Thiago Mohallem*, pela sua importante ajuda com as fotomicrografias utilizadas neste trabalho.

Aos servidores do Biotério do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz, *Fabienne, Vítor* e *Rejane*, pela atenção e carinho com que sempre me receberam.

Às técnicas *Cristina Vasconcelos* e *Cátia Magalhães*, pela paciência e dedicação durante o processamento histológico dos espécimes, sempre dispostas a nos ajudar.

Aos técnicos *Luiz* e *Silvana* e *alunos* do Laboratório de Patologia Celular do Departamento de Embriologia e Histologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela enorme contribuição na realização das técnicas de imunistoquímica durante a intensa semana de trabalho na UFRJ.

À *Cleóbula*, do Biotério Central da Universidade Estadual de Feira de Santana, pelo empréstimo das caixas plásticas utilizadas durante a parte experimental desta pesquisa.

A *Tauar e Tatiane*, da secretaria do Curso de Pós-Graduação de Patologia Humana da Universidade Federal da Bahia, pela presteza com que sempre me receberam e atenderam às minhas solicitações.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação de Patologia Humana da Universidade Federal da Bahia.

Ao Sr. *Gilson*, proprietário da SETE Central de Esterilização, pela concessão da esterilização das matrizes colagênicas aniônicas estudadas neste trabalho.

Ao Sr. *Cristóvão Vasconcelos*, do Laboratório Bioengenharia Tecidual e Biomateriais do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, pela presteza e alegria com que sempre me recebeu e ajudou.

Aos colegas do Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

À Direção, professores e servidores técnico-administrativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, pelo incentivo e apoio durante esta jornada.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia pelas liberações concedidas, as quais possibilitaram a conclusão deste trabalho.

À Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, e à Fundação Oswaldo Cruz, em especial, ao Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, pela oportunidade em concretizar este sonho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudo concedida nos momentos iniciais deste curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia pelo fomento do projeto componente essencial deste estudo.

Aos animais, sem os quais esta pesquisa não teria sido realizada.

A todos que contribuíram de alguma forma com a execução e finalização deste trabalho.

“É melhor tentar e falhar, a preocupar-se em ver a vida passar.

É melhor tentar, ainda que em vão, a nada fazer.

Eu prefiro caminhar na chuva, a, em dias tristes, me esconder em casa.

Prefiro ser feliz, embora louco, a viver em conformidade”.

Martin Luther King

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar histomorfometricamente, por microscopia de luz comum, o potencial osteogênico de matrizes colagênicas aniônicas, reticuladas ou não em glutaraldeído, implantadas em defeitos ósseos críticos, em calvária de ratos. Foram utilizados 86 ratos divididos aleatoriamente para compor quatro grupos: **G I** – matriz colagênica aniônica com 24h de hidrólise e 15min de reticulação em GA 0,05% (MCAHGA); **G II** – matriz colagênica aniônica com 24h de hidrólise (MCA); **G III** – matriz colagênica neutra, controle positivo (MCN) e **G IV** – defeito ósseo vazio, sem implantação de biomaterial, preenchido por coágulo sanguíneo, controle negativo. Os animais foram avaliados nos pontos biológicos de 15, 45, 90 e 120 dias. Os resultados evidenciaram que os biomateriais implantados nos grupos I e II foram biocompatíveis, embora tenham desencadeado inflamação crônica granulomatosa discreta e regressiva. Estas matrizes apresentaram velocidade de biodegradação compatível com a neoformação óssea, a qual se mostrou associada a angiogênese no interior das matrizes, em todos os pontos biológicos. No GIII, a fragmentação e biodegradação mostraram-se acentuadas, pela ausência de tratamento químico do colágeno. A neomineralização evidenciada nos grupos I e II apresentou aumento estatisticamente significativo ao longo dos tempos. O percentual de mineralização do GII (87%) foi estatisticamente diferente daquele encontrado no GI (66%). Ao compararmos estes percentuais com a mineralização observada no GIV, notam-se diferenças muito significantes. Neste último, assim como no GIII, a neoformação óssea esteve limitada às bordas do defeito com fibrose na área seccional do defeito. Conclui-se que as matrizes colagênicas aniônicas apresentaram potencial osteogênico mais evidente nas matrizes sem reticulação em glutaraldeído. Estas matrizes apresentam grande potencial de aplicabilidade clínica, nas terapias regenerativas ósseas.

Palavras-Chave: bioengenharia, regeneração óssea, colágeno, glutaraldeído, rato.

ABSTRACT

The aim of this study was to make a histomorphometric evaluation by common light microscopy, of the osteogenic potential of anionic collagen matrices, either reticulated in glutaraldehyde or not, implanted in critical bone defects in rat calvarias. In this study 86 rats were used, randomly divided into four groups: **G I** – anionic collagenous matrix with 24h of hydrolysis and 5 min of reticulation in GA 0.05% (MCAHGA); **G II** – anionic collagenous matrix with 24h of hydrolysis (MCA); **G III** – neutral collagenous matrix, positive control (MCN) and **G IV** – empty bone defect, without biomaterial implantation, filled with blood coagulum, negative control. The animals were evaluated at the biological points of 15, 45, 90 and 120 days. The results evidenced that the biomaterials implanted in groups I and II were biocompatible, although they had set of chronic, discrete and regressive granulomatous inflammation. These matrices presented a speed of biodegradation compatible with bone neoformation, which was shown to be associated with angiogenesis inside the matrices at all the biological points. In G III, fragmentation and biodegradation were shown to be accentuated by the absence of chemical treatment of the collagen. The neomineralization evidenced in Groups I and II presented statistically significant increase throughout the times. The percentage of mineralization of GII (87%) differed statistically from that found in GI (66%). When these percentages were compared with the mineralization observed in GIV, very significant differences were noted. In the latter, as in GIII, bone neoformation was limited to the edges of the defect with fibrosis in the sectional area of the defect. It was concluded that the anionic collagen matrices presented more evident osteogenic potential in the matrices without reticulation in glutaraldehyde. These matrices presented a great potential for clinical application in bone regenerative therapies.

Key-words: bioengineering, bone regeneration, collagen, glutaraldehyde, rat.

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Seqüência de aa na cadeia polipeptídica α da molécula de tropocolágeno.	51
Figura 2	Modelo organizacional da fibrila de colágeno mostrando o deslocamento de um quarto de uma tripla hélice em relação à molécula adjacente e as regiões de <i>gap</i> e <i>overlap</i> que formam o período D do colágeno.	53
Figura 3	Micrografia de microscopia eletrônica de transmissão (MET) das regiões de <i>gap</i> e <i>overlap</i> do período D (A). Em B, nota-se a distribuição dos aa ácidos e básicos que formam os subperíodos do intervalo D.	53
Figura 4	Esquema ilustrando a integração das proteínas da MEC, em especial o colágeno, com a superfície celular, via RGD.	56
Figura 5	Esquema da hidrólise, em meio alcalino, dos resíduos de Asn e Gln presentes no colágeno.	57
Figura 6	Alteração na conformação da barreira hidrofóbica, após 24 horas de hidrólise dos resíduos de Asn e Gln.	58
Figura 7	(A) Pericárdio bovino nativo. (B) Pericárdio bovino poroso após 24 horas de hidrólise dos resíduos de Asn e Gln. Nota-se que os poros possuem diferentes formas e diâmetros. Barra 100 μ m.	59
Figura 8	Esquema das ligações cruzadas estabelecidas pelo GA com a molécula de colágeno.	60
Figura 9	Fotomicrografia de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da matriz de colágeno neutro.	71
Figura 10	(A) Cortador manual das matrizes com aproximadamente 8,5mm de diâmetro e (B) biomaterial acondicionado em frasco tipo <i>ependorf</i> (2mL) contendo solução fisiológica estéril, para hidratação prévia à cirurgia.	72

Figura 11	Vista macroscópica superior do biomaterial hidratado com 8,5mm de diâmetro (A) e lateral, onde é possível observar sua espessura de aproximadamente 0,8mm (B)	73
Figura 12	Seqüência cirúrgica para a confecção dos defeitos ósseos críticos e implantação dos biomateriais: (A) incisão cutânea bicoronal semilunar, (B) descolamento e remoção do periósteo, (C) tecido ósseo exposto, (D) confecção do defeito ósseo crítico com fresa trefina, (E) demarcação do defeito ósseo na porção mediana da calvária, (F) defeito crítico (8,5mm) confeccionado, (G) implantação das matrizes colagênicas e (H) retalho reposicionado e suturado com pontos interrompidos.	75
Figura 13	Esquema dos recortes látero-inferiores e posterior dos espécimes (A) e da porção anterior com exclusão de 3mm de defeito ósseo (B).	77
Figura 14	Esquema da área seccional do defeito, após corte transversal do bloco.	79
Figura 15	Esquema da vista transversal da extensão linear e da área seccional do defeito. Neste diagrama, destaca-se também a região supradural do defeito, a qual foi sempre orientada para baixo, nos cortes histológicos.	80
Figura 16	GI 15 D – (A) Borda óssea (BO) em bisel associada à regeneração na região supradural (RSD) e biomaterial (BIO) implantado. HE; resina. Barra 200µm. (B) Interface de tecido conjuntivo (TC) entre a borda óssea e o biomaterial, e conjuntivo neoformado (CN) entre suas fibras coradas de vermelho, com migração celular. Tricrômico de Masson Goldner (TG); resina. Barra 100µm.	87
Figura 17	GI 15 D – (A) Região central do defeito com a presença de núcleo de mineralização (NM) na região supradural. HE; parafina. Barra 200µm. (B) Fibras colágenas (FC) do biomaterial íntegras com núcleo de mineralização na região supradural. Picrossírius-vermelho (PV); resina. Barra 50µm.	87
Figura 18	GI 15 D – (A) Proliferação e migração de células fusiformes (CF) em direção centrípeta, de permeio às fibras do biomaterial. TG; resina. Barra 50µm. (B) – Detalhe da figura "A", com destaque para as células fusiformes sobrepostas às fibras do biomaterial. TG; resina. Barra 25µm.	87
Figura 19	GI 15 D – (A) Presença de núcleos de mineralização entre fibras do biomaterial próximos à região supradural. Nota-se a presença de tecido conjuntivo neoformado entre as fibras colágenas do biomaterial, que se apresenta fragmentado na região inferior esquerda da figura. HE; parafina. Barra 50µm. (B) – Ampliação da fotomicrografia anterior, com destaque para os núcleos de mineralização de permeio às fibras. HE; parafina. Barra 25µm.	88
Figura 20	GII 15 D – (A) Interface de tecido conjuntivo entre o biomaterial e a borda óssea, que se apresenta com atividade regenerativa. HE; parafina. Barra 100µm. (B) Núcleo de mineralização formado na interface entre a borda e o biomaterial, com osteócitos (OC), e circundado por osteoblastos (OB) e tecido conjuntivo e vasos sanguíneos. TG; resina. Barra 50µm.	89

Figura 21	GII 15 D – (A) Integridade do biomaterial na região central do defeito; fibras colágenas paralelas entre si. PV; resina. Barra 100µm. (B) Na área de interface entre a borda óssea e o biomaterial, nota-se a presença de tecido conjuntivo, com áreas de maior densidade de deposição de colágeno em formato de núcleos. Osso novo (ON). PV; resina. Barra 50µm.	89
Figura 22	GII 15 D – (A) Fragmentação das fibras colagênicas do biomaterial na sua periferia; núcleos de mineralização, com osteócitos entre as fibras do biomaterial. HE; parafina. Barra 50µm. (B) Detalhe em maior aumento da mesma região. Notar vasos sanguíneos (VS) no canto superior direito. HE; parafina. Barra 25µm.	89
Figura 23	GII 15 D – (A) Fibras de colágeno íntegras, associadas às células fusiformes, osteoblastos e ao tecido conjuntivo neoformado. TG; resina. Barra 50µm. (B) Núcleo de mineralização na RSD. Nota-se a presença de vasos sanguíneos circunvizinhos ao núcleo de mineralização. HE; parafina. Barra 50µm.	90
Figura 24	GII 15 D – Expressão de TGF-β em macrófagos, padrão citoplasmático, e no interstício, secretado (A) ; e de ED-1 em macrófagos ativados (B) . parafina; 40x.	90
Figura 25	GIII 15 D – (A) Borda óssea com regeneração restrita à margem; tecido conjuntivo formado na interface entre a matriz colagênica e a borda do defeito. HE; resina. Barra 200µm. (B) Tecido conjuntivo fibroso (TCF) envolvendo o biomaterial. HE; resina. Barra 25µm.	91
Figura 26	GIII 15 D – (A) Infiltrado inflamatório intenso em toda extensão do biomaterial. HE; resina. Barra 200µm. (B) Fragmentação das fibras de colágeno associada ao infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear, células inflamatórias (CI). HE; resina. Barra 100µm.	91
Figura 27	GIII 15 D – (A) Fragmentação da matriz colagênica neutra. PV; resina. Barra 200µm.	91
Figura 28	GIV 15 D – (A) Borda óssea associada à regeneração limitada e restrita às margens do defeito com formação de tecido conjuntivo na área residual. HE; resina. Barra 200µm. (B) Tecido conjuntivo frouxo formado no interstício. HE; resina. Barra 100µm.	92
Figura 29	GIV 15 D – (A) Região central do defeito, formação de tecido conjuntivo frouxo, com células fusiformes, sem a presença de núcleos de mineralização. HE; resina. Barra 25µm. (B) Arranjo paralelo das fibras de colágeno presentes no tecido conjuntivo frouxo. PV; resina. Barra 25µm.	92
Figura 30	GI 45 D – (A) Mineralização na área central do defeito, notadamente na região supradural. HE; resina. Barra 200µm. (B) Detalhe em maior aumento, biomaterial pouco fragmentado. HE; resina. Barra 100µm.	96

- Figura 31** **GI 45 D** – (A) Núcleos de mineralização com deposição de colágeno no interior do biomaterial implantado, na região supradural, próxima à borda óssea. PV; parafina. Barra 200µm. (B) Interface de tecido conjuntivo entre a borda óssea e o biomaterial. Nota-se pequenos núcleos de mineralização, com osteócitos e tecido conjuntivo neoformado por entre as fibras do biomaterial. HE; parafina. Barra 100µm. **96**
- Figura 32** **GI 45 D** – (A) Núcleos de mineralização formados no interior das fibras de colágeno, as quais parecem integradas a estes; tecido conjuntivo neoformado, associado a fibroblastos (F). HE; parafina. Barra 25µm. (B) Vaso sanguíneo formado entre as fibras do biomaterial. HE; parafina. Barra 25µm. **96**
- Figura 33** **GI 45 D** – (A) Inflamação crônica granulomatosa entre as fibras da matriz colagênica; células inflamatórias: células gigantes multinucleadas (CG), linfócitos (L) e macrófagos (M). TG; resina. Barra 50µm. (B) Células fusiformes sobrepostas às fibras colagênicas. TG; resina. Barra 50µm. **97**
- Figura 34** **GI 45 D** – (A) Biomaterial com fragmentação de suas fibras; núcleos de mineralização na região da dura-máter. HE; parafina. Barra 200µm. (B) Núcleos de mineralização exibindo grande quantidade de osteócitos. Fibras colágenas íntegras próximas aos núcleos de mineralização e fragmentadas na região do retalho cutâneo. HE; parafina. Barra 100µm. **97**
- Figura 35** **GI 45 D** – (A) Matriz colagênica osteóide depositada na borda óssea. PV; parafina. Barra 25µm. (B) Fragmentação das fibras colágenas do biomaterial em área de reação inflamatória crônica com células mononucleares. HE; parafina. Barra 25µm. **97**
- Figura 36** **GI 45 D** – (A) Núcleos de mineralização evidentes, com grande quantidade de osteócitos, e associados à formação vascular. HE; parafina. Barra 50µm. (B) Osso neoformado em associação à borda com linhas de reversão (LR), e mineralização confluyente sobre as fibras de colágeno do biomaterial, com osteócitos. HE; parafina. Barra 50µm. **98**
- Figura 37** **GII 45 D** – (A) Borda óssea com formação óssea que se estende sobre as fibras do biomaterial; núcleos de mineralização na região supradural. HE; parafina. Barra 200µm. (B) Região central do defeito com área de mineralização que ocupam quase a metade da espessura do biomaterial. HE; parafina. Barra 200µm. **99**
- Figura 38** **GII 45 D** – (A) Grande deposição de matriz osteóide colagênica, na região da borda óssea e (B) por entre as fibras do biomaterial. PV; parafina. Barra 200µm. **99**
- Figura 39** **GII 45 D** – (A) Mineralização da interface de tecido conjuntivo observado entre a borda óssea e o biomaterial. PV; parafina. Barra 200µm. (B) Detalhe da figura "A" com destaque para a deposição de matriz osteóide colagênica. PV; parafina. Barra 100µm. **99**

- Figura 40** **GII 45 D – (A)** Núcleo de mineralização circundado por osteoblastos e mais distante por tecido conjuntivo. No centro do núcleo de mineralização nota-se a presença de osteócitos. TG; resina. Barra 25µm. **(B)** Tecido conjuntivo entre o biomaterial e a borda óssea. Nota-se uma célula gigante multinucleada sobre o núcleo de mineralização. TG; resina. Barra 100µm **100**
- Figura 41** **GII 45 D – (A)** Núcleo de mineralização com osteócitos, formado entre as fibras do biomaterial; vaso sangüíneo no tecido conjuntivo. TG; resina. Barra 50µm. **(B)** Fibras do biomaterial associadas às células fusiformes e ao tecido conjuntivo neoformado de permeio às suas fibras. TG; resina. Barra 50µm. **100**
- Figura 42** **GII 45 D – (A)** Células inflamatórias entre as fibras do biomaterial, acompanhadas por algumas células fusiformes. TG; resina. Barra 25µm. **(B)** Área de inflamação; macrófagos contendo pigmento castanho-amarronzado (M), indicativos de hemossiderina. TG; resina. Barra 25µm. **100**
- Figura 43** **GII 45 D – (A)** Nota-se a borda óssea com regeneração discreta na região supradural; biomaterial implantado sem interface entre este e a margem. HE; resina. Barra 200µm. **(B)** Mineralização na área central do defeito integrando-se ao biomaterial. HE; resina. Barra 100µm. **101**
- Figura 44** **GII 45 D – (A)** Observa-se, na região central do defeito, formação de medula óssea (MO) incipiente, circundada por áreas mineralizadas. HE; parafina. Barra 100µm. **(B)** Neoformação óssea entre a borda e o biomaterial, integrando o biomaterial à margem do defeito. HE; parafina. Barra 50µm. **101**
- Figura 45** **GII 45 D – (A)** Deposição abundante de tecido ósseo, já com características de maturação, com formação de medula óssea incipiente, na área central do defeito. HE; parafina. Barra 50µm. **(B)** Detalhe em maior aumento da imagem anterior, evidenciando a formação da medula, os osteócitos e as linhas de reversão. HE; parafina. Barra 25µm. **101**
- Figura 46** **GII 45 D – (A)** Núcleos de mineralização na área central do biomaterial, com deposição de grande quantidade de colágeno, ocupando quase toda sua espessura. PV; parafina. Barra 100µm. **(B)** Formação de tecido conjuntivo, na área central do defeito, por entre dois núcleos de mineralização, mimetizando a sutura sagital; presença de osteócitos e linhas de reversão. HE; parafina. Barra 25µm. **102**
- Figura 47** **GII 45 D – (A)** Organização do tecido ósseo neoformado em camadas, com linhas de reversão, osteócitos e canal vascular (CV). HE; parafina. Barra 25µm. **(B)** Expressão de fator VIII no endotélio vascular e secretado para o interstício. Parafina; 40x. **102**
- Figura 48** **GII 45 D – (A)** Expressão de TGF-β em macrófagos circunvizinhos ao núcleo de mineralização. Parafina; 40x. **(B)** Ativação macrofágica evidenciada pelo ED-1. Parafina; 40x. **102**

Figura 49	GIII 45 D – (A) Tecido conjuntivo fibroso encapsulando a matriz colagênica neutra. PV; resina. Barra 100µm. (B) Biomaterial (em amarelo), bastante fragmentado com formação de tecido conjuntivo circundando seus fragmentos. PV; resina. Barra 50µm.	103
Figura 50	GIV 45 D – (A) Regeneração limitada e restrita à borda com formação de tecido conjuntivo fibroso bastante delgado na área remanescente. HE; resina. Barra 100µm. (B) Evidenciação com picrossírius-vermelho do tecido conjuntivo delgado observado na fotomicrografia da figura “A”. PV; resina. Barra 200µm.	104
Figura 51	GI 90 D – (A) Biomaterial integrando-se à borda óssea. PV; resina. Barra 100µm. (B) Detalhe em maior aumento da fotomicrografia observada em “A”. Nota-se, na periferia do material, núcleos de mineralização com maior deposição de colágeno. PV; resina. Barra 50µm.	107
Figura 52	GI 90 D – (A) Biomaterial pouco fragmentado na região central do defeito, na porção superior próxima ao retalho. TG; resina. Barra 50µm. (B) Biomaterial íntegro, com células fusiformes aderidas à sua estrutura; tecido conjuntivo neoformado de permeio às fibras do biomaterial. TG; resina. Barra 25µm.	107
Figura 53	GII 90 D – (A) Mineralização em quase toda a espessura do biomaterial. HE; resina. Barra 200µm. (B) Núcleo de mineralização presente no biomaterial integrando-se com o osso novo presente na borda óssea. HE; parafina. Barra 200µm.	108
Figura 54	GII 90 D – (A) Núcleos de mineralização, com maior densidade de colágeno, presentes em toda a extensão e espessura do biomaterial. PV; resina. Barra 200µm. (B) Nota-se a invaginação do tecido conjuntivo na região central do defeito, de forma semelhante àquela encontrada na sutura sagital. PV; resina. Barra 100µm.	108
Figura 55	GII 90 D – (A) Áreas de confluência do tecido neomineralizado com osteoblasto na sua superfície. TG; resina. Barra 50µm. (B) Osteoblastos circunjacente ao núcleo de mineralização. TG; resina. Barra 25µm.	108
Figura 56	GII 90 D – (A) Neoformação tecidual óssea na região de interface entre a borda óssea e o biomaterial. Nota-se linhas de reversão tanto no osso já organizado quanto na área imatura. HE; parafina. Barra 50µm. (B) Neoformação vascular de permeio às fibras do biomaterial e aos núcleos de mineralização. HE; parafina. Barra 25µm.	109
Figura 57	GII 90 D – (A) Escassa marcação positiva para TGF-β em macrófagos ativados. Parafina; 40x. (B) Identificação de fator VIII em uma área circunvizinha a um núcleo de mineralização, evidenciando a estreita correlação entre a angiogênese e a neoformação óssea. Parafina; 40x.	109

Figura 58	GIV 90 D – (A) Regeneração óssea limitada e estável na borda óssea do defeito. HE; resina. Barra 100µm. (B) Formação de tecido conjuntivo fibroso mais adensado e delgado, na área remanescente do defeito. PV; resina. Barra 100µm.	110
Figura 59	GI 120 D – (A) Biomaterial integrando-se ao osso novo formado na borda óssea. HE; parafina. Barra 200µm. (B) Mineralização em toda a extensão do biomaterial, ocupando quase toda a sua espessura. HE; resina. Barra 200µm.	114
Figura 60	GI 120 D – (A) Grande área de mineralização centrípeta, na região central do defeito. HE; parafina. Barra 200µm. (B) Observa-se o tecido conjuntivo neoformado de permeio às fibras do biomaterial; biomaterial pouco fragmentado na sua porção superior. HE; parafina. Barra 100µm.	114
Figura 61	GI 120 D – (A) Biomaterial fragmentado na área de inflamação crônica granulomatosa; presença de células gigantes, algumas fagocitando as fibras do biomaterial. HE; parafina. Barra 25µm. (B) Presença de vasos e capilares sangüíneos (CS) associados ao tecido conjuntivo neoformado e às fibras do biomaterial que se encontram fragmentadas. HE; parafina. Barra 50µm.	114
Figura 62	GI 120 D – (A) Formação de tecido ósseo de permeio às fibras da matriz colagênica; área mais basofílica característica de menor deposição mineral. HE; parafina. Barra 25µm. (B) Osso novo integrando as fibras do biomaterial à estrutura mineralizada; células inflamatórias associadas ao biomaterial fragmentado. HE; parafina. Barra 25µm.	115
Figura 63	GI 120 D – (A) Mineralização na interface entre o biomaterial e a borda óssea. HE; parafina. Barra 50µm. (B) Organização do tecido ósseo neoformado em camadas, ao redor de um canal vascular. HE; parafina. Barra 25µm.	115
Figura 64	GI 120 D – (A) Macrófagos contendo pigmento castanho-amarronzado; osteoblastos ao redor do núcleo de mineralização. TG; resina. Barra 50µm.	115
Figura 65	GII 120 D – (A) Extensa área de mineralização confluyente, envolvendo quase toda a espessura da matriz. HE; parafina. Barra 200µm. (B) Formação óssea na interface entre o biomaterial e a borda. HE; parafina. Barra 100µm.	116
Figura 66	GII 120 D – (A) Biomaterial sendo integrado ao osso novo formado entre este e a borda óssea; a área mais basofílica indica menor deposição mineral. HE; parafina. Barra 50µm. (B) Detalhe, em maior aumento, da fotomicrografia "A", mostrando o osso novo organizado em camadas; o núcleo de mineralização. HE; parafina. Barra 50µm.	116
Figura 67	GII 120 D – (A) Grande área de mineralização na região central do defeito. HE; parafina. Barra 50µm. (B) Detalhe, em maior aumento, da fotomicrografia "A". Nota-se o aspecto residual do biomaterial circundado por áreas de mineralização recente. HE; parafina. Barra 25µm.	116

Figura 68	GII 120 D – (A) Nota-se a organização do tecido ósseo em lamela (LA), ao redor de um canal vascular; osteoplasto (OS). HE; parafina. Barra 50µm. (B) Fibra do material integrada ao osso novo. HE; parafina. Barra 50µm.	117
Figura 69	GII 120 D – (A) Extensa mineralização no interior do biomaterial, na região central do defeito, em quase toda a sua espessura. HE; parafina. Barra 200µm. (B) Detalhe em maior aumento da fotomicrografia da figura "A", com áreas de mineralização confluentes e fragmentos residuais do biomaterial, na porção voltada para o retalho. HE; parafina. Barra 100µm.	117
Figura 70	GII 120 D – (A) Interface de tecido conjuntivo formado entre os núcleos de mineralização evidenciados na região central do defeito. TG; resina. Barra 100µm. (B) Detalhe da fotomicrografia anterior. Nota-se os osteoblastos na superfície dos núcleos de mineralização confluentes. TG; resina. Barra 50µm.	117
Figura 71	GII 120 D – (A) Área de preenchimento do defeito pelo biomaterial, da interface entre este e a borda óssea, com grande deposição colagênica, de intensidade variável, com maior intensidade nas regiões em maturação óssea. PV; parafina. 200µm. (B) Detalhe, em maior aumento, da fotomicrografia "A" destacando as diferentes regiões de maturação. PV; parafina. Barra 100µm.	118
Figura 72	GII 120 D – (A) Invaginação de tecido conjuntivo, na área central do defeito, por entre os núcleos de mineralização, de forma semelhante àquela da sutura sagital. PV; resina. Barra 200µm. (B) Mineralização na interface observada entre a matriz e a borda óssea. PV; parafina. Barra 50µm.	118
Figura 73	GII 120 D – (A) Fragmentação das fibras colagênicas na porção superior do biomaterial; área mais clara evidencia a organização da matriz colagênica osteóide. PV; parafina. Barra 100µm. (B) Grande área de mineralização na região central do biomaterial; nota-se diferentes intensidades de deposição de matriz osteóide; área mais clara evidencia a maturação do osso novo. PV; parafina. Barra 50µm.	118
Figura 74	GII 120 D – (A) Identificação imunoistoquímica de macrófagos ativados (ED-1). Parafina; 40x. (B) Identificação dos vasos sangüíneos formados, no interior da matriz colagênica, por actina alfa de músculo liso. Parafina; 40x.	119
Figura 75	GIII 120 D – (A) Nota-se encapsulamento do biomaterial por tecido conjuntivo fibroso que se estende da borda óssea até o biomaterial. PV; resina. Barra 200µm. (B) Nota-se ausência de núcleos de mineralização no interior do biomaterial e o tecido conjuntivo circundando tanto a matriz como seus fragmentos. HE; parafina. Barra 100µm.	120
Figura 76	GIV 120 D – (A) Tecido conjuntivo de aspecto mais denso e organizado, na região central do defeito. HE; Parafina. Barra 100µm. (B) . Interstício preenchido por tecido conjuntivo denso e delgado, sem áreas de mineralização. HE; Parafina. Barra 200µm	121

- Figura 77** Mensuração da extensão linear do defeito. Nota-se que não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em nenhum ponto biológico (ANOVA – $p = 0,07$ NS). 124
- Figura 78** Análise do percentual de tecido neomineralizado na área seccional total do defeito. As colunas gráficas evidenciam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (ANOVA – $p = 0,03$ S). A comparação dos grupos ao longo do período experimental apontou, por meio do teste de regressão linear, diferenças estatisticamente significantes para o GI ($p = 0,02$ S) e o GII ($p = 0,02$ S), e não significantes para o GIII ($p = 0,08$ NS). O confronto entre os grupos GI e GII, assim como entre estes e o GIV, mostrou diferenças estatisticamente significantes. 125
- Figura 79** Determinação do número de capilares formados em associação aos biomateriais nos grupos I e II. A angiogênese mostrou-se crescente ao longo dos tempos, até o ponto biológico de 90 dias. A partir deste ponto, evidenciou-se o decréscimo deste fenômeno biológico. O teste de regressão linear mostrou não ter havido diferenças estatisticamente significantes ao longo dos períodos. A comparação entre as médias do GI e do GII, por meio do teste não-paramétrico de *Mann-Whitney*, não revelou diferenças estatisticamente significantes entre estes ($p = 0,11$ NS), nem mesmo aos 90 dias quando o GII exibiu um aumento acentuado na formação vascular. 125

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Número de animais de acordo com o grupo e período.	69
Tabela 2	Seqüência do protocolo de processamento histológico em resina metil-metacrilato.	77
Tabela 3	Composição das soluções I, II e III utilizadas nas etapas VI, VII e VIII durante o processamento histológico para inclusão dos espécimes em resina metil-metacrilato.	77
Tabela 4	Extensão linear do defeito.	122
Tabela 5	Percentual de preenchimento do defeito por tecido neomineralizado, área seccional neomineralizada em relação à área seccional total do defeito.	123
Tabela 6	Número de capilares sangüíneos na área de $10^6\mu\text{m}^2$, escolhida aleatoriamente do defeito. Para esta avaliação foram considerados apenas os capilares cortados transversalmente, cuja relação entre o diâmetro horizontal e vertical não ultrapassasse 20%.	124

Lista de Abreviaturas e Siglas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	Aminoácido
ANOVA	Análise de variância
Asn	Aspargina
BIO	Biomaterial
BO	Borda óssea
BSP	Sialoproteína óssea
CF	Células fusiformes
CG	Célula gigante multinucleada
CI	Células inflamatórias
cm	Centímetro
CN	Conjuntivo neoformado
CPqGM	Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz
CS	Capilar sangüíneo
CV	Canal vascular
D	Período D da proteína do colágeno
ED-1	Anticorpo para identificação de macrófagos ativados
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ES	Extremamente significativa
F	Fibroblasto
FC	Fibras colágenas
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz

FO	Fragmentos ósseos
g	Gramas
GA	Glutaraldeído
GI	Grupo um
GII	Grupo dois
GIII	Grupo três
GIV	Grupo quatro
GIn	Glutamina
Gly	Glicina
h	Horas
H.E.	Hematoxilina-eosina
H ⁺	Próton de hidrogênio
HA	Hidroxiapatita
HE	Hematoxilina – eosina
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
ICS	Instituto de Ciências da Saúde
INEB	Instituto de Engenharia Biomédica
L	Linfócitos
LBTB	Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais
LR	Linha de reversão
M	Macrófagos
MCA	Matriz colagênica aniônica
MCAHGA	Matriz colagênica aniônica com reticulação em glutaraldeído
MCN	Matriz colagênica neutra
MEC	Matriz extracelular
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MO	Medula óssea
MS	Muito significativa
nm	Nanômetro
NM	Núcleo de mineralização
nº.	Número
NS	Não significativa

OB	Osteoblasto
OC	Osteócito
OCA	Osteocalcina
ON	Osteonectina
OP	Osteopontina
OS	Osteoplasto
p	Nível de significância
PBS	Solução tampão fosfato
PGDF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
pH	Potencial hidrogênico
PMN	Leucócitos polimorfonucleares – neutrófilos
PV	Picrossírius-vermelho
RGD	Seqüência arginina-glicina-ácido aspártico
RL	Regressão linear
rpm	Rotações por minuto
RSD	Região supradural
S	Significante
TC	Tecido conjuntivo
TCF	Tecido conjuntivo fibroso
TG	Tricrômico de Masson Goldner
TGF- β	Fator de crescimento tecidual beta
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
VS	Vaso sanguíneo
x	Número de vezes

Lista de Símbolos

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
H ₂ O	Água
=	Igual
>	Maior
≥	Maior ou igual
<	Menor
≤	Menor ou igual
μm	Micrômetro
μm ²	Micrômetro quadrado
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	33
2	REVISÃO DA LITERATURA	38
2.1	TECIDO ÓSSEO	38
2.2	BIOENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA	46
2.3	COLÁGENO COMO BIOMATERIAL	50
3	OBJETIVOS	65
3.1	GERAL	65
3.2	ESPECÍFICOS	66
4	MATERIAIS E MÉTODOS	68
4.1	MODELO EXPERIMENTAL	68
4.2	BIOMATERIAIS	69
4.2.1	Preparação das matrizes por meio da hidrólise seletiva	69
4.2.2	Reticulação das matrizes em GA	70
4.2.3	Controle positivo	71
4.2.4	Esterilização e recorte dos biomateriais	71
4.3	TÉCNICA CIRÚRGICA	73
4.4	OBTENÇÃO DOS ESPÉCIMES	76

4.5	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	76
4.6	ANÁLISE MORFOMÉTRICA	80
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	81
5	RESULTADOS	83
5.1	ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA	83
5.2	ANÁLISE MORFOMÉTRICA	122
6	DISCUSSÃO	127
7	CONCLUSÃO	140
	REFERÊNCIAS	142
	ANEXOS	154
	ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética no Uso dos animais	155
	ANEXO B – Protocolo utilizado nas técnicas de imunohistoquímica	156
	Autorização para comutação bibliográfica	158

1 INTRODUÇÃO

A engenharia tecidual é um novo campo da área biomédica que surgiu há aproximadamente três décadas (IKADA, 2006). Esta bioengenharia utiliza princípios interdisciplinares das engenharias, física, química, ciência dos materiais e biologia (KNESER e outros, 2006) para integrar três elementos essenciais ao desenvolvimento de tecidos e órgãos e à regeneração tecidual: células, fatores de crescimento e matrizes tridimensionais ou arcabouços (LIU e MA, 2004; IKADA, 2006), nem sempre empregados simultaneamente.

Fundamentadas neste contexto, pesquisas científicas na área da bioengenharia tecidual óssea têm possibilitado o desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas e/ou biomateriais capazes de elucidar respostas celulares específicas que mimetizam tanto a estrutura quanto a fisiologia deste tecido e, assim, auxiliar a regeneração de fraturas recentes ou antigas, onde este mecanismo ocorreu de forma incompleta após terapia inicial; melhorar a regeneração ao redor de aparelhos, placas e coroas usadas para manter este tecido alinhado após fraturas; atuar como substitutos ósseos em cirurgias reconstrutivas de defeitos ósseos extensos, críticos à regeneração (O'BRIEN e outros, 2004) conseqüentes de anormalidades congênitas (IKADA, 2006), traumas, inflamações e

ressecções cirúrgicas oncológicas (LOGEART-AVRAMOGLOU e outros, 2005; CANCEDDA; GIANNONI; MASTROGIACOMO, 2007).

Estes biomateriais podem ser confeccionados a partir de metais, cerâmicas, polímeros naturais ou sintéticos, e produzidos em diversos formatos, como por exemplo, esferas, pastilhas, cilindros, e em diferentes formas de apresentação, como pó, gel, esponjas, membrana e matrizes.

As matrizes tridimensionais são suportes físicos que criam ambientes favoráveis, uma vez que atuam como substratos aos eventos celulares de adesão, inserção, proliferação e diferenciação celulares, fundamentais à regeneração tecidual, portanto, são promissores componentes utilizados na bioengenharia tecidual.

Estas matrizes devem ser biocompatíveis, de fácil manipulação, produzidas em tamanhos e formatos variáveis, possuir poros interconectados com permeabilidade apropriada e, quando necessário, ser fabricadas com materiais com degradação controlada (HUTMACHER, 2000; VATS e outros, 2003; CAPES; ANDO; CAMERON, 2005; LOGEART-AVRAMOGLOU e outros, 2005; IKADA, 2006; MASTROGIACOMO e outros, 2006; DONZELLI e outros, 2007; O'BRIEN e outros, 2007). Ademais, devem ter propriedades físico-químicas semelhantes ao tecido de implantação (CHARULATHA e RAJARAM, 2003).

De acordo com estes requisitos, dentre os materiais utilizados na confecção destes arcabouços, especialmente direcionados à regeneração óssea, o colágeno, proteína mais abundante nos mamíferos (FARAJ; KUPPEVELT; DAAMEN, 2007) tem se destacado por ser facilmente encontrada, por apresentar boa biocompatibilidade, por desencadear baixa resposta imunitária, propriedades hemostáticas (PLEPIS; GOISSIS; DAS-GUPTA, 1996; LEE; SINGLA; LEE, 2001;

ROCHA e outros, 2004), por ser osteoindutora (CUNHA; SANTOS JUNIOR; GENARI, 2005), susceptível a modificações químicas sem perder suas propriedades básicas, preparada laboratorialmente com baixo custo (GOISSIS e outros, 1998; ROCHA; GOISSIS; ROSSI, 2002; ROSA e outros, 2003) e por estimular os eventos celulares necessários à regeneração tecidual. Ainda, pode ser produzido em diferentes formatos e formas de apresentação como discos, esferas, lâminas, matrizes, membranas e tubos (RADIKA; BABU; SEHGAL, 1999; LEE; SINGLA; LEE, 2001; ROCHA e outros, 2004).

Quando comparado aos polímeros sintéticos, ao titânio ou às cerâmicas, o colágeno, como proteína constitutiva do tecido ósseo, é um substrato apropriado para o crescimento e proliferação dos osteoblastos (O'BRIEN e outros, 2004) e osteogênese *in vivo* (LIU; XIA; CZERNUSZKA, 2007), uma vez que contém sítios de adesão para estas células (ANSELME, 2000; ROCHA e outros, 2004), e constitui parte do molde necessário à osteogênese (O'BRIEN e outros, 2004). Contudo, quando em contato com os fluidos corpóreos após sua implantação *in vivo*, esta proteína degrada-se de forma rápida devido à ação de enzimas, especialmente as colagenases. Logo, é fundamental instituir tratamentos físicos e/ou químicos que tornem suas propriedades químicas, físicas e biológicas superiores às suas características originais (LEE; SINGLA; LEE, 2001) e resultem em uma biodegradação controlada, fazendo com que ela permaneça por mais tempo no sítio de implantação, por um período compatível com neoformação tecidual.

Dentre uma variedade de tratamentos existentes para os materiais colagênicos, os agentes químicos têm sido amplamente utilizados, principalmente a reticulação em glutaraldeído (GA) (ANGELE e outros, 2004), um aldeído bifuncional que se liga ao grupamento amino desta proteína e estabelece ligações cruzadas

(KHOR, 1997) que reduzem sua antigenicidade (GOISSIS; BRAILE; GIGLIOTI, 1999) e suas propriedades físico-químicas, principalmente a resistência à degradação enzimática (CHARULATHA e RAJARAM, 2003).

Esta proteína também pode ter sua energia de superfície alterada por meio do processo físico-químico de hidrólise seletiva dos grupos carboxiamidas dos resíduos de aminoácidos (aa) asparagina (Asn) e glutamina (Gln). Este tratamento acelulariza e cria poros na matriz nativa (BET; GOISSIS; LACERDA, 2001; ROCHA; GOISSIS; ROSSI, 2002) e adiciona cargas elétricas negativas que variam em função do tempo de hidrólise, tornando-o aniônico e com propriedades piezoelétricas superiores às do colágeno sem tratamento (LACERDA; PLEPIS; GOISSIS, 1998; BET; GOISSIS; LACERDA, 2001; ROCHA; GOISSIS; ROSSI, 2002), características apropriadas à osteogênese (BATISTA; MARTINS; PLEPIS, 2006).

Com o desenvolvimento de biomateriais colagênicos com estes novos parâmetros microestruturais, faz-se necessário, portanto, realizar estudos experimentais *in vivo* previamente à sua aplicação clínica, os quais possam garantir a eficácia e segurança dessa nova metodologia. Diante disto, este estudo propõe-se a analisar histomorfologicamente o potencial osteogênico de matrizes colagênicas aniônicas implantadas em defeitos ósseos críticos, criados na calvária de rato.

Revisão da Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TECIDO ÓSSEO

O osso, principal constituinte do esqueleto, é um tecido conjuntivo especializado, metabolicamente ativo, com funções características: proteção da medula óssea e órgãos vitais, inserção muscular, suporte aos tecidos moles e homeostase mineral, uma vez que mantém uma reserva metabólica de íons, essencialmente cálcio e fosfato (MEGHJI, 1992).

A arquitetura macroscópica deste tecido é dividida em osso compacto ou cortical, e esponjoso ou trabecular. O primeiro é denso e resiste relativamente melhor ao estresse mecânico (DeLACURE, 1994; HING, 2004). O osso esponjoso é trabeculado, mais plástico, e quando comparado ao osso compacto, não suporta forças mecânicas excessivas.

Associados a este tecido, existem três tipos celulares característicos: os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos, responsáveis, respectivamente, pela síntese, manutenção e absorção da matriz extracelular (MEC) (HING, 2004). Os osteoblastos originam-se de células-tronco mesenquimais e após sua completa

diferenciação, secretam MEC rica em colágeno e proteínas não-colagênicas, denominada matriz osteóide, que posteriormente possibilita deposição de cristais de hidroxiapatita (HA) e outros íons a eles associados, os quais constituem a fase inorgânica (SODEK e McKEE, 2000). Embora não haja um consenso entre os autores em relação ao mecanismo exato da mineralização, especula-se que este seja um evento extracelular regulado por células (BOSKEY, 1992; DeLACURE, 1994), interação matriz-mineral (BOSKEY, 1992) e fatores bioquímicos locais (HING, 2004), provavelmente fatores de crescimento, proteínas não-colagênicas e elevadas concentrações dos íons cálcio e fosfato.

Durante a atividade sintética, estas células possuem forma cubóide com citoplasma basofílico. Contudo, os osteoblastos quiescentes que recobrem superfícies ósseas, tornam-se achatados e alongados e são denominados células de revestimento ósseo (SODEK e McKEE, 2000).

Os osteoblastos que ficam aprisionados em lacunas na matriz inorgânica após a mineralização tornam-se osteócitos, células que possuem prolongamentos alojados dentro de canalículos e que se comunicam com osteócitos adjacentes e com osteoblastos, através de junções comunicantes localizadas nas extremidades dos prolongamentos (DeLACURE, 1994; SODEK e McKEE, 2000). Estas interações celulares são essenciais para o fluxo de íons, nutrientes, hormônios e mantêm a homeostase deste tecido (DeLACURE, 1994). A morte destas células resulta na degradação e remoção da matriz óssea (SODEK e McKEE, 2000) pelos osteoclastos.

Estas últimas, são células gigantes multinucleadas, derivadas de progenitores da linhagem monocítico-fagocitária (DeLACURE, 1994), com características únicas que as possibilitam reconhecer, degradar e absorver a matriz

óssea (TEITELBAUM, 2000). Assim, quando ativadas, migram em direção à superfície óssea que se encontra livre de matriz osteóide, removida pelos osteoblastos circunvizinhos, onde se fixam (MEIKLE e outros, 1992; TEITELBAUM, 2000). Uma vez aderidas, criam um microambiente fechado (HILL e ORTH, 1998) e tornam-se polarizadas (TEITELBAUM, 2000). Nesta região, a membrana celular dos osteoclastos exibe prolongamentos em forma de vilos, com aspecto de borda em escova, onde são secretados íons H^+ , colagenases e hidrolases responsáveis pela dissolução da matriz óssea, posteriormente absorvida (HILL e ORTH, 1998, TEITELBAUM, 2000). Em seguida, há formação de depressões na matriz, denominadas de lacunas de reabsorção ou de *Howship* (HILL e ORTH, 1998).

As superfícies externas e internas do tecido ósseo são revestidas por membranas conjuntivas denominadas, respectivamente, de periósteo e endósteo. O primeiro é constituído de duas camadas (DeLACURE, 1994), uma externa, formada de fibras colágenas e fibroblastos, com núcleos intensamente coráveis, esparsos em meio à MEC. A outra camada, interna, denominada "*cambium*" (DeLACURE, 1994) constituída por dois tipos celulares: I) células fusiformes com núcleos alongados, da linhagem osteogênica e II) células arredondadas e caracterizadas pela grande quantidade de citoplasma basofílico, em contato direto com a superfície do osso, são os osteoblastos. Esta membrana está ausente apenas nas superfícies articulares. O endósteo é constituído por uma monocamada de células osteoprogenitoras fusiformes e por osteoblastos. No adulto, em condições fisiológicas, estas membranas cessam sua atividade osteogênica. Contudo, são capazes de retomá-la quando estimuladas durante o reparo tecidual.

A MEC deste tecido é composta pelas fases inorgânica e orgânica, que interagem e proporcionam resistência e resiliência ao tecido ósseo (RHO; KUHN-

SPEARING; ZIOUPOS, 1998). A matriz inorgânica é constituída, principalmente, por fosfato de cálcio, organizado como cristais de HA, representada pela fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (HILL e ORTH, 1998; ANSELME, 2000; SWAMINATHAN, 2001; SEAL; OTERO; PANITCH, 2001; ROCHA; GOISSIS; ROSSI, 2002), com uma relação molar entre Ca/P de 5/3 ou 1,67. Associados a estes cristais, podem também ser encontrados bicarbonato, sódio, potássio, citrato, magnésio, carbonato, lactato, fluoreto, zinco, bário e estrôncio (VIANNA, 1988).

A matriz orgânica é composta em 90% por colágeno tipo I (COWLES e outros, 1998), sua principal proteína estrutural. Esta proteína associa-se a proteínas não-colagênicas como osteopontina (OP), sialoproteína (BSP), osteonectina (ON), osteocalcina (OCA) (MEGHJI, 1992; NEFUSSI e outros, 1997; HILL e ORTH, 1998; ANSELME, 2000; SEAL; OTERO; PANITCH, 2001; ROCHA; GOISSIS; ROSSI, 2002; HING, 2004) e formam a matriz tridimensional deste tecido, onde há interação célula-célula, célula-matriz (BOSKEY e PASCHALIS, 2000) células-fatores de crescimento e deposição de sais minerais.

A expressão seqüencial destas proteínas não-colagênicas sugere funções específicas na atividade das células da linhagem osteogênica (NEFUSSI e outros, 1997), na iniciação e regulação da mineralização, assim como na manutenção dos tecidos mineralizados (SOMMER e outros, 1996; NEFUSSI e outros, 1997). Contudo, a função individual de cada uma destas proteínas ainda não está completamente elucidada (SOMMER e outros, 1996). Acredita-se que as proteínas não-colagênicas direcionam o tamanho, a orientação e a forma particular de deposição dos cristais de HA (RHO; KUHN-SPEARING; ZIOUPOS, 1998) associados às fibrilas de colágeno.

A fisiologia deste tecido caracteriza-se pelo seu grande potencial remodelativo, essencial à manutenção da homeostase mineral, e reparativo, fundamental à integridade deste tecido (GREEN e outros, 2002). A remodelação ocorre por meio de uma sucessão de eventos complexos que resulta na remoção da matriz óssea em uma determinada área pelos osteoclastos. Ao final deste mecanismo, os osteoblastos migram para esta região e sintetizam nova matriz óssea (HILL e ORTH, 1998; SWAMINATHAN, 2001).

Em virtude de dispor de mecanismos reparadores semelhantes ao da osteogênese embriológica (BOSTROM, 1998; FERGUSON e outros, 1999; SEAL; OTERO; PANITCH, 2001; BEHONICK e outros, 2007), o reparo do tecido ósseo ocorre por regeneração. Por conseguinte, defeitos ósseos com dimensões pequenas reparam-se espontaneamente com facilidade sem deixar cicatriz fibrosa (DeLACURE, 1994; BOSTROM, 1998; FERGUSON e outros, 1999; SEAL; OTERO; PANITCH, 2001; BEHONICK e outros, 2007). Durante esse mecanismo, vários fatores de crescimento são expressos em padrões espaciais e temporais distintos (STREET e outros, 2002).

Desse modo, logo após uma lesão (fratura) há ruptura vascular, a qual ativa a cascata de coagulação e formação do hematoma (CARANO e FILVAROFF, 2003; HING, 2004). Nesta área os osteócitos próximos à fratura morrem por hipóxia, e a área adjacente à lesão necrosa (HING, 2004). Concomitantemente, há migração, proliferação, diferenciação e ativação de diferentes tipos celulares, como por exemplo, células inflamatórias, fibroblastos, osteoclastos e células mesenquimais indiferenciadas (VORTKAMP e outros, 1998; STREET e outros, 2002), que iniciam o reparo tecidual.

A resposta inflamatória inicia-se, aproximadamente, uma hora após a lesão, com a migração de leucócitos polimorfonucleares (PMN) (REDDI; WIENTROUB; MUTHUKUMARAN, 1987) e posteriormente, de macrófagos (HING, 2004) que secretam enzimas proteolíticas, responsáveis pela degradação dos restos teciduais, e fatores de crescimento e citocinas que recrutam fibroblastos (REDDI; WIENTROUB; MUTHUKUMARAN, 1987), células da linhagem osteogênica provenientes do perióstio e células-tronco mesenquimais indiferenciadas da medula óssea (HING, 2004).

A continuidade deste mecanismo resulta no desenvolvimento do tecido de granulação, rico em vasos sangüíneos, formado inicialmente nas bordas ósseas (HING, 2004). Em ossos longos, este é gradualmente substituído por um tecido avascular, cartilaginoso (REDDI; WIENTROUB; MUTHUKUMARAN, 1987; CARANO e FILVAROFF, 2003), o qual favorece a regeneração óssea por meio da ossificação endocondral (REDDI; WIENTROUB; MUTHUKUMARAN, 1987; HING, 2004), especialmente quando há movimentação na área lesionada (FERGUSON e outros, 1999).

Simultaneamente, as células da linhagem osteogênica, presentes na camada interna do perióstio, iniciam a deposição de matriz osteóide, que posteriormente mineraliza-se por meio da formação óssea direta, ou seja, ossificação intramembranosa (BOSTROM, 1998; VORTKAMP e outros, 1998; ORTEGA; BEHONICK; WERB, 2004), e desenvolve o calo ósseo externo. Em seguida, este tecido é estimulado à remodelação que resulta em completa substituição deste por tecido ósseo lamelar. Desta forma, seu tamanho é reduzido e o suprimento vascular retorna aos estágios fisiológicos (CARANO e FILVAROFF, 2003; HING, 2004).

Enquanto os defeitos ósseos pequenos reparam-se espontaneamente de forma completa, aqueles com dimensões maiores, resultantes de traumas, infecções, neoplasias, anomalias de desenvolvimento, ou em situações patológicas onde existam comprometimento vascular, presença de tecido adjacente com alta capacidade proliferativa ou distúrbios metabólicos, o potencial regenerativo é restrito (GONÇALVES; GUIMARÃES; GARCIA, 1998; SEAL; OTERO; PANITCH, 2001; LOGEART-AVRAMOGLOU e outros, 2005), e há formação de tecido fibroso, que pode suscitar em alterações funcionais e/ou estéticas (LIM, LEE, YEO, 2000).

Estas limitações resultam em grandes desafios para os pesquisadores da área de bioengenharia tecidual óssea, que têm desenvolvido novos biomateriais, demandando extensivos estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* para evidenciar as interações destes com as células e tecidos, sua biocompatibilidade, estabilidade mecânica, segurança e eficácia.

Os estudos *in vitro* possibilitam avaliar a citocompatibilidade, a indução, estimulação e modulação da diferenciação e proliferação celular, as interações adesivas entre as células e entre estas e os biomateriais (COSTA; MIGUEL; ROSA, 2005; PEARCE e outros, 2007), o que é de extrema importância, visto que alguns tipos celulares, como por exemplo os osteoblastos, necessitam de adesão para sua sobrevivência (BAXTER e outros, 2002; GARCÍA e REYES, 2005). Esta primeira fase depende do seu contato físico inicial com o biomaterial e ocorre por meio de algumas proteínas adsorvidas na sua superfície, quando da sua implantação nos tecidos vivos. A qualidade desta adesão influenciará a morfologia celular e a sua capacidade de diferenciação e proliferação (ANSELME, 2000).

Estudos *in vivo*, inicialmente realizados em animais, complementam os resultados encontrados nos experimentos *in vitro*, pois possibilitam a avaliação do

comportamento dos biomateriais quando em contato com os tecidos. Esses modelos experimentais são essenciais na avaliação da biocompatibilidade dos biomateriais (PEARCE e outros, 2007). Para avaliar a capacidade osteogênica destes novos biomateriais, o modelo experimental empregado *in vivo* deverá apresentar características morfológicas de extensão e largura suficientes para impedir a regeneração óssea espontânea ao longo da vida do animal. Defeitos ósseos com estas características foram definidos por Schmitz e Höllinger (1986) como críticos, uma vez que nestes defeitos a regeneração é limitada às bordas ósseas e o reparo é finalizado com a formação de tecido conjuntivo, principalmente pela proliferação do tecido conjuntivo circunvizinho em direção à área central do defeito (RUPPRECHT e outros, 2003; BARRETO, 2006; CARDOSO e outros, 2006; MIGUEL e outros, 2006).

Para a realização destes experimentos há uma variedade de animais. Segundo Frame (1980), durante a escolha destes, deve-se considerar a facilidade de obtenção, custo, manejo e a possibilidade de confecção de defeitos ósseos estáveis. De acordo com estes parâmetros, o rato é um modelo animal apropriado e o mais utilizado em experimentos laboratoriais. Estes animais, apresentam ainda a vantagem de ocupar pouco espaço físico para sua criação e manutenção (LIEBSCHNER, 2004) e, em terapias ósseas regenerativas, requerem pequena quantidade de biomaterial para preencher os defeitos (SCHMITZ e HÖLLINGER, 1986).

A calvária do rato adulto é um sítio adequado para os estudos experimentais de regeneração óssea (FRAME, 1980), visto que possui fácil acesso e manipulação cirúrgica, não requer fixação pós-operatória e tem risco reduzido de complicações pós-cirúrgicas (MARDEN e outros, 1994; VERNA e outros, 2002). Todavia, não há um consenso entre os autores sobre o exato diâmetro do defeito

ósseo crítico a ser criado durante os estudos. Alguns autores utilizam defeitos com 4mm (MULLIKEN e GLOWACKI, 1980), 5mm (BOSCH; MELSEN; VARGERVIK, 1995; BOSCH; MELSEN; VARGERVIK, 1998; CACCIAFESTA e outros, 2001), 6mm (BRUNEL e outros, 1996) ou 8mm (TAKAGI e URIST, 1982; SCHMITZ e HÖLLINGER, 1986; MARDEN e outros, 1994; SWEENEY e outros, 1995; CHESMEL e outros, 1998; FERREIRA e outros, 2004; MARINS e outros, 2004; PANG e outros, 2004; MENDONÇA, 2005; BARRETO, 2006; CARDOSO e outros, 2006; KNESER e outros, 2006; MIGUEL e outros, 2006; INTINI e outros, 2007; BARRETO, 2008).

Defeitos críticos com 8mm são mais adequados quando comparados aos outros de menor diâmetro, pois a regeneração incompleta, observada apenas restrita às bordas do defeito, em média em 3mm, favorece o preenchimento da área remanescente com tecido conjuntivo fibroso (TAKAGI e URIST, 1982; SWEENEY e outros, 1995; CHESMEL e outros, 1998; BARRETO, 2006; CARDOSO e outros, 2006; MIGUEL e outros, 2006; INTINI e outros, 2007; BARRETO, 2008).

Desta forma, nos defeitos com dimensões de 4, 5 e 6mm, a área residual remanescente é pequena e pode apresentar regeneração óssea completa apenas com a utilização de biomateriais osteocondutores, o que não avalia a capacidade osteoindutora de novos materiais e/ou técnicas regenerativas.

2.2 BIOENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA

A bioengenharia tecidual é uma área de pesquisa interdisciplinar que combina fundamentos e técnicas baseados nos conhecimentos de biologia celular e

molecular, engenharias química, física e mecânica, ciências dos materiais e medicina (SEAL; OTERO; PANITCH, 2001; LIEBSCHNER, 2004; KNESER e outros, 2006; WEIGEL; SCHINKEL; LENDLEIN, 2006), para desenvolver tecidos ou substitutos biológicos que possibilitem restaurar a função perdida de um tecido ou órgão.

Para tanto, os pesquisadores baseiam-se na mimetização da estrutura e dos mecanismos fisiológicos do tecido ou órgão-alvo. Logo, têm sido empregados três elementos fundamentais à regeneração tecidual: células, fatores de crescimento e matrizes tridimensionais (IKADA, 2006), nem sempre utilizados simultaneamente.

As MEC são estruturas tridimensionais, sintetizadas fisiologicamente pelas células residentes em cada tecido, que têm como função armazenar água, nutrientes, fatores de crescimento, citocinas e ainda servem como suporte para adesão, crescimento, proliferação e interações celulares, o que as tornam promissoras componentes a serem aplicados nas terapias regenerativas.

Conquanto, para torná-las apropriadas à regeneração tecidual, durante sua preparação e desenvolvimento laboratorial é fundamental aperfeiçoar sua arquitetura, topografia e química de superfície em consonância com as características morfofisiológicas do tecido a ser regenerado ou substituído (ANSELME, 2000).

Estas matrizes, quando implantadas *in vivo*, adsorvem, previamente à interação com as células do hospedeiro, uma camada de proteínas plasmáticas (SHIN; JO; MIKOS, 2003; ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2008), que influenciam o recrutamento, a adesão, a inserção, a diferenciação, a proliferação (BOYAN e outros, 1996; CAPES; ANDO; CAMERON, 2005) e a sobrevivência celulares (ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2008), uma vez que as células

interagem indiretamente com a superfície destas matrizes, por meio do contato direto com estas proteínas (SHIN; JO; MIKOS, 2003).

É válido ressaltar que, dentre as diferentes técnicas atuais empregadas na fabricação dessas matrizes e os diversos tipos de materiais, a escolha adequada é de fundamental importância e depende das particularidades estruturais e físico-químicas projetadas para o biomaterial quando da sua implantação *in vivo*, assim como das características fisiológicas a serem restabelecidas no tecido alvo (SEAL; OTERO; PANITCH, 2001; VATS e outros, 2003; CAPES; ANDO; CAMERON, 2005).

Estas matrizes podem ser compostas por metais, cerâmicas, polímeros naturais e sintéticos ou compósitos, combinação de mais de um destes. É importante destacar que os materiais sintéticos não possuem sítios específicos para adesão direta aos receptores celulares (LIANG e outros, 2004). Além disso, os materiais naturais, compostos primariamente por elementos da MEC, oferecem estruturas biológicas apropriadas aos eventos celulares necessário à regeneração tecidual (SCHMIDT e BAIER, 2000; LIU e MA, 2004), uma grande vantagem em relação aos materiais sintéticos (LIANG e outros, 2004).

De um modo geral, essas matrizes devem ser biocompatíveis, associadas a uma resposta inflamatória mínima, de fácil manipulação, preferencialmente sem necessidade de procedimentos preparatórios prévios à cirurgia de implantação, produzidas em diversos formatos e formas de apresentação, como por exemplo, gel, esferas, blocos, grânulos e arcabouços discos (HUTMACHER, 2000; VATS e outros, 2003; LOGEART-AVRAMOGLU e outros, 2005; IKADA, 2006; MASTROGIACOMO e outros, 2006; DONZELLI e outros, 2007; O'BRIEN e outros, 2007).

Ainda, devem ter fácil adaptação dentro do defeito ósseo, boa capacidade de inserção, proliferação e maturação de células-tronco mesenquimais e

osteoprogenitoras, e formar uma barreira contra os tecidos circunvizinhos (KELLOMÄKI e outros, 2000; DONZELLI e outros, 2007) para impedir a migração destes para o interior do defeito ósseo, os quais limitariam a regeneração óssea.

E nas situações onde a biodegradação faz-se necessária, essas matrizes devem ser fabricadas com materiais degradáveis que sejam absorvidos com uma velocidade proporcional à neoformação óssea gradativa, ao mesmo tempo em que possibilitam a transferência de forças ao novo tecido (LIU e MA, 2004; CAPES; ANDO; CAMERON, 2005; DONZELLI e outros, 2007). No entanto, não devem permanecer por um período excessivamente longo, pois poderá interferir na substituição tecidual da matriz (DONZELLI e outros, 2007). Esta velocidade de degradação pode ser controlada pelo número de ligação intermoleculares presentes no interior de sua estrutura (LIANG e outros, 2004).

Outra característica essencial a essas matrizes é a presença de poros interconectados (LIU e MA, 2004; O'BRIEN e outros, 2005; WEIGEL; SCHINKEL; LENDLEIN, 2006; DONZELLI e outros, 2007; LIU; XIA; CZERNUSZKA, 2007) que estabeleçam uma rede intercomunicante e torne possível a passagem de nutrientes (WENG e WANG, 2001), sinais bioquímicos e mecânicos (LIU; XIA; CZERNUSZKA, 2007) e células para o interior da sua estrutura com subsequente neoformação vascular, síntese de nova MEC e formação tecidual. O diâmetro desses poros deve ser suficientemente apropriado aos eventos celulares, sem, no entanto, comprometer a área de superfície (O'BRIEN e outros, 2005) necessária ao espriamento celular.

Segundo Le Guehennec e outros (2005), se o diâmetro destes for menor que $10\mu\text{m}$, haverá apenas a circulação de fluidos teciduais no interior da matriz. Porém, se o valor se situar entre 15 e $50\mu\text{m}$, tecido neoformado será do tipo

fibrovascular (GREEN e outros, 2002). Porém, se o diâmetro destes poros for entre 50 e 150µm haverá adesão, proliferação e crescimento osteoblástico com síntese de matriz osteóide (WINTERMANTEL e outros, 1996; ROCHA; GOISSIS; ROSSI, 2002; O'BRIEN e outros, 2005; ARPORNMAEKLONG e outros, 2007) e posterior mineralização (Le GUEHENNEC e outros, 2005).

Baseado no que foi exposto, torna-se evidente que as MEC proporcionam suporte físico e atuam como substrato que influenciam e regulam a adesão, crescimento e diferenciação celular. No entanto, devido à elevada complexidade dos seus componentes e das suas interações, ainda não foi possível empregá-las de forma integral, apenas alguns dos seus componentes podem ser utilizados tanto *in vitro* quanto *in vivo* (BADYLAK, 2007). Dentre eles, o colágeno, grupo de proteínas mais numeroso nas matrizes naturais, tem sido amplamente utilizado em diversas aplicações clínicas.

2.3 COLÁGENO COMO BIOMATERIAL

O colágeno é um polímero natural que confere resistência e integridade estrutural a todos os órgãos, principalmente à pele, ao tendão e ao tecido ósseo (FARAJ; KUPPEVELT; DAAMEN, 2007), uma vez que forma fibras com elevada força tênsil. Dentre os diferentes tipos, destaca-se o tipo I, o qual constitui, juntamente com as fibras elásticas, as principais proteínas estruturais da MEC que formam os arcabouços naturais encontrados nos tecidos do corpo humano (DAAMEN e outros, 2005).

As fibras do colágeno tipos I, são constituídas por fibrilas formadas por moléculas de tropocolágeno. Estas últimas, unidades estruturais básicas desta proteína, são compostas por três cadeias polipeptídicas, duas idênticas, denominadas α -1, e outra, α -2 (FRIESS, 1998), associadas umas às outras em uma configuração helicoidal (KHOR, 1997; HING, 2004; STRASSER e outros, 2007), exceto nas extremidades carboxi e amino terminal, onde há regiões com aa que não são agrupados à estrutura da tripla hélice, denominados de telopeptídeos (FRIESS, 1998), responsáveis pela sua antigenicidade (LEVY, e outros, 1986; KHOR, 1997; CHEVALLAY e HERBAGE, 2000).

Cada cadeia polipeptídica contém, aproximadamente, 1000 resíduos de aa (PLEPIS; GOISSIS; DAS-GUPTA, 1996), seqüenciados como unidades repetitivas que contêm glicina (Gly), denominadas tripletes do tipo (Gly-X-Y)_n, onde os resíduos X e Y, frequentemente, são os aa prolina (PLEPIS; GOISSIS; DAS-GUPTA, 1996; SEAL; OTERO; PANITCH, 2001) e hidroxiprolina (Figura 1) (PLEPIS; GOISSIS; DAS-GUPTA, 1996; SEAL; OTERO; PANITCH, 2001). A localização do resíduo de Gly nesta posição, ao longo da cadeia seqüenciada de aa, é um pré-requisito para a formação da tripla hélice (PLEPIS; GOISSIS; DAS-GUPTA, 1996; FRIESS, 1998; AMARAL, 2006).

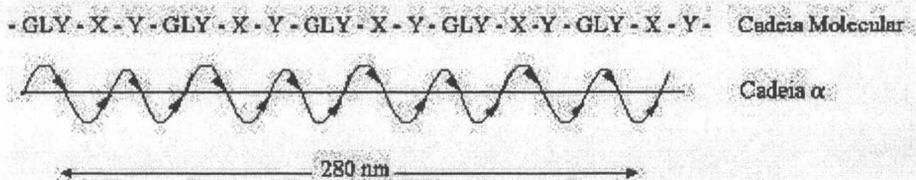


Figura 1 – Seqüência de aa na cadeia polipeptídica α da molécula de tropocolágeno. (CUNHA, 2006)

Alguns resíduos desta proteína são polares em seu estado natural e quando dissociados, os grupos carboxílicos (carboxil) carregam-se negativamente e os grupos arginílicos (arginil), positivamente (RADHIKA; BABU; SEHGAL, 1999).

As cadeias polipeptídicas desta proteína são estabilizadas por meio de ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas, intra e inter-moleculares (HING, 2004) que proporcionam força tênsil, estabilidade e resistência à degradação proteolítica (FRIESS, 1998).

Em análise ultra-estrutural, as moléculas de tropocolágeno medem, aproximadamente, 300nm de comprimento e 1,5nm de diâmetro (HING, 2004; STRASSER e outros, 2007). Para formar as fibrilas, estas moléculas organizam-se longitudinalmente com intervalos de 40nm, entre o final de uma molécula e o início de outra, denominados *gaps*, e dispõem-se bilateralmente com uma diferença de um quarto em relação às moléculas adjacentes (HING, 2004), o que forma regiões de sobreposição conhecidas como *overlaps*, medindo 27nm (RHO; KUHN-SPEARING; ZIOUPOS, 1998). Esta distribuição molecular é repetitiva e ordenada ao longo da estrutura da fibrila, o que caracteriza os períodos D desta proteína (Figura 2) (FRIESS, 1998; RHO; KUHN-SPEARING; ZIOUPOS, 1998). Nestes períodos, os aa estão distribuídos em grupos, de acordo com seu caráter ácido ou básico, que caracterizam os subperíodos, também conhecidos como bandas (Figura 3) (SILVA, 2005).

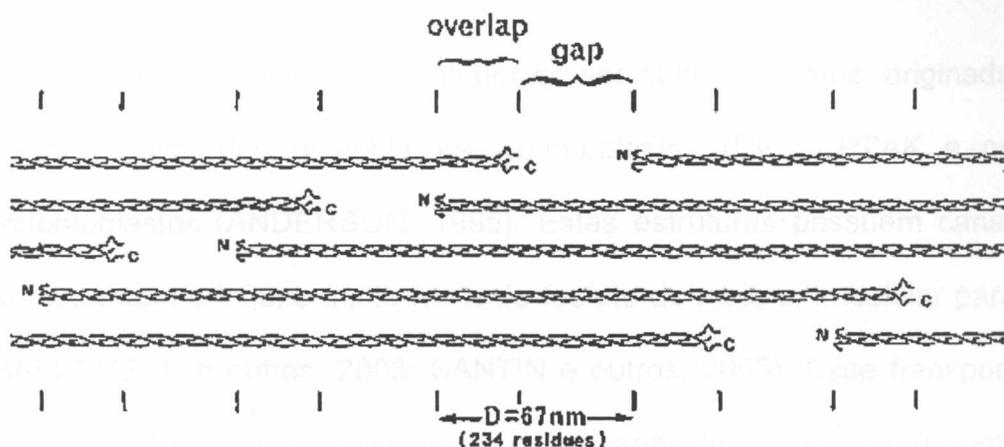


Figura 2 – Modelo organizacional da fibrila de colágeno mostrando o deslocamento de um quarto de uma tripla hélice em relação à molécula adjacente e as regiões de *gap* e *overlap* que formam o período D do colágeno. (ALVES, 2006)

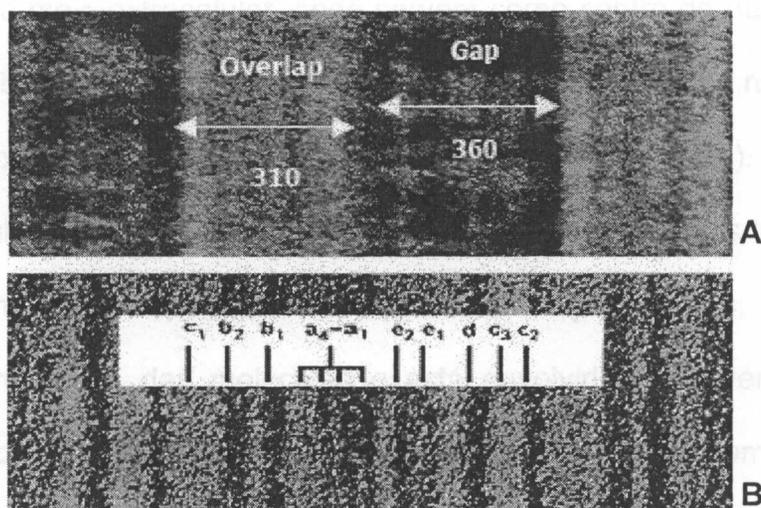


Figura 3 – Micrografia de microscopia eletrônica de transmissão (MET) das regiões de *gap* e *overlap* do período D (A). Em B, nota-se a distribuição dos aa ácidos e básicos que formam os subperíodos do intervalo D. (SILVA, 2005; ALVES, 2006)

Nos tecidos mineralizados, o colágeno associa-se a proteínas não-colagênicas, que facilitam a deposição de cristais de hidroxiapatita, inicialmente amorfos, nas regiões de *gap* da fibrila de colágeno. Estes posteriormente crescem alinhados paralelamente às fibrilas (BOSKEY, 1992), nos espaços interfibrilares da fibra de colágeno (RHO; KUHN-SPEARING; ZIOUPOS, 1998; CHEVALLAY e HERBAGE, 2000), o que caracteriza uma das duas vias possíveis da biomineralização (ANDERSON, 1995).

A segunda via inicia-se no interior de vesículas da matriz, originadas da membrana plasmática dos osteoblastos, condroblastos (BALCERZAK e outros, 2003) e odontoblastos (ANDERSON, 1995). Estas estruturas possuem canais de cálcio que favorecem o influxo deste íon e de fosfato do meio extracelular para seu interior (BALCERZAK e outros, 2003; SANTIN e outros, 2006). Esse transporte de íons fosfato para interior das vesículas inicia o desenvolvimento de um complexo mineral amorfo, seguido pela rápida formação dos cristais de HA (BALCERZAK e outros, 2003). Os agregados cristalinos crescem, rompem as vesículas e são liberados para o meio extracelular, onde servem como centro de nucleação mineral. Esta forma de biomineralização é auto-sustentável, desde que os níveis de cálcio e fosfato no fluido extracelular sejam constantes (ANDERSON, 1995).

O colágeno, além de proporcionar suporte estrutural aos tecidos e órgãos, também desempenha importante função na formação destes, haja vista que participa da orientação das moléculas e está envolvido em diversas expressões celulares funcionais (LEE; SINGLA; LEE, 2001), o que o torna uma matéria-prima adequada e amplamente utilizada na preparação de biomateriais desenvolvidos para aplicações clínicas diversas, especialmente na bioengenharia tecidual óssea.

Em adição, esta proteína também se destaca como base para a confecção de biomateriais por possuir propriedades hemostáticas, ter alta biocompatibilidade e baixa antigenicidade (PLEPIS; GOISSIS; DAS-GUPTA, 1996; CIRELLI, e outros 1997; RADHIKA; BABU; SEHGAL, 1999; CHEVALLAY e HERBAGE, 2000; LEE; SINGLA; LEE, 2001; ROCHA e outros, 2004; O'BRIEN e outros, 2005).

Ademais, o colágeno possibilita a adesão, a inserção e o crescimento celular em associação à sua estrutura, por possuir em sua composição molecular

domínios de reconhecimento celular (ANSELME, 2000), conhecidos como seqüências RGD, formadas pelos aa arginina-glicina-ácido aspártico (COWLES e outros, 1998). Estes sítios interagem com a fibronectina presente na MEC, que por sua vez reconhece glicolipídeos presentes na membrana plasmática (KLEINMAN; KLEBE; MARTIN, 1981) e estabelece, assim, adesões fibrilares (CUKIERMAN e outros, 2001) essenciais à ancoragem celular.

Concomitantemente, o colágeno também constitui adesões focais, por meio da ligação das RGD às integrinas encontradas nas superfícies celulares. Estas adesões consistem em uma forma de ligação do citoesqueleto e proteínas citoplasmáticas ao meio externo (Figura 4) (BAXTER, e outros, 2002) e transmite informações entre as moléculas da MEC e as proteínas citoplasmáticas (CUKIERMAN e outros, 2001). Assim, uma vez integradas, as integrinas ativam uma cascata de reações intracelulares que conduzem às respostas celulares, por meio da expressão gênica e subsequente alteração no fenótipo celular (MEYER e outros, 2005; STEVENS e GEORGE, 2005), o que possibilita a célula aderir à superfície do biomaterial (BAXTER e outros, 2002) e emitir extensões citoplasmáticas, denominadas lamelipódios, indispensáveis a migração celular (GIANCOTTI e RUOSLAHTI, 1999).

Esta interação célula-colágeno fundamenta o grande potencial da utilização desta proteína na bioengenharia tecidual (CHEVALLAY e HERBAGE, 2000), a partir da sua reconstituição ou purificação, ou manutenção de sua estrutura original, porém acelularizada (GRATZER; SANTERRE; LEE, 2004), especialmente como matrizes tridimensionais para suporte e crescimento celular.

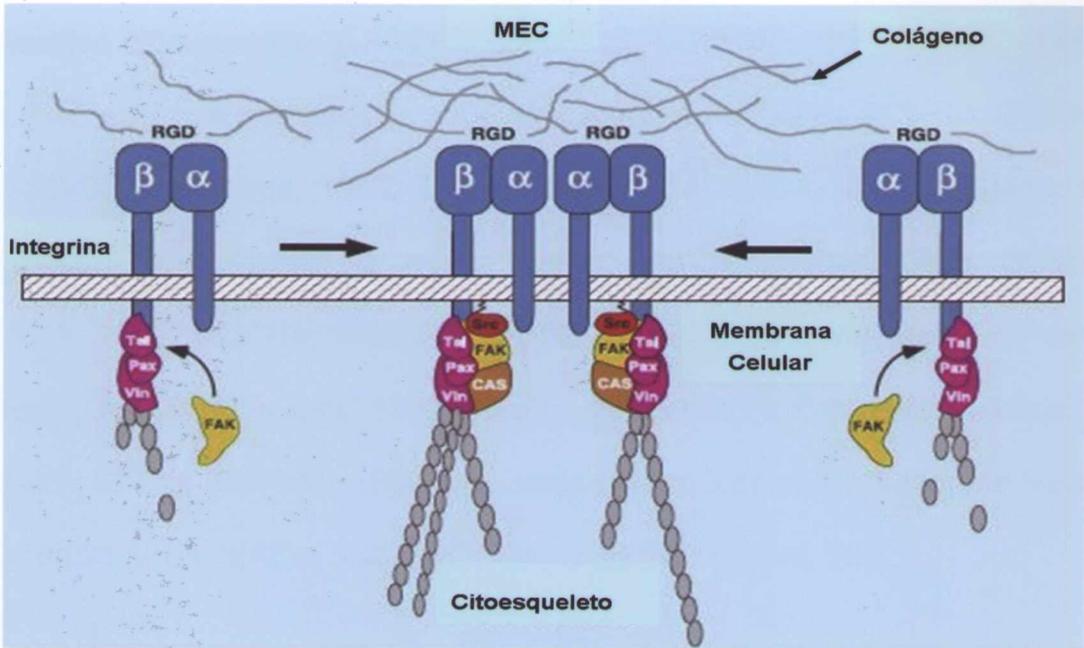


Figura 4 – Esquema ilustrando a integração das proteínas da MEC, em especial o colágeno, com a superfície celular, via RGD. (modificado de GIANCOTTI e RUOSLAHTI, 1999)

Vale ressaltar que a estrutura destas matrizes, assim como seu método de preparação, influenciam a resposta inflamatória, a angiogênese e a afinidade eletrostática para o sítio de implantação (VARDAXIS; BOON; RUIJGROK, 1996). Para se obterem os resultados desejados a partir dos objetivos traçados, esta proteína necessita ter suas propriedades físicas, químicas e biológicas, tais como, antigenicidade, suscetibilidade a degradação enzimática e resistência mecânica, aperfeiçoadas (FRIESS, 1998; RADHIKA; BABU; SEHGAL, 1999; JORGE-HERRERO e outros, 1999; LEE; SINGLA; LEE, 2001; CHEN; HO; SHEU, 2005), por meio de tratamentos físicos ou químicos (PETITE e outros, 1995).

Para o tratamento químico existem diversas técnicas e substâncias, selecionadas de acordo com a aplicação clínica do biomaterial (JORGE-HERRERO e outros, 1999). Uma técnica que tem sido empregada com sucesso é a hidrólise seletiva dos grupos carboxiamida dos resíduos de Asn e Gln (Figura 5) (PLEPIS; GOISSIS; DAS-GUPTA, 1996; LACERDA; PEPLIS; GOISSIS, 1998; BET; GOISSIS; LACERDA, 2001). Este método torna esta proteína com propriedades superiores àquelas do colágeno nativo (RADHIKA; BABU; SEHGAL, 1999), principalmente suas

propriedades piezoelétricas (LACERDA; PLEPIS; GOISSIS, 1998; GÓES e outros, 2002), sem alterar a estrutura química secundária (LACERDA; PLEPIS; GOISSIS, 1998; GOISSIS e outros, 1998; BET; GOISSIS; LACERDA, 2001). Durante este procedimento, as células da matriz nativa são removidas (BET; GOISSIS; LACERDA, 2001; ROCHA; GOISSIS; ROSSI, 2002) e há a introdução de cargas negativas (GOISSIS e outros, 1998), devido à dissociação dos grupos carboxílicos (RADHIKA; BABU; SEHGAL, 1999), que variam de acordo com o tempo de hidrólise (BET; GOISSIS; LACERDA, 2001; ROCHA; GOISSIS; ROSSI, 2002).

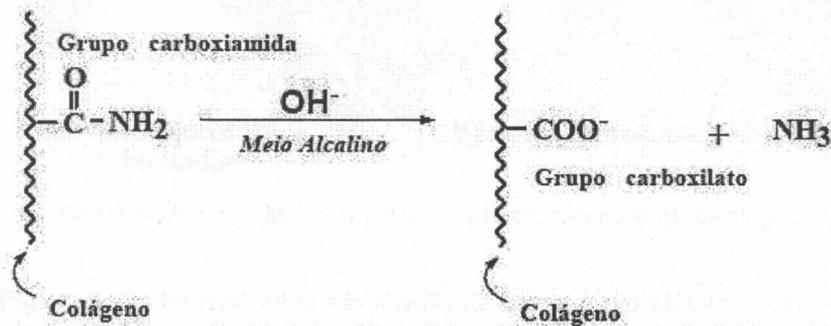


Figura 5 – Esquema da hidrólise, em meio alcalino, dos resíduos de Asn e Gln presentes no colágeno. (PAULA, 2003)

Se a hidrólise for de 24 horas, a quantidade de cargas negativas adicionadas a esta proteína não interfere na capacidade do colágeno em formar fibrilas (BET; GOISSIS; LACERDA, 2001; ROCHA; GOISSIS; ROSSI, 2002). No entanto, modifica suas interações eletrostáticas e produz alterações na superfície das microfibrilas, com subsequente alteração da sua topografia (BET e outros, 2003; GOISSIS; MAGINADOR; MARTINS, 2003; SILVA, 2005), observada por meio da redução na distância entre os subperíodos do intervalo D (BET e outros, 2003), caracterizada pela mudança na conformação da barreira hidrofóbica presente na junção *gap:overlap* (FIGURA 6) (GOISSIS; MAGINADOR; MARTINS, 2003), favorecendo a deposição de íons de cálcio e de fosfato por diferenças eletrostáticas e, conseqüentemente, promovendo a mineralização *in vitro* e *in vivo* (ROCHA;

GOISSIS; ROSSI, 2002; GOISSIS; MAGINADOR; MARTINS, 2003; ROCHA e outros, 2004; SILVA, 2005; MIGUEL e outros, 2006).

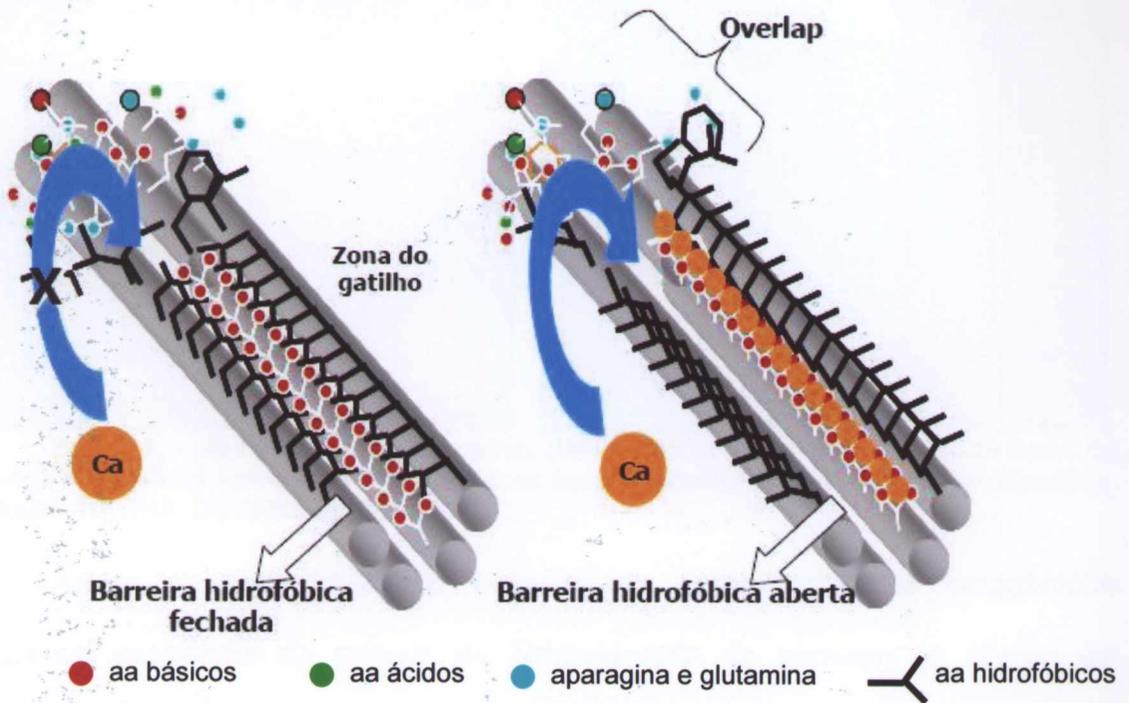


Figura 6 – Alteração na conformação da barreira hidrofóbica, após 24 horas de hidrólise dos resíduos de Asn e Gln. (GOISSIS; MAGINADOR; MARTINS, 2003; SILVA, 2005)

De acordo com o estudo morfológico realizado por Rocha; Goissis; Rossi (2002), após a hidrólise o aspecto denso da matriz nativa assume aspecto esponjoso, com poros de diferentes formas e diâmetros (Figura 7). Essas características, em conjunto com sua topografia e energia de superfície, influenciam positivamente a adesão e comportamento das células (BET e outros, 2003; GOISSIS; MAGINADOR; MARTINS, 2003), sobretudo por não alterar a conformação dos domínios RGD (ROCHA; GOISSIS; ROSSI, 2002).

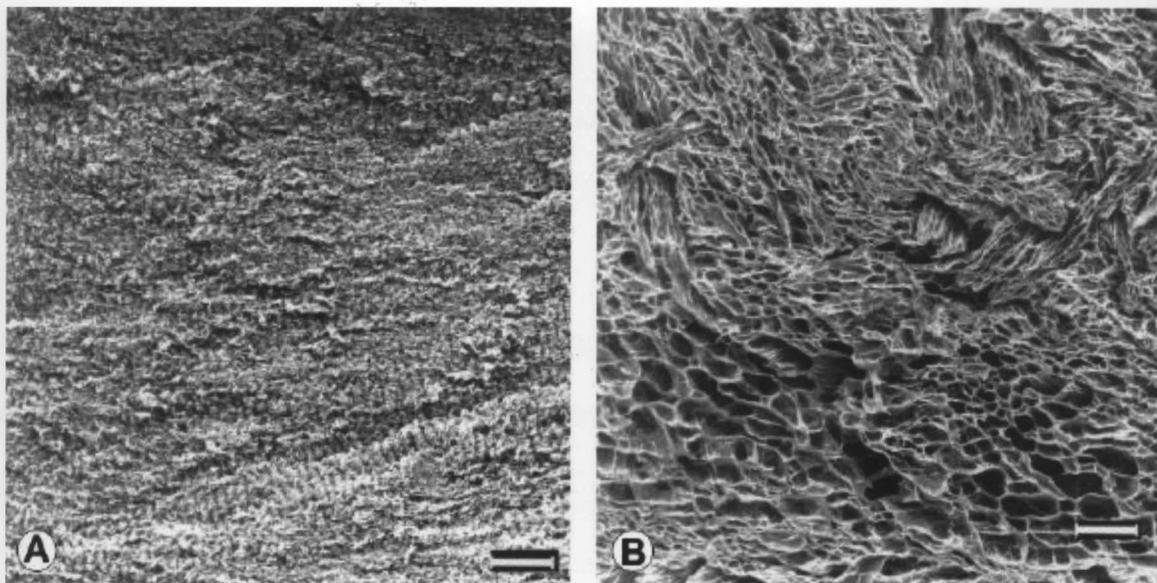


Figura 7 – (A) Pericárdio bovino nativo. **(B)** Pericárdio bovino poroso após 24 horas de hidrólise dos resíduos de Asn e Gln. Nota-se que os poros possuem diferentes formas e diâmetros. Barra 100µm. (ROCHA; GOISSIS; ROSSI, 2002)

Assim, o comportamento biomimético destas matrizes colagênicas aniônicas na deposição de cristais de hidroxiapatita de permeio às fibrilas de colágeno corrobora com o potencial uso destes biomateriais como suporte para o crescimento tecidual na regeneração do tecido ósseo.

No contexto da bioengenharia tecidual, o controle da biodegradação desta proteína é essencial à regeneração tecidual. Os protocolos de tratamentos instituídos ao colágeno para alterar sua resistência à proteólise baseiam-se no estabelecimento de novas ligações cruzadas entre grupos de aa funcionais da molécula (CIRELLI e outros, 1997; KHOR, 1997; GRATZER; SANTERRE; LEE, 2004), as quais, uma vez estabelecidas, reduzem ou neutralizam as propriedades antigênicas, ao mesmo tempo em que aumentam a resistência à degradação e possibilitam uma maior permanência do biomaterial no sítio de implantação (CIRELLI e outros, 1997), o que é compatível com a neoformação tecidual óssea.

De um modo geral, os principais agentes usados para este fim são bifuncionais, capazes de interagir com o colágeno em dois sítios diferentes (KHOR, 1997). Dentre estes, o mais amplamente utilizado é o GA (PETITE e outros, 1995;

CHEVALLAY e HERBAGE, 2000; SCHMIDT e BAIER, 2000; ANGELE e outros, 2004), sobretudo em biomateriais com finalidade de substituir próteses valvulares cardíacas (KHOR, 1997; GOISSIS; BRAILE; GIGLIOTI, 1999), de ser aplicado em correções plásticas (PAULA; GOISSIS; MARTINS, 2007), no tratamento da incontinência urinária (KNUDSON e outros, 2006) ou na regeneração de tecidos moles, como o periodonto (CIRELLI e outros, 1997) e duro, como o osso (MIGUEL e outros, 2006).

Os aldeídos presentes em cada extremidade da molécula de GA interagem quimicamente com os grupos amino (KHOR, 1997), especificamente com os resíduos de lisina e hidroxilisina (GOISSIS; BRAILE; GIGLIOTI, 1999; JORGE-HERRERO e outros, 1999) presentes nas cadeias laterais dos resíduos de Asn e Gln (JORGE-HERRERO e outros, 1999) e produzem ligações cruzadas entre estes (FIGURA 8), alterando as propriedades microestruturais do colágeno (CHARULATHA e RAJARAM, 2003). Além de introduzir mais ligações do que os outros tipos de aldeídos, com o uso do GA, estas ligações são mais estáveis (BOWES e CATER, 1965).

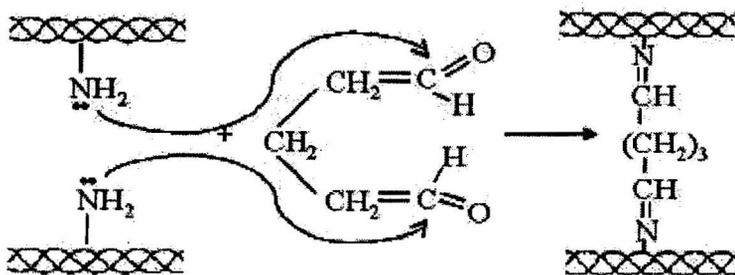


Figura 8 – Esquema das ligações cruzadas estabelecidas pelo GA com a molécula de colágeno. (CUNHA, 2006)

As ligações cruzadas entre os resíduos de lisina e hidroxilisina elevam o peso molecular, reduzem a solubilidade, conservam a configuração molecular (BOWES e CATER, 1965), aumentam as cargas negativas (BOWES e CATER,

1965; TILLER e outros, 2001) e a resistência à degradação (BOWES e CATER, 1965; FRIESS, 1998) e, por fim, diminuem a antigenicidade (CROFTS e TROWBRIDGE, 1988; GOISSIS; BRAILE; GIGLIOTI, 1999).

A reação do GA com o grupamento amino das proteínas depende da espessura do biomaterial (KHOR, 1997), da concentração do aldeído, do tempo de reticulação, da temperatura de reticulação e do pH (BOWES e CATER, 1965; KHOR, 1997; GOISSIS; BRAILE; GIGLIOTI, 1999). Este último deve permanecer entre 7 e 8. Valores menores limitam a reação e, maiores, favorecem a formação de polímeros e reduz sua eficácia (BOWES e CATER, 1965).

Em relação à concentração do GA, estudos têm demonstrado que, de forma geral, as menores são mais eficientes (VARDAXIS; BOON; RUIJGROK, 1996; KHOR, 1997; FRIESS, 1998), visto que são adequadas para elevar a estabilidade térmica (GAVILANES e outros, 1984), desencadeiam respostas inflamatórias mais brandas e mineralização mais eficiente (VARDAXIS; BOON; RUIJGROK, 1996).

O tempo de tratamento do biomaterial varia, também, de acordo com sua espessura (KHOR, 1997), tendo em vista que, quando as ligações são estabelecidas com os aa lisina e hidroxilisina, ocorre uma impermeabilização superficial que retarda a penetração do GA no interior do biomaterial (KHOR, 1997; GOISSIS; BRAILE; GIGLIOTI, 1999). Desta forma, reticulações por períodos mais longos possibilitam a formação de um maior número de ligações cruzadas no interior do material, o que favorece a permanência do biomaterial no sítio de implantação, uma vez a degradação é inversamente proporcional ao número de ligações cruzadas estabelecidas (GOISSIS e outros, 1999).

Adicionalmente ao problema da impermeabilização, estas ligações são responsáveis pela liberação de monômeros de aldeído livres que resultam em

citotoxicidade (SPEER e outros, 1980; COURTMAN e outros, 1994; GOISSIS; BRAILE; GIGLIOTI, 1999), representada *in vivo* por uma resposta inflamatória que pode limitar a migração e proliferação das células regenerativas e, conseqüentemente, sua aplicação clínica. Entretanto, Vardaxis, Boon, Ruijgrok, (1996), Cirelli e outros (1997); Goissis e outros (1999) e Miguel e outros (2006) observaram que esta resposta inflamatória não compromete a utilização das matrizes colagênicas, ao menos nas técnicas de regeneração tecidual, uma vez que a inflamação evidenciada nesses estudos foi do tipo crônica moderada e regressiva ao longo do tempo.

Outra característica que pode ainda pode limitar algumas aplicações clínicas dos biomateriais reticulados em GA é a facilidade de mineralização após implantação (JORGE-HERRERO e outros, 1999; CHEVALLAY e HERBAGE, 2000; SCHMIDT e BAIER, 2000), especialmente na substituição de próteses cardíacas ou nas aplicações para correções plásticas, situações onde não se deseja mineralização.

Esse mecanismo é desencadeado por diferentes fatores, dentre eles a presença de fosfolípeos, que atraem eletrostaticamente íons cálcio (KHOR, 1997), e de remanescentes celulares retidos durante o processamento tecidual (SCHMIDT e BAIER, 2000). Em alguns biomateriais colagênicos, como aqueles derivados do pericárdio bovino, existem fatores constitutivos, carregados negativamente, como por exemplo as proteoglicanas ácidas e os fosfolípeos, que favorecem a atração de íons cálcio e fosfato para o interior da sua estrutura, onde são depositados nas regiões de *gap* e *overlap* do período D desta proteína (JORGE-HERRERO e outros, 1999). Diante do exposto, nota-se que há um mimetismo do padrão de mineralização fisiológica observada nos tecidos mineralizados. Logo, nas situações

clínicas onde a mineralização faz-se necessária, biomateriais colagênicos, reticulados em GA, apresentam grande potencial para uso clínico.

Uma vantagem adicional na utilização de biomateriais colagênicos aniônicos de fabricação nacional está correlacionada ao seu baixo custo de preparação em relação ao biomateriais importados (GOISSIS e outros, 1998; ROCHA; GOISSIS; ROSSI, 2002; ROSA e outros, 2003).

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar histomorfometricamente o potencial osteogênico de matrizes colagênicas aniônicas, reticuladas ou não em glutaraldeído, implantadas em defeitos ósseos críticos, em calvária de rato.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A) Analisar histomorfologicamente, por microscopia de luz, a regeneração de defeitos ósseos críticos, criados em calvária de rato, com implantação de matrizes tridimensionais de colágeno, aniônicas e não-aniônicas, reticuladas ou não em glutaraldeído, avaliadas nos pontos biológicos de 15, 45, 90 e 120 dias de pós-implantação do biomaterial.

B) Quantificar morfometricamente a neoformação vascular e a neomineralização decorrentes da implantação dos biomateriais supracitados, nos mesmos pontos biológicos de observação.

C) Identificar, por técnicas de imunistoquímica indireta, a presença de vasos sangüíneos e a ativação macrofágica, observados de permeio às fibras de colágeno, nos pontos biológicos supracitados.

Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MODELO EXPERIMENTAL

Os procedimentos experimentais deste estudo foram realizados no Centro de Criação de Animais de Experimentação da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia (UFBA), após aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais (anexo I) do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

Nesta pesquisa foram utilizados, como modelo experimental, oitenta e seis ratos machos (*Rattus norvegicus*) da linhagem *wistar*, com massa corporal entre 400 e 450g, com, aproximadamente, 3 a 5 meses de idade. Durante todo o experimento, os animais receberam água à vontade e ração sólida¹. Os animais foram divididos aleatoriamente para a composição de quatro grupos, com seis animais em cada ponto biológico, exceto para o G1, que foi composto por cinco animais, em virtude da perda de biomaterial do mesmo lote para ser implantado durante o experimento: G1 – matriz colagênica aniônica com 24h de hidrólise e

¹ Nuvital do Brasil®

15min de reticulação em GA 0,05% (MCAHGA); **GII** – matriz colagênica aniônica com 24h de hidrólise (MCA); **GIII** – matriz colagênica neutra, controle positivo (MCN) e **GIV** – defeito ósseo vazio, sem implantação de biomaterial, preenchido por coágulo sanguíneo, controle negativo. Os animais foram avaliados ao final de 15, 45, 90 e 120 dias de acordo com a tabela 1. Para o grupo GIII, devido à quantidade limitada de biomaterial, optamos em excluir o ponto biológico de 90 dias.

Tabela 1 – Número de animais de acordo com o grupo e período.

Período Grupo	15 dias	45 dias	90 dias	120 dias	Total
G I	5	5	5	5	20
G II	6	6	6	6	24
G III	6	6	-----	6	18
G IV	6	6	6	6	24
Total	23	23	17	23	86

4.2 BIOMATERIAIS

4.2.1 Preparação das matrizes por meio da hidrólise seletiva

Os biomateriais implantados nos grupos I e II foram desenvolvidos e fornecidos pelo Prof. Dr. Gilberto Goissis da Proline Biomédica®. As matrizes foram preparadas a partir de mantas de pericárdio bovino com dimensões de 10x10cm tratadas com uma solução alcalina composta por sulfatos e cloretos de K⁺, Ca⁺⁺ e

Na⁺ a 20°C, durante 24h. Em seguida, as mantas foram estabilizadas por seis horas, em uma solução neutra composta por cloretos e sulfatos dos cátions supracitados. O excesso de sais residuais foi removido por lavagens sucessivas com ácido bórico a 3% (3x, 6h), EDTA 0,3% com pH 11 (3x, 6h) e água destilada (6x, 2h). Logo depois, as matrizes foram estabilizadas em tampão fosfato 0,14mol⁻¹, com pH 7,4 e lavadas com água destilada (3x, 15min). Ao final deste tratamento, a matriz densa do pericárdio bovino tornou-se acelularizada, porosa (BET; GOISSIS; LACERDA, 2001; ROCHA; GOISSIS; ROSSI, 2002) e a molécula do colágeno, neutra em pH 7,4, aniônica, devido à introdução de 46±12 cargas negativas por molécula desta proteína (LACERDA; PEPLIS; GOISSIS, 1998; BET; GOISSIS; LACERDA, 2001; BET e outros, 2003)

4.2.2 Reticulação das matrizes em GA

As MCA do GI foram reticuladas, durante 15min, em GA (0,05%), em tampão fosfato 0,14 mol⁻¹ com pH 7,4. Após este procedimento, as matrizes foram lavadas em água destilada (3x), congeladas em nitrogênio líquido e submetidas à liofilização em equipamento modelo *FREEZE DRYER Modulyo*², até obtenção de peso constante (CIRELLI e outros, 1997; GOISSIS e outros, 1999).

² EDWARDS®

4.2.3 Controle positivo

Este estudo utilizou como controle positivo, matrizes colagênicas neutras produzidas a partir de tendão bovino, sem hidrólise seletiva e reticulação em GA³. Estas matrizes foram preparadas, caracterizadas e fornecidas pela Dr^a. Isabel Maria Santana Ramos de Freitas Amaral, do Instituto de Engenharia Biomédica – INEB, Universidade do Porto, Porto, Portugal. As matrizes deste colágeno apresentaram poros com diâmetro médio de 173 μ m (Figura 9).

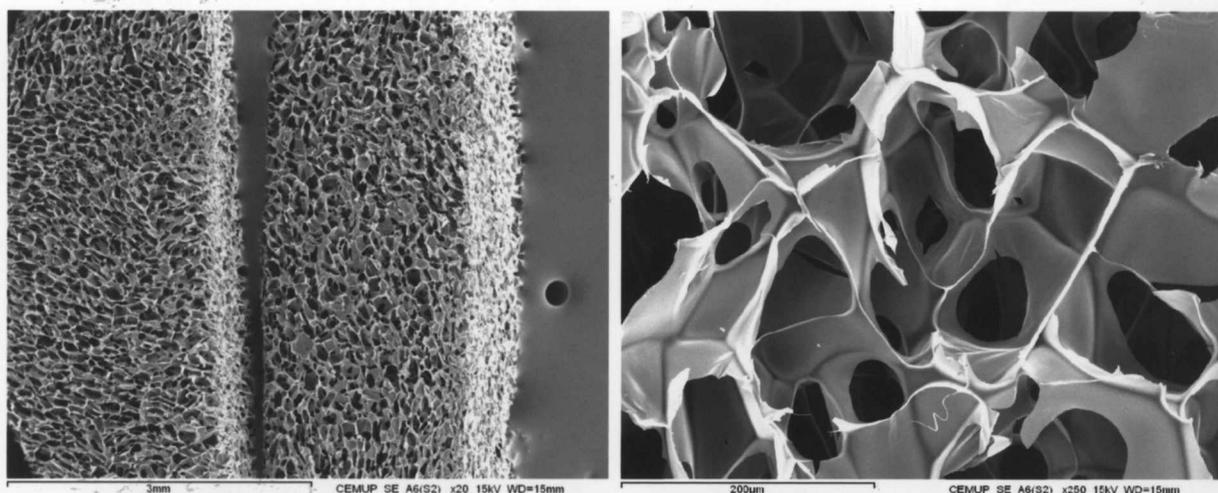


Figura 9. Fotomicrografia de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da matriz de colágeno neutro.

4.2.4 Esterilização e recorte dos biomateriais

As matrizes colagênicas aniônicas, implantadas nos grupos I e II, foram colocadas em embalagens apropriadas e submetidas ao processo de esterilização em óxido de etileno. Já as matrizes implantadas nos animais do GIII foram imersas

³ Sigma Aldrich® (C – 07891)

em álcool absoluto e submetidas à tratamento à vácuo para remover possíveis bolhas de ar contidas no seu interior. Ao final, as matrizes já posicionadas ao fundo do tubo *falcon* permaneceram na mesma solução por 10min. Depois desse período, foram imersas, de forma seqüencial, em soluções de álcool a 70% (30min), 50% (10min) e 25% (10 min). Todas as vezes que se fazia necessário, foram recolocadas sob tratamento a vácuo para remoção de bolhas de ar. Por fim, as matrizes foram hidratadas, por 2 vezes, em solução de PBS⁴ (*Phosphate Buffer Solution*) (10min).

Anteriormente à implantação nos defeitos, os biomateriais foram recortados em capela de fluxo laminar, com o auxílio de um cortador manual, devidamente esterilizado (Figura 10 A), com diâmetro de 8,5mm e, acondicionados em frasco tipo *ependorf*[®] (Figura 10 B) contendo solução fisiológica salina, mantidas submersas até o momento da cirurgia (Figura 11 A e B).

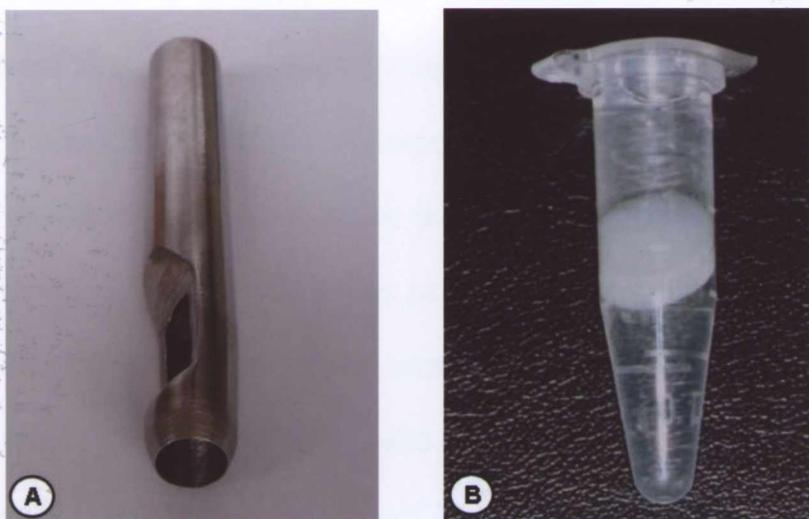


Figura 10 – (A) Cortador manual das matrizes com aproximadamente 8,5mm de diâmetro e (B) biomaterial acondicionado em frasco tipo *ependorf* (2mL) contendo solução fisiológica estéril, para hidratação prévia à cirurgia.

⁴ P3813 Sigma

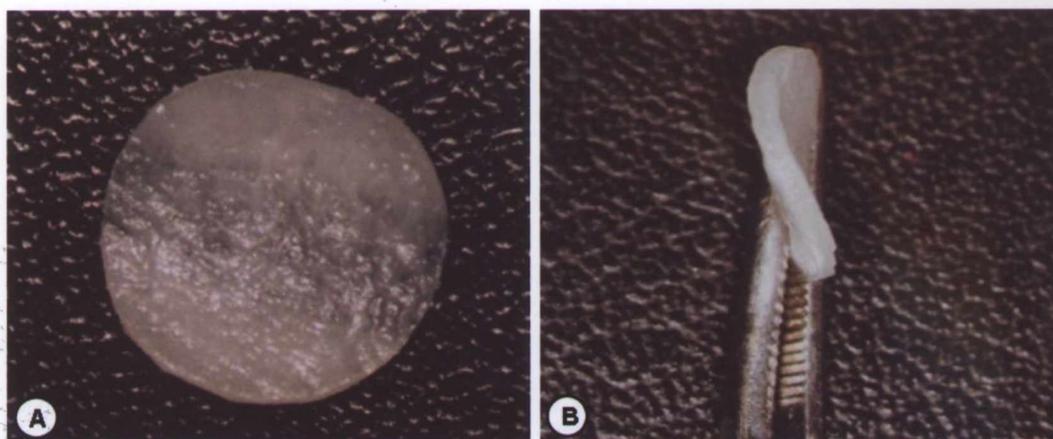


Figura 11 – Vista macroscópica superior do biomaterial reticulado em GA, hidratado, apresentando 8,5mm de diâmetro (A) e lateral, onde é possível observar sua espessura de aproximadamente 0,8mm (B).

4.3 TÉCNICA CIRÚRGICA

Previamente à realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais receberam anestesia geral com injeção intramuscular de cloridrato de quetamina⁵ na proporção de 0,08mL/100g de massa corporal e sedação e analgesia com injeção intramuscular em dose única de cloridrato de xilazina⁶ na proporção de 0,04mL/100g de massa corporal. Em seguida, foram posicionados em decúbito ventral para a realização da tricotomia e anti-sepsia do campo operatório com álcool iodado.

Após esta etapa, fez-se uma incisão cutânea bicoronal, semilunar, com aproximadamente 3cm de extensão, com lâmina de bisturi nº. 15 (Figura 12 A), seguida de divulsão, com tesoura reta de ponta romba, e elevação do retalho para acesso ao perióstio (Figura 12 B). Seguidamente, esta membrana foi incisada e, com o auxílio de uma espátula nº. 07 e pinça clínica, foi removida e o tecido ósseo

⁵ Vetaset®

⁶ Copazine® 2%

subjacente exposto (Figura 12 C). Para confeccionar os defeitos ósseos críticos com aproximadamente 9,0mm de diâmetro utilizou-se uma fresa trefina⁷ com 8mm de diâmetro interno e espessura de 1mm, montada em contra-ângulo com redução de 1:16 (Figura 12 D), acoplado em motor cirúrgico⁸ com 1500rpm, sob constante irrigação com solução fisiológica estéril. Os defeitos com aproximadamente 0,8mm de espessura, correspondente à espessura do osso da calvária, foram confeccionados na porção mediana da calvária (Figura 12 E e F), entre os vértices das suturas anterior e posterior, e removido o fragmento ósseo acompanhado da dura-máter. Por fim, os biomateriais foram implantados (Figura 12 G), o retalho reposicionado e suturado com pontos interrompidos (Figura 12 H) com fio de seda 4.0⁹.

Após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em caixas plásticas individuais, identificadas conforme grupo e ponto biológico. Na ficha de identificação, ainda constavam a massa corporal do animal, data da cirurgia e do sacrifício e o nome do pesquisador.

⁷ Dentoflex

⁸ Driller BLM 350®

⁹ Ethicon, Johnson & Johnson®

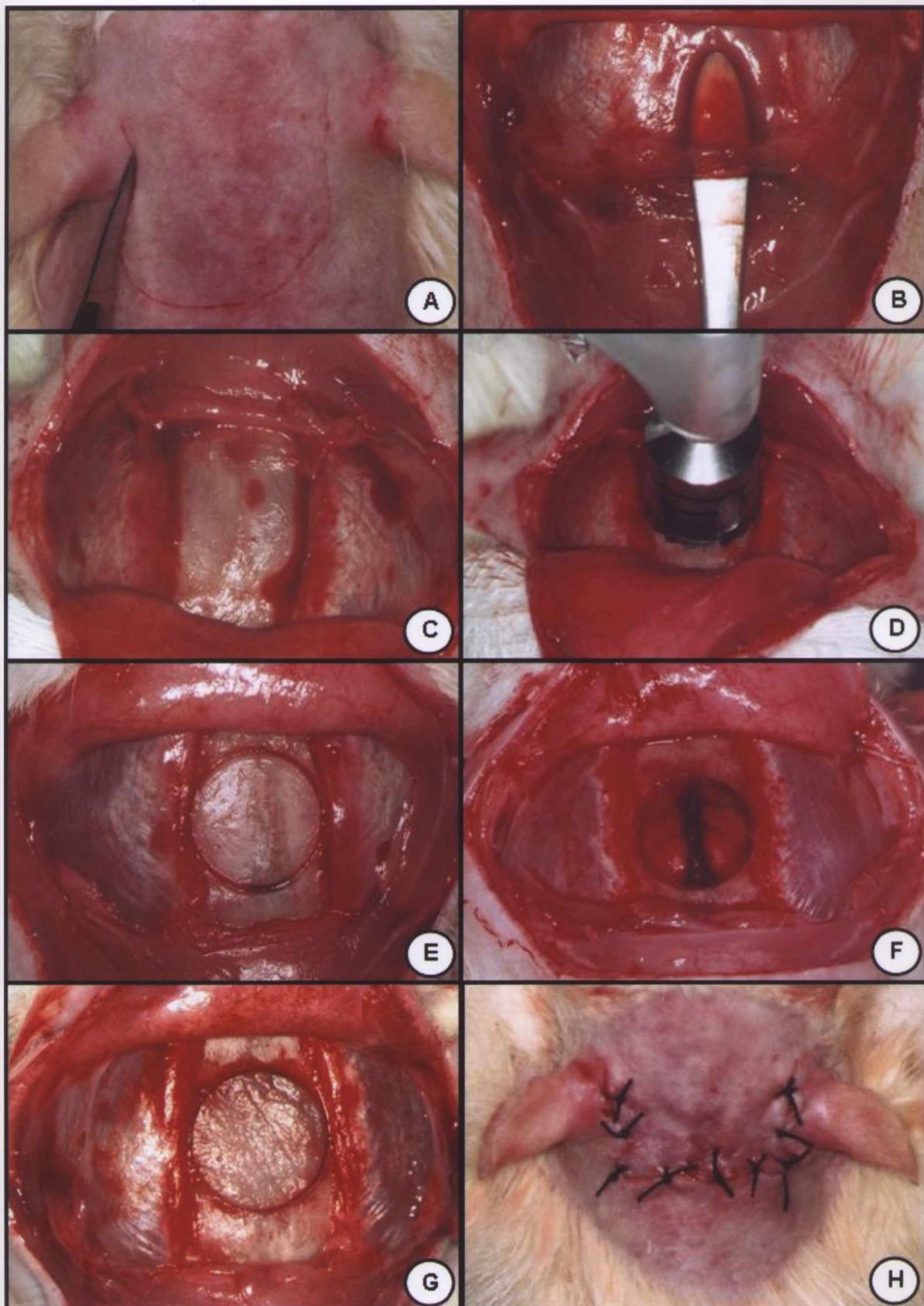


Figura 12 – Sequência cirúrgica para a confecção dos defeitos ósseos críticos e implantação dos biomateriais: (A) incisão cutânea bicoronal semilunar, (B) descolamento e remoção do periósteo, (C) tecido ósseo exposto, (D) confecção do defeito ósseo crítico com fresa trefina, (E) demarcação do defeito ósseo na porção mediana da calvária, (F) defeito crítico (9,0mm) confeccionado, (G) implantação das matrizes colagênicas e (H) retalho reposicionado e suturado com pontos interrompidos.

4.4 OBTENÇÃO DOS ESPÉCIMES

Ao final dos períodos de 15, 45, 90 e 120 dias, os animais foram mortos pela inalação de gás carbônico em câmara de CO₂. Logo após, removeu-se a porção superior da calvária com auxílio de um alicate de corte e tesouras de extremidade reta e romba. Em seguida, removeram-se os tecidos moles e os espécimes obtidos foram colocados em recipientes plásticos, previamente identificados, contendo álcool a 70% para fixação, por no mínimo sete dias, e armazenados em geladeira.

4.5 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais (LBTB) do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da UFBA. A inclusão dos espécimes foi feita em resina, segundo o protocolo cedido pela Prof^a. Dr^a. Maria Eugênia Leite Duarte¹⁰, do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Previamente à inclusão em resina, os espécimes foram reduzidos com discos de carborundum nº. 409¹¹, acoplados em motor elétrico rotativo¹², nas partes látero-inferiores, posterior e anterior da calvária (Figura 13 A). Nesta última, o desbaste excluiu 3mm da região anterior ao defeito (Figura 13 B).

¹⁰ Comunicação pessoal

¹¹ Dremel®

¹² Dremel®

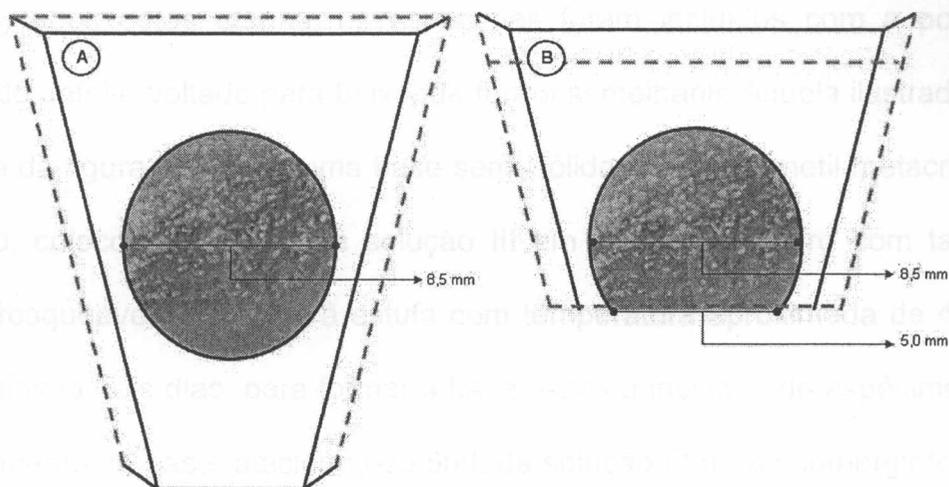


Figura 13 – Esquema dos recortes látero-inferiores e posterior dos espécimes (A) e da porção anterior com exclusão de 3mm de defeito ósseo (B).

De acordo com a seqüência do protocolo descrito na tabela 2, logo após a fixação em álcool a 70% (etapa I), os espécimes foram desidratados (etapas II, III e IV), clarificados (etapa V) e infiltrados em três soluções diferentes (etapas VI, VII e VIII), descritas na tabela 3. Todas estas etapas foram feitas à temperatura de 4°C.

Tabela 2. Seqüência do protocolo de processamento histológico em resina metil-metacrilato. (BARRETO, 2008)

Etapas	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Solução	Álcool 70%	Álcool 95%	Álcool 100%	Álcool 100%	Xilol	Solução I	Solução II	Solução III
Dias	02	02	01	01	01	02	02	01

Tabela 3. Composição das soluções I, II e III utilizadas nas etapas VI, VII e VIII durante o processamento histológico para inclusão dos espécimes em resina metil-metacrilato. (BARRETO, 2008)

Substância	Solução I	Solução II	Solução III
Metil-Metacrilato	75mL	75mL	75mL
Di-Butil-ftalato	25mL	25mL	25mL
Peróxido de Benzofila	-	1g	25g

Após estas etapas, os espécimes foram incluídos com a porção anterior do defeito voltado para baixo, de forma semelhante àquela ilustrada no esquema da figura 13 B, em uma base semi-sólida de resina metil-metacrilato. Para isto, colocou-se 2,0mL da solução III em frascos de vidro com tampa plástica rosqueável e levados à estufa com temperatura aproximada de 40°C, por no mínimo dois dias, para formar a base. Após a inclusão do espécime e o endurecimento da base, adicionou-se 5mL da solução III para submergir toda a amostra e formar o bloco de resina. Em seguida, os frascos foram fechados e colocados na estufa a 40°C por no mínimo três dias, para a completa polimerização da resina.

Na sequência, após a polimerização da resina os vidros foram quebrados para obtenção dos blocos, os quais foram desbastados com uma fresa reta¹³, acoplada ao motor elétrico rotativo. Para realização dos cortes histológicos, os blocos recortados foram adaptados ao micrótomo¹⁴ para cortes de tecidos não descalcificados e desbastados até o diâmetro aproximado de 8,5mm do defeito (Figura 14), mensurado com um compasso de ponta seca e uma régua milimetrada. Em sequência, realizaram-se os cortes histológicos seriados de 6µm de espessura, os quais foram corados por hematoxilina-eosina (HE), picrossírius-vermelho (PV) para identificação das fibras de colágenas e Tricrômico de Masson Goldner (TG) para observação do tecido ósseo neoformado, e examinados por microscopia de luz comum¹⁵.

¹³ Dremel®

¹⁴ Leica RM 2255®

¹⁵ Leica DM 1000



Figura 14 – Esquema da área seccional do defeito, após corte transversal do bloco.

Ademais, um animal de cada grupo foi preparado para inclusão em parafina, de acordo com protocolo de processamento histológico de rotina. Para tanto, as amostras foram descalcificadas em ácido nítrico a 7% por um período de duas horas. Logo após, as calvárias foram processadas em processador automático¹⁶, incluídas em parafina com a região do defeito voltada para baixo e cortadas seriadamente com 5 μ m de espessura e coradas com as mesmas colorações descritas anteriormente.

As amostras destinadas à análise imunoistoquímica foram preparadas de forma semelhante à descrita anteriormente. Para a realização desta técnica, no entanto, os cortes foram realizados com 4 μ m de espessura. Foram utilizados os anticorpos ED-1, actina- α de músculo liso, TGF- β e fator VIII. Esta etapa foi desenvolvida no Laboratório de Patologia Celular do Departamento de Histologia e Embriologia do ICB da UFRJ, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Christina Maeda Takiya.

¹⁶ Leica AST 300®

4.6 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Na avaliação morfológica, mensurou-se os seguintes parâmetros:

(A) extensão linear do defeito, em milímetros, (B) área seccional neomineralizada em relação à área seccional total do defeito (Figura 15) e (C) número de capilares sanguíneos em área padrão de $10^6 \mu\text{m}^2$ (selecionada aleatoriamente) do defeito. Nesta avaliação, foram considerados apenas os capilares cortados transversalmente, cuja relação entre os diâmetros horizontal e vertical não ultrapassasse 20%.

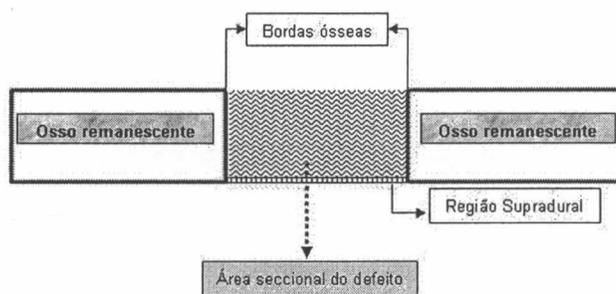


Figura 15 – Esquema da vista transversal da extensão linear e da área seccional do defeito. Neste diagrama, destaca-se também a região supradural do defeito, a qual foi sempre orientada para baixo, nos cortes histológicos.

Para tanto, utilizou-se o seguinte equipamento: microscópio óptico¹⁷ com câmera digital¹⁸, utilizando o Sistema de Análise de Processamento de Imagens¹⁹.

¹⁷ Leica DME

¹⁸ DFC 300 FX®

¹⁹ Software Leica QWIN 3.1®

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística, empregou-se o *software GraphPad Prism*[®] versão 3.1. As diferenças entre as médias foram avaliadas usando-se os testes: *Mann Whitney* (teste não-paramétrico), regressão linear e análise de variância (ANOVA – *one way*) com pós-teste de *Newman – Keulis*. Para um nível de significância de 0,05, os valores foram assim considerados: (A) NS – não significante ($p > 0,05$), (B) S – significante ($0,05 \geq p > 0,005$), (C) MS – muito significante ($0,005 \geq p > 0,001$) e (D) ES – extremamente significante ($p \leq 0,001$).

Resultados

5 RESULTADOS

5.1. ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA

15 dias

GI – MCAGA

Neste ponto biológico o biomaterial implantado apresentou espessura aproximada de 0,07mm, o qual foi visto preenchendo toda a extensão do defeito, com fragmentação de suas fibras na região central. Na interface entre este e a borda óssea houve formação de tecido conjuntivo frouxo com proliferação vascular, evidente somente nesta região (Figura16 B). Na periferia do biomaterial observou-se proliferação e migração de células fusiformes, em direção centrípeta (Figura18), associadas ao edema entre as fibras, o qual as dissociou, principalmente, nas proximidades das bordas ósseas.

De permeio às fibras do biomaterial, houve inflamação crônica discreta com células mononucleares e células gigantes multinucleadas. Estas últimas estavam associadas aos fragmentos ósseos e ao biomaterial, principalmente na periferia da matriz, na região próxima à borda óssea, as quais se apresentaram ora em bisel ora sem, com neoformação óssea regenerativa muito discreta.

Nas adjacências da reação granulomatosa, próximas das bordas ósseas e na região central do defeito, notou-se, na região supradural, início de neomineralização com formação de núcleos esparsos (Figuras 17 e 19). Na periferia destes, foram identificadas células com aspecto de osteoblastos ativos. Em alguns casos evidenciou-se esparsos fragmentos ósseos contaminantes na região supradural, observados, principalmente, na periferia do defeito.

G II – MCA

As matrizes implantadas apresentaram, aproximadamente, 0,05mm de espessura e foram vistas em toda extensão do defeito. Na interface entre estas e as margens ósseas notou-se inflamação crônica granulomatosa discreta associada à formação de tecido conjuntivo frouxo (Figuras 20 e 22). De permeio às fibras do biomaterial, nas áreas onde a inflamação crônica foi observada, evidenciou-se edema, hemorragia e fragmentação das fibras de colágeno da matriz. Em paralelo, foi verificada a proliferação de células

fusiformes, algumas com aspecto morfológico de fibroblasto (Figura 23), e neoformação vascular acompanhada por fibrose. Neste ponto biológico evidenciou-se neoformação óssea regenerativa discreta, em associação às bordas ósseas (Figura 20) e às vezes na área central do defeito, na região supradural. Por meio da análise imunoistoquímica observou-se a expressão intracelular do $\text{TGF-}\beta$ em macrófagos e secretado no interstício, por entre as fibras do biomaterial. Notou-se também a expressão ED-1 em macrófagos ativados (Figura 24).

G III – MCN

No interstício entre as bordas ósseas e o biomaterial, observou-se formação de tecido conjuntivo frouxo com proliferação vascular (Figura 25) e infiltrado inflamatório mononuclear moderado, com predomínio de linfócitos. De permeio as fibras do biomaterial, notou-se também, reação inflamatória, em quase toda sua extensão e espessura, porém com predomínio de polimorfonucleares, acompanhados de poucas células fusiformes (Figura 26). Nas áreas onde a inflamação foi notada com menor densidade celular observou-se edema e hemorragia.

Na periferia do biomaterial, onde a inflamação crônica granulomatosa mostrou-se mais evidente, notou-se fragmentação das suas fibras colagênicas e formação de tecido conjuntivo fibroso de permeio as estas, em direção centrípeta ao biomaterial. As matrizes foram circundadas por

tecido fibroso. A mineralização foi evidente somente restrita às margens do defeito, característica da regeneração observada em proximidades às bordas (Figura 25 A).

G IV – Controle

Os defeitos deste grupo mantiveram-se sem implantação de arcabouços tridimensionais. Assim, observou-se, em toda sua extensão, inflamação crônica discreta associada à proliferação vascular, mais evidente nas proximidades das bordas ósseas. Notou-se também proliferação discreta de células fusiformes e fibroblastos com síntese de tecido conjuntivo frouxo, observado em toda a sua área seccional (Figura 29). A neoformação óssea regenerativa mostrou-se restrita às bordas ósseas do defeito (Figura 28 A), contudo na área central do defeito, na região supradural, evidenciou-se raros e pequenos núcleos de mineralização.

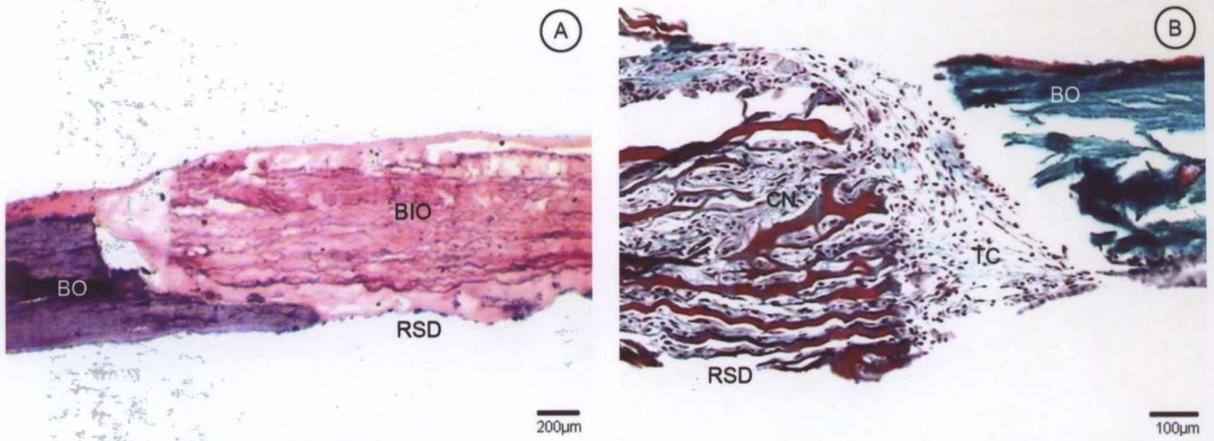


Figura 16. GI 15 D – (A) Borda óssea (BO) em bisel associada à regeneração na região supradural (RSD) e biomaterial (BIO) implantado. HE; resina. Barra 200µm. **(B)** Interface de tecido conjuntivo (TC) entre a borda óssea e o biomaterial, e conjuntivo neoformado entre suas fibras coradas de vermelho, com migração celular. Tricrômico de Masson Goldner (TG); resina. Barra 100µm.

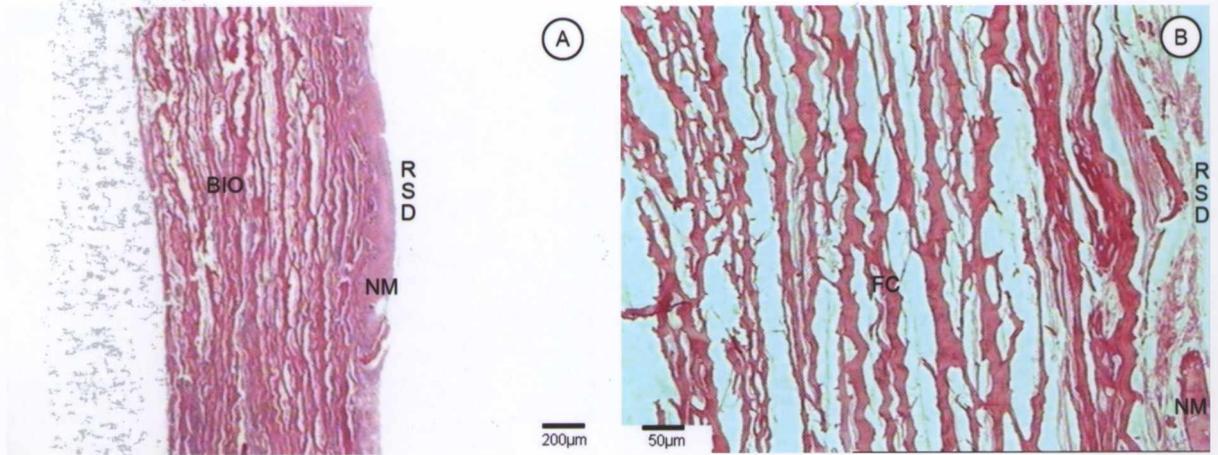


Figura 17. GI 15 D – (A) Região central do defeito com a presença de núcleo de mineralização (NM) na região supradural. HE; parafina. Barra 200µm. **(B)** Fibras colágenas (FC) do biomaterial íntegras com núcleo de mineralização na região supradural. Picrosítius-vermelho (PV); resina. Barra 50µm.

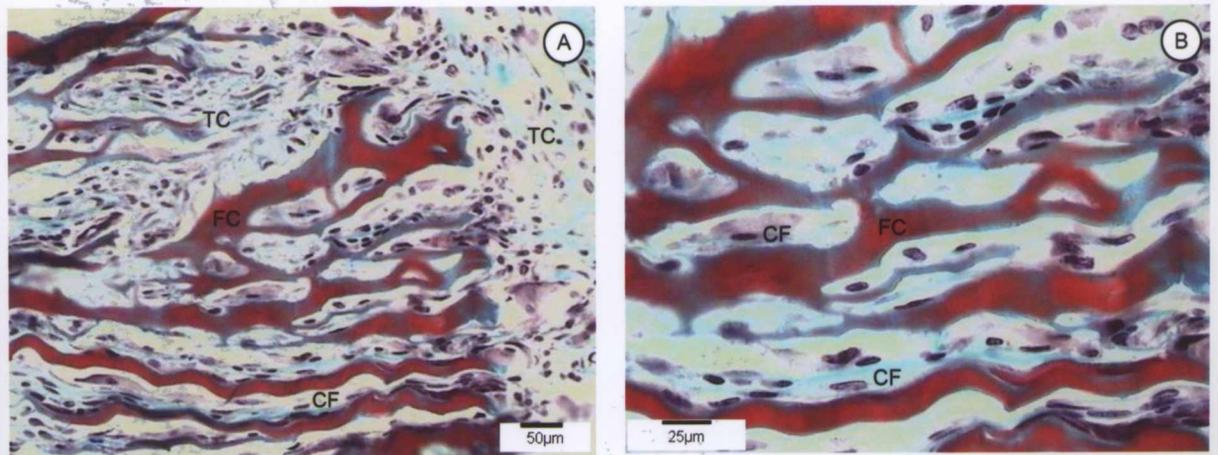


Figura 18. GI 15 D – (A) Proliferação e migração de células fusiformes (CF) em direção centrípeta, de permeio às fibras do biomaterial. TG; resina. Barra 50µm. **(B)** – Detalhe da figura "A", com destaque para as células fusiformes sobrepostas às fibras do biomaterial. TG; resina. Barra 25µm.

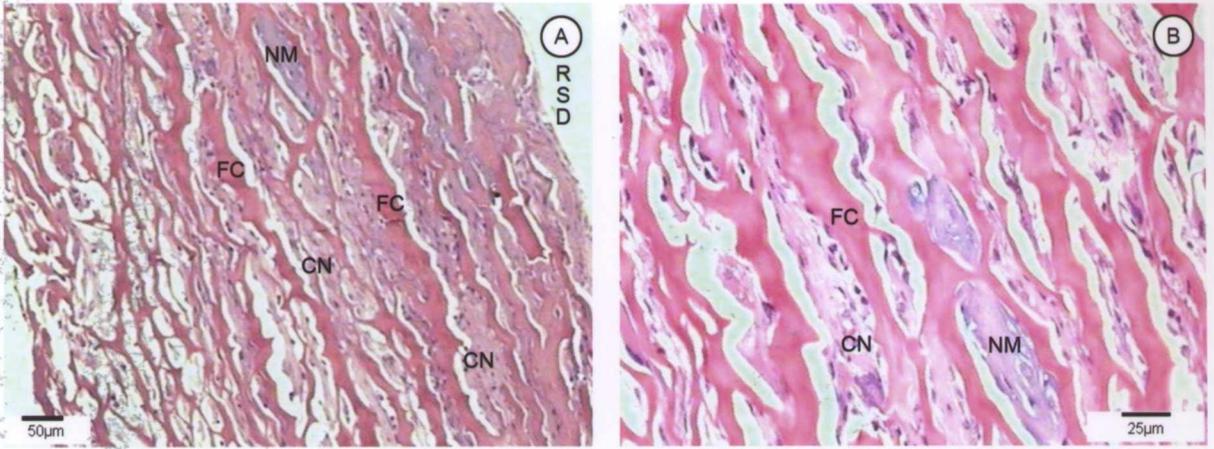


Figura 19. GI 15 D – (A) Presença de núcleos de mineralização entre fibras do biomaterial próximos à região supradural. Nota-se a presença de tecido conjuntivo neoformado entre as fibras colágenas do biomaterial, que se apresenta fragmentado na região inferior esquerda da figura. HE; parafina. Barra 50µm. **(B)** – Ampliação da fotomicrografia anterior, com destaque para os núcleos de mineralização de permeio às fibras. HE; parafina. Barra 25µm.

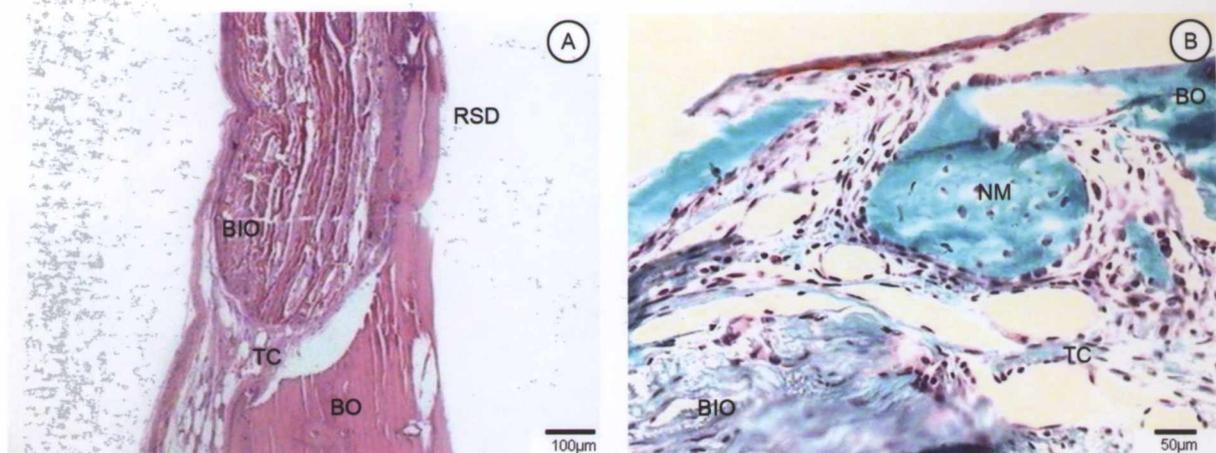


Figura 20. GII 15 D – (A) Interface de tecido conjuntivo entre o biomaterial e a borda óssea, que se apresenta com atividade regenerativa. HE; parafina. Barra 100µm. **(B)** Núcleo de mineralização formado na interface entre a borda e o biomaterial, com osteócitos, e circundado por osteoblastos e tecido conjuntivo e vasos sanguíneos. TG; resina. Barra 50µm.

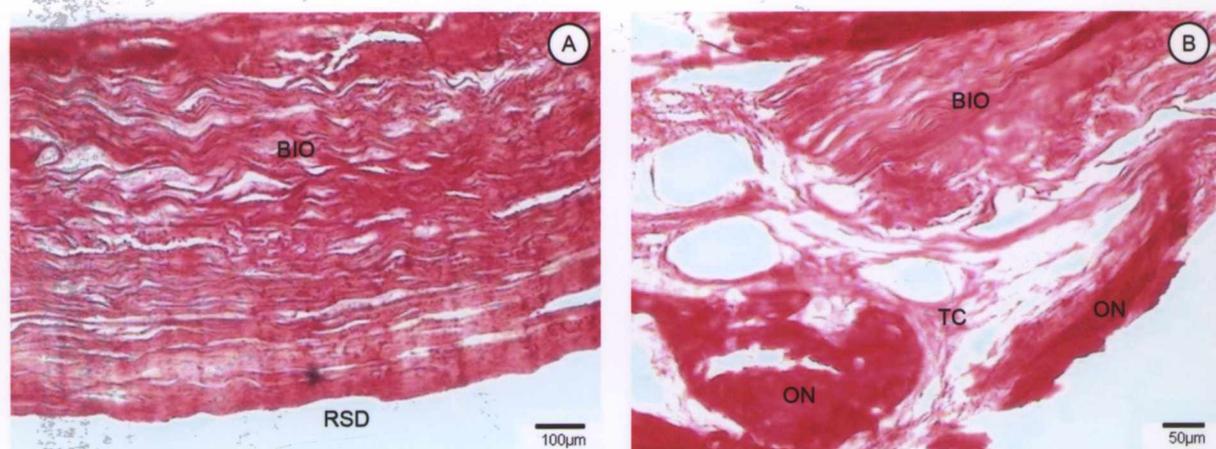


Figura 21. GII 15 D – (A) Integridade do biomaterial na região central do defeito; fibras colágenas paralelas entre si. PV; resina. Barra 100µm. **(B)** Na área de interface entre a borda óssea e o biomaterial, nota-se a presença de tecido conjuntivo, com áreas de maior densidade de deposição de colágeno em formato de núcleos. Osso novo (ON). PV; resina. Barra 50µm.

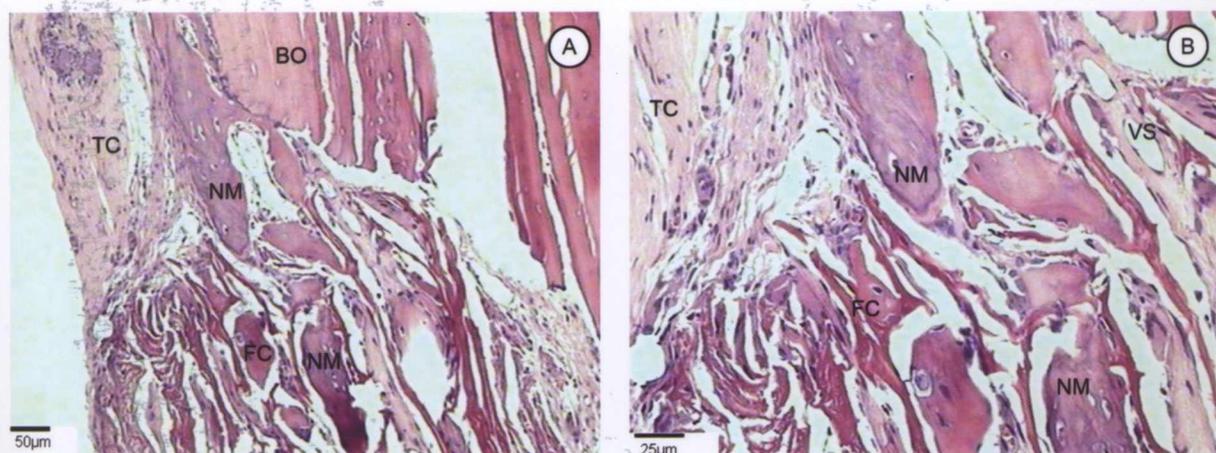


Figura 22. GII 15 D – (A) Fragmentação das fibras colagênicas do biomaterial na sua periferia; núcleos de mineralização, com osteócitos entre as fibras do biomaterial. HE; parafina. Barra 50µm. **(B)** Detalhe em maior aumento da mesma região. Notar vasos sanguíneos (VS) no canto superior direito. HE; parafina. Barra 25µm.

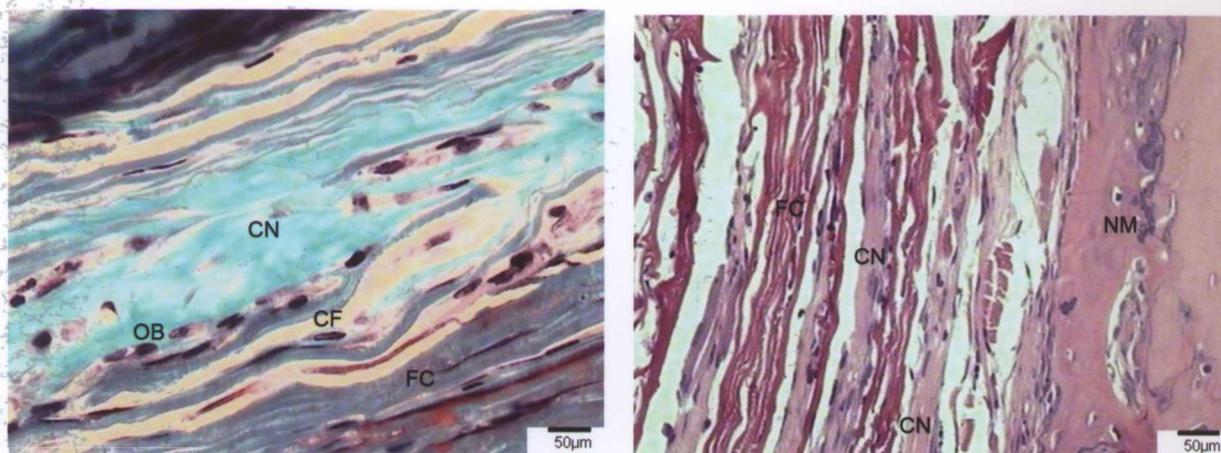


Figura 23. GII 15 D – (A) Fibras de colágeno íntegras, associadas a células fusiformes, osteoblastos e ao tecido conjuntivo neoformado. TG; resina. Barra 50µm. **(B)** Núcleo de mineralização na RSD. Nota-se a presença de vasos sanguíneos circunvizinhos ao núcleo de mineralização. HE; parafina. Barra 50µm.

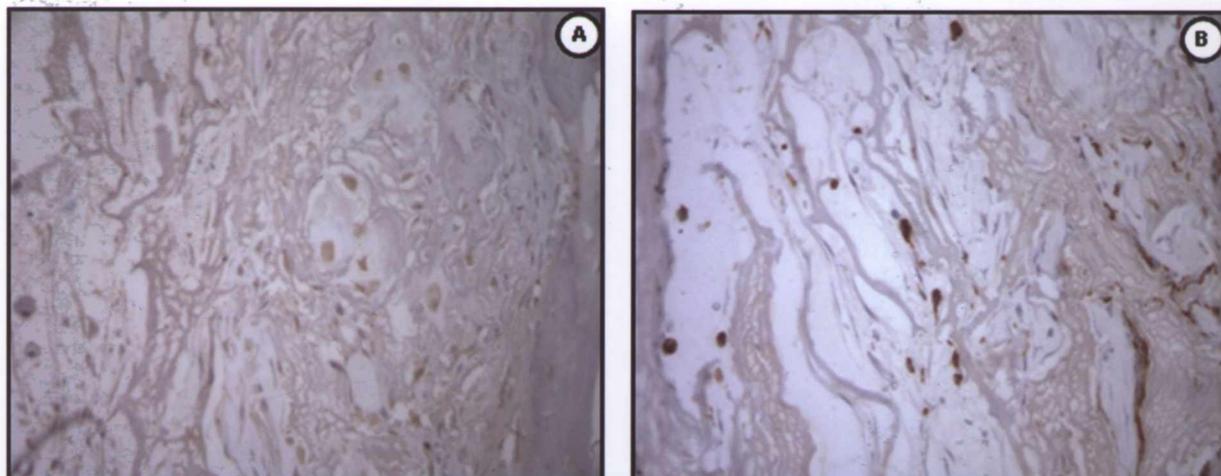


Figura 24. GII 15 D – Expressão de TGF- β em macrófagos, padrão citoplasmático, e no interstício, secretado **(A)**; e de ED-1 em macrófagos ativados **(B)**. Parafina; 40x.

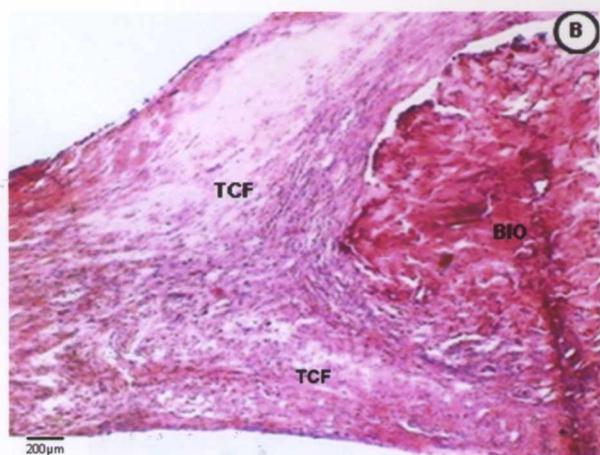
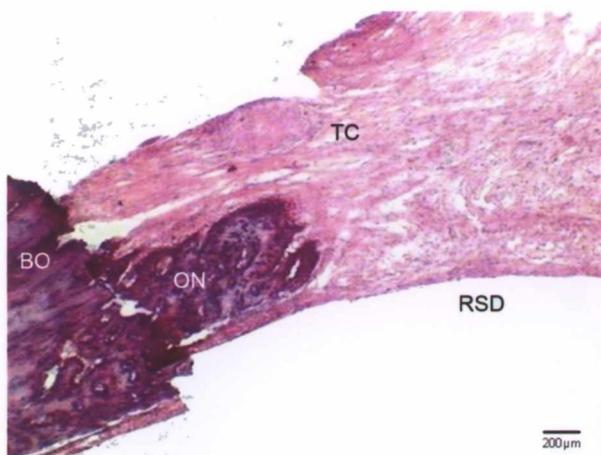


Figura 25. GIII 15 D – (A) Borda óssea com regeneração restrita à margem; tecido conjuntivo formado na interface entre a matriz colagênica e a borda do defeito. HE; resina. Barra 200µm. **(B)** Tecido conjuntivo fibroso (TCF) envolvendo o biomaterial. HE; resina. Barra 200µm.

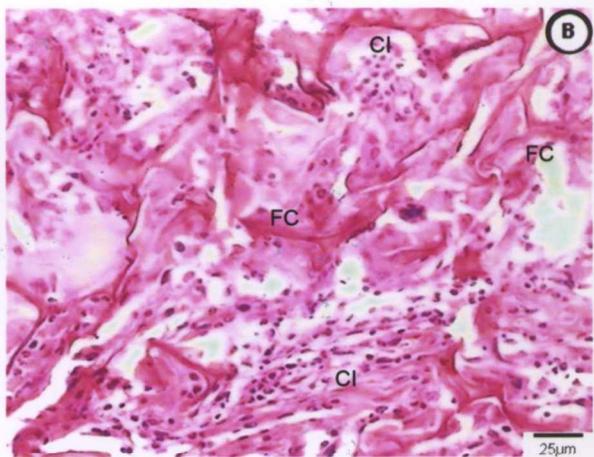
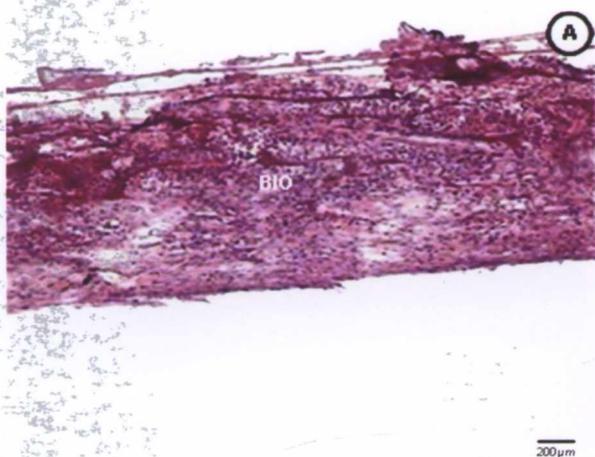


Figura 26. GIII 15 D – (A) Infiltrado inflamatório intenso em toda extensão do biomaterial. HE; resina. Barra 200µm. **(B)** Fragmentação das fibras de colágeno associada ao infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear, células inflamatórias (CI). HE; resina. Barra 25µm.

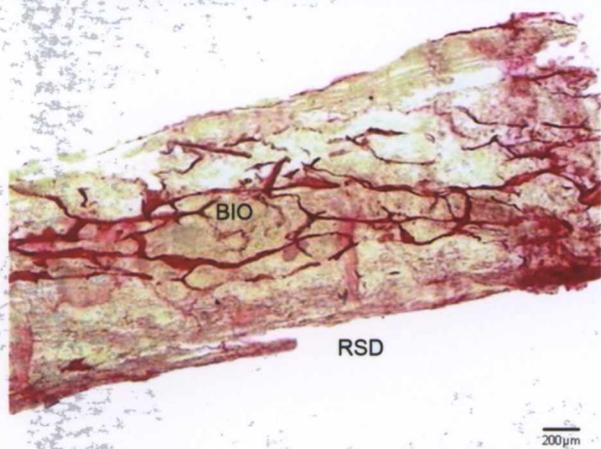


Figura 27. GIII 15 D – (A) Fragmentação da matriz colagênica neutra. PV; resina. Barra 200µm.

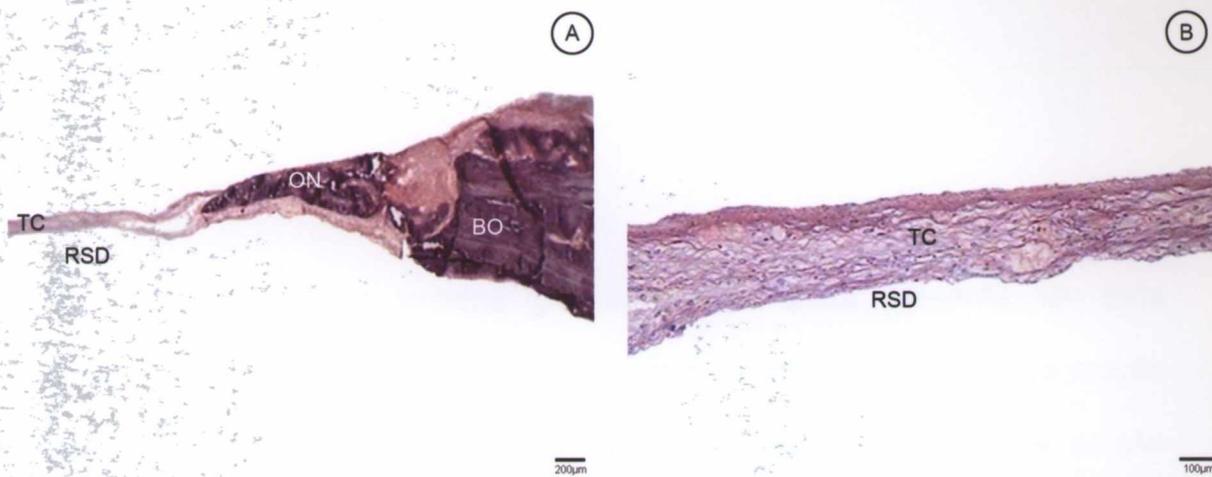


Figura 28. GIV 15 D – (A) Borda óssea associada à regeneração limitada e restrita às margens do defeito com formação de tecido conjuntivo na área residual. HE; resina. Barra 200µm. **(B)** Tecido conjuntivo frouxo formado no interstício. HE; resina. Barra 100µm.

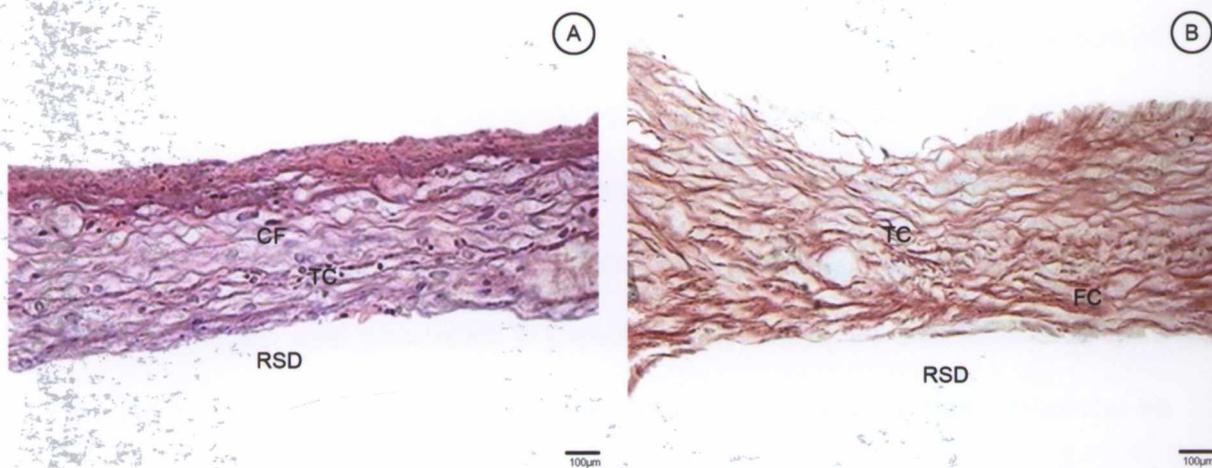


Figura 29. GIV 15 D – (A) Região central do defeito, formação de tecido conjuntivo frouxo, com células fusiformes, sem a presença de núcleos de mineralização. HE; resina. Barra 100µm. **(B)** Arranjo paralelo das fibras de colágeno presentes no tecido conjuntivo frouxo. PV; resina. Barra 100µm.

45 dias

G I – MCAGA

A inflamação crônica granulomatosa, ainda presente em toda extensão do biomaterial, foi observada de forma mais evidente na sua porção superior. Na região mais central do preenchimento do defeito e na porção superior das matrizes, as fibras colágenas mostraram-se mais fragmentadas do que aos 15 dias (Figura 35 B).

Evidenciou-se neoformação óssea regenerativa mais intensa que no ponto biológico anterior. Esta mineralização mostrou-se proeminente em quase toda a extensão do defeito, notadamente na região supradural (Figura 30). Desta, em direção à porção superior da matriz, notou-se áreas de neomineralização que permeiam e dissociam as fibras do biomaterial (Figura 32 A). No tecido neomineralizado, quando comparado aos 15 dias, observou-se zonas de aspecto basofílico mais acentuado, indicativo de mineralização mais intensa. De permeio às áreas de mineralização verificou-se proliferação vascular (Figura 36 A), edema discreto e moderado número de linfócitos. No interior das áreas mineralizadas, são vistos osteócitos, indicando vitalidade do tecido ósseo neoformado (Figura 36).

G II – MCA

A inflamação crônica granulomatosa mostrou-se escassa, vista discretamente na região superior do biomaterial (Figura 42). Nesta região a matriz colagênica foi observada com bastante degradação. Entre as fibras do biomaterial, nas áreas em que não há mineralização, notou-se abundante deposição de tecido conjuntivo fibroso, com proliferação de células fusiformes, e capilares sangüíneos. Nas extremidades do biomaterial, voltadas para as margens ósseas, houve discreta invaginação de tecido fibroso de permeio às suas fibras.

As bordas ósseas apresentaram regeneração estabilizada e mais basofílica em relação aos 15 dias, às vezes sem interface entre a matriz e a borda óssea (Figuras 37 A e 39 A). A neoformação óssea estendeu-se de maneira centrípeta e confluyente, de ambas as bordas, em direção à área central (Figuras 37 B, 38 B e 46 A), sem, no entanto, evidenciar união completa no centro do defeito. Este tecido neomineralizado formou-se sempre a partir da região supradural em direção à porção superior do biomaterial. Na maioria das vezes preencheu dois terços da espessura do biomaterial (Figura 37 B). Quando comparado aos 15 dias, mostrou-se mais extenso, espesso e denso, acompanhado de maior quantidade de material basofílico. Evidenciou-se abundante formação de canais com vasos sangüíneos, inclusive com formação de escassa medula óssea (Figura 44 e 45). Associado às áreas mineralizadas, em especial na periferia, observou-se células com aspecto morfológico de osteoblastos ativos e de osteócitos (Figura 41 A).

G III – MCN

A reação inflamatória observada, neste ponto biológico, foi do tipo crônica discreta com predomínio celular linfocitário. O biomaterial mostrou-se circundado por tecido conjuntivo fibroso, que o encapsulou, e suas fibras colagênicas apresentaram-se bastante fragmentadas e envolvidas por tecido conjuntivo fibroso (Figura 49). As bordas ósseas mostraram-se com regeneração estável e não houve mineralização na área central do defeito.

GIV – Controle

Foram identificadas poucas células inflamatórias e presença de células fusiformes, algumas com aspectos semelhantes a fibroblastos, dispostas paralelamente entre si, acompanhadas por tecido conjuntivo fibroso mais denso em relação ao período anterior e de espessura muito delgada na área de preenchimento do defeito. Notou-se ainda, a presença de vasos sanguíneos praticamente restritos às proximidades das bordas ósseas associados à discreta ossificação regenerativa nestas regiões (Figura 50 A). Não foram observados núcleos de mineralização na área central do defeito (Figura 50 B), os quais foram vistos no grupo anterior, provavelmente devido à presença de fragmentos ósseos contaminantes, residuais durante o procedimento cirúrgico.

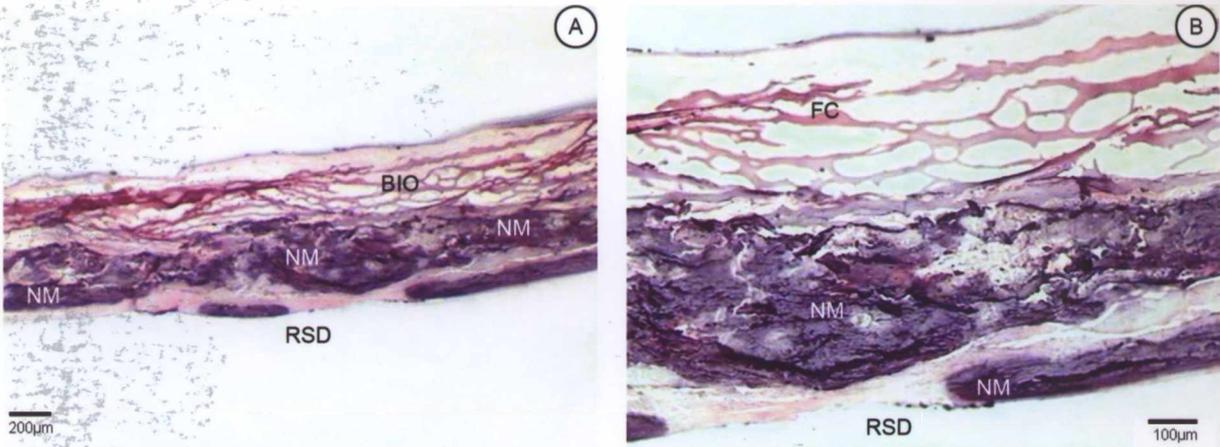


Figura 30. GI 45 D – (A) Mineralização na área central do defeito, notadamente na região supradural. HE; resina. Barra 200µm. **(B)** Detalhe em maior aumento, biomaterial pouco fragmentado. HE; resina. Barra 100µm.

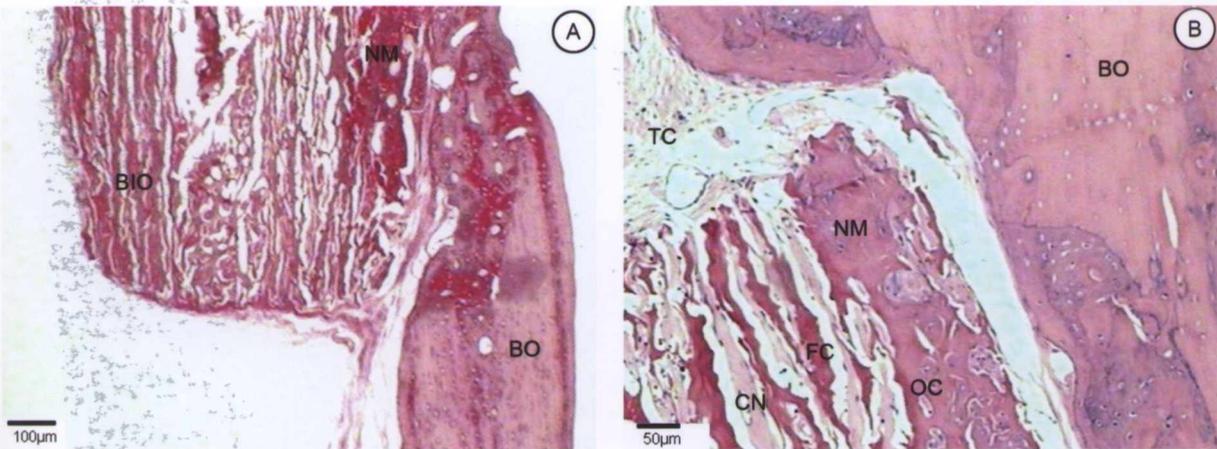


Figura 31. GI 45 D – (A) Núcleos de mineralização com deposição de colágeno no interior do biomaterial implantado, na região supradural, próxima à borda óssea. PV; parafina. Barra 100µm. **(B)** Interface de tecido conjuntivo entre a borda óssea e o biomaterial. Nota-se pequenos núcleos de mineralização, com osteócitos e tecido conjuntivo neoformado por entre as fibras do biomaterial. HE; parafina. Barra 50µm.

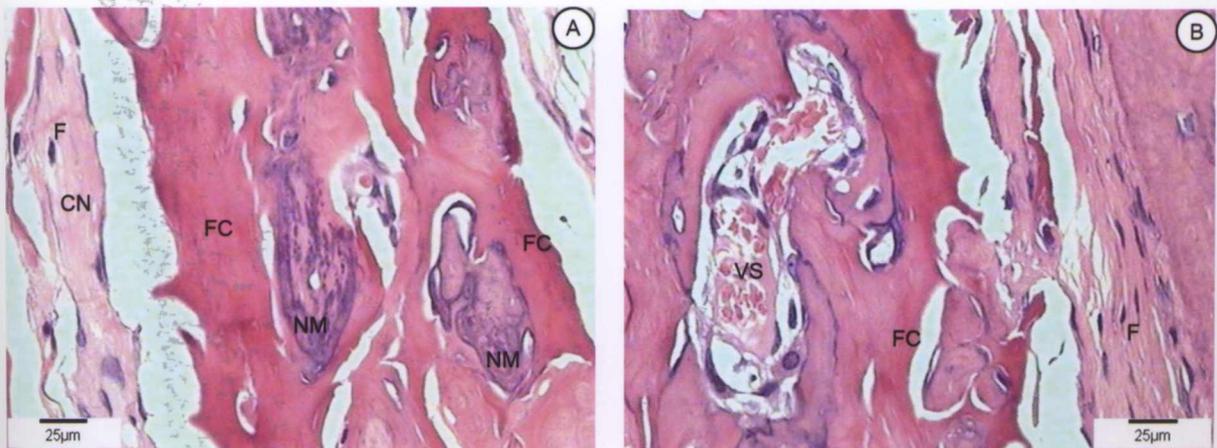


Figura 32. GI 45 D – (A) Núcleos de mineralização formados no interior das fibras de colágeno, as quais parecem integradas a estes; tecido conjuntivo neoformado, associado a fibroblastos (F). HE; parafina. Barra 25µm. **(B)** Vaso sanguíneo formado entre as fibras do biomaterial. HE; parafina. Barra 25µm.

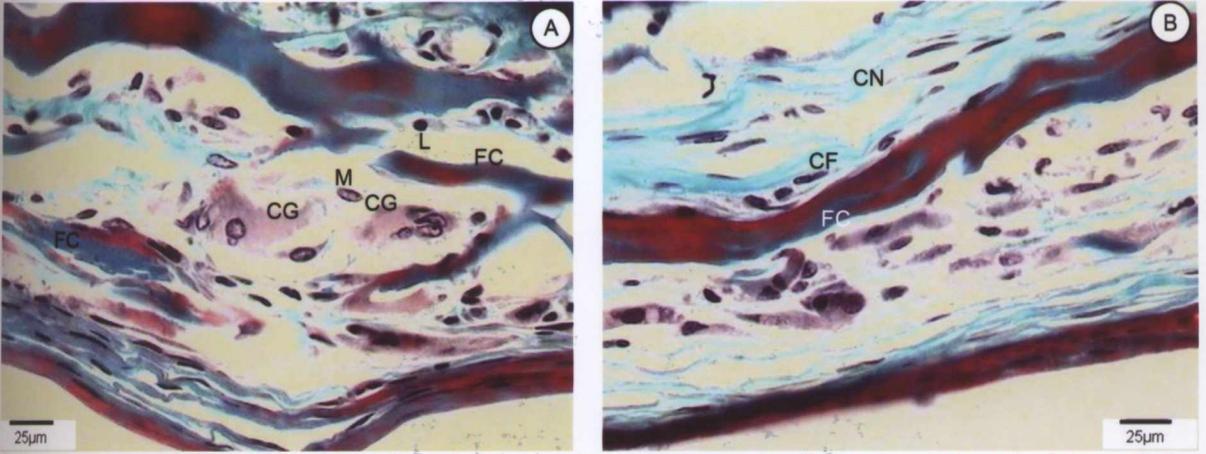


Figura 33. GI 45 D – (A) Inflamação crônica granulomatosa entre as fibras da matriz colagênica; células inflamatórias: células gigantes multinucleadas (CG), linfócitos (L) e macrófagos (M). TG; resina. Barra 25µm. **(B)** Células fusiformes sobrepostas às fibras colagênicas. TG; resina. Barra 25µm.

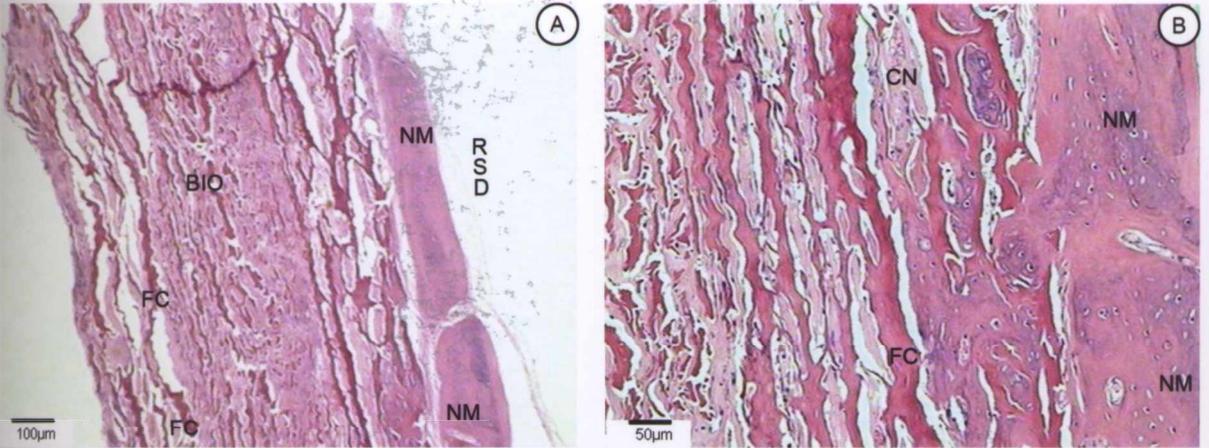


Figura 34. GI 45 D – (A) Biomaterial com fragmentação de suas fibras; núcleos de mineralização na região da dura-máter. HE; parafina. Barra 100µm. **(B)** Núcleos de mineralização exibindo grande quantidade de osteócitos (OC). Fibras colágenas íntegras próximas aos núcleos de mineralização e fragmentadas na região do retalho cutâneo. HE; parafina. Barra 50µm.

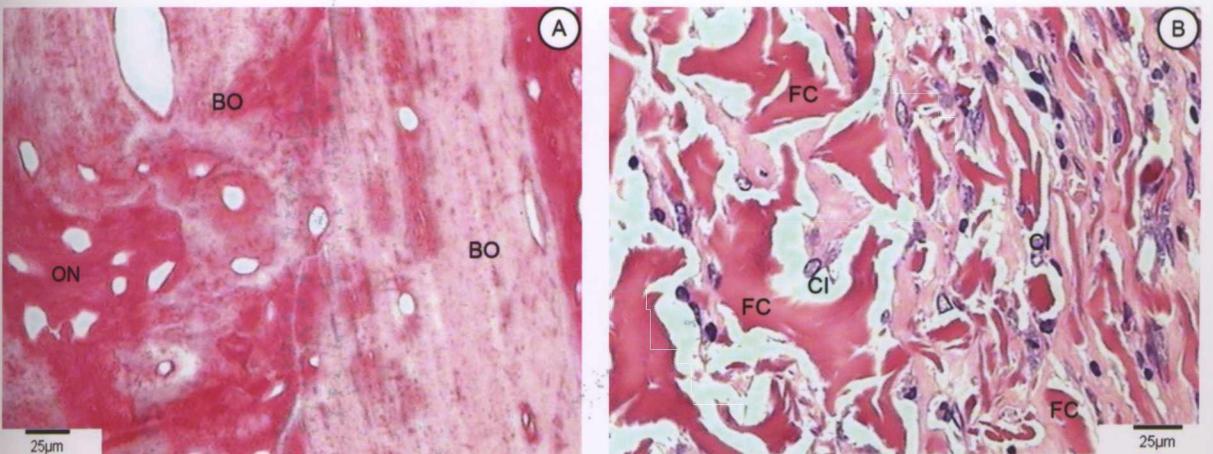


Figura 35. GI 45 D – (A) Matriz colagênica osteóide depositada na borda óssea. PV; parafina. Barra 25µm. **(B)** Fragmentação das fibras colágenas do biomaterial em área de reação inflamatória crônica com células mononucleares (CI). HE; parafina. Barra 25µm.

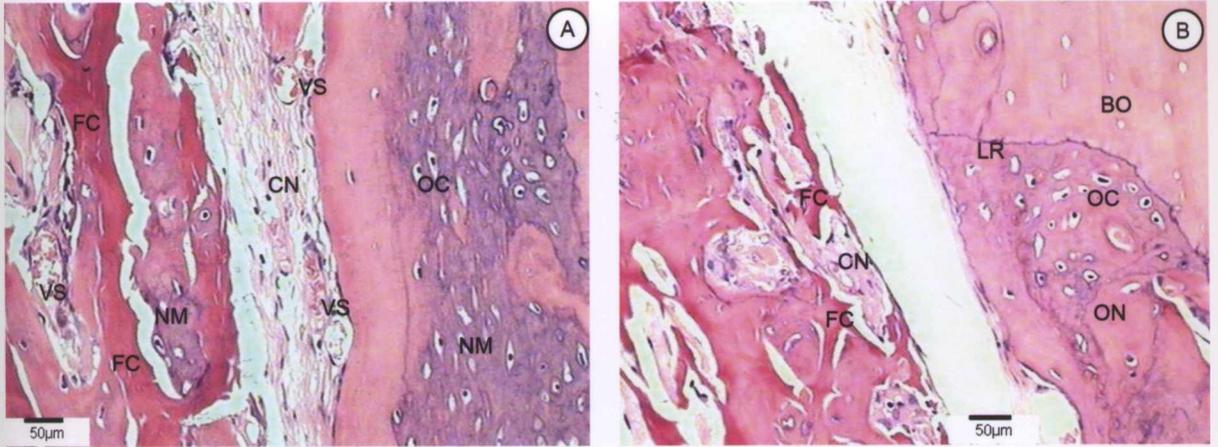


Figura 36. GI 45 D – (A) Núcleos de mineralização evidentes, com grande quantidade de osteócitos, e associados à formação vascular. HE; parafina. Barra 50µm. **(B)** Osso neoformado em associação à borda com linhas de reversão (LR), e mineralização confluyente sobre as fibras de colágeno do biomaterial, com osteócitos. HE; parafina. Barra 50µm.

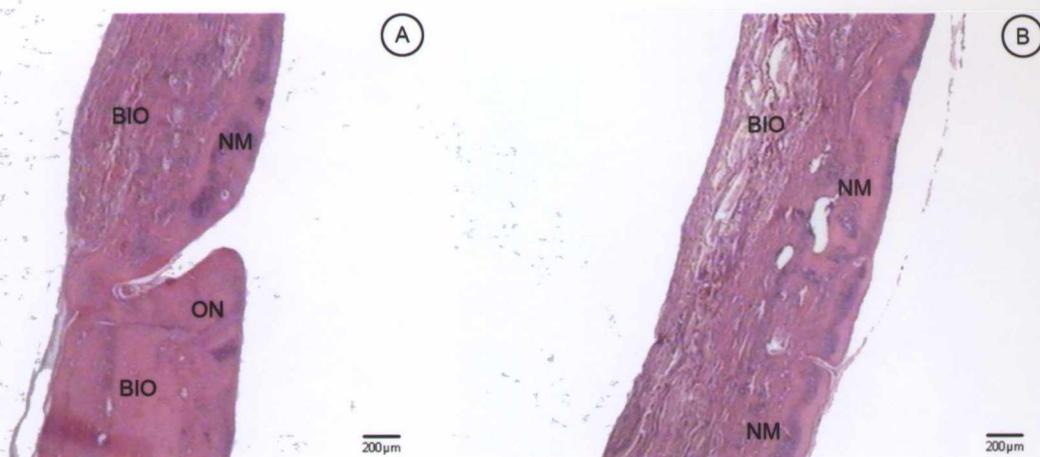


Figura 37. GII 45 D – (A) Borda óssea com formação óssea que se estende sobre as fibras do biomaterial; núcleos de mineralização na região supradural. HE; parafina. Barra 200µm. **(B)** Região central do defeito com área de mineralização que ocupam quase a metade da espessura do biomaterial. HE; parafina. Barra 200µm.

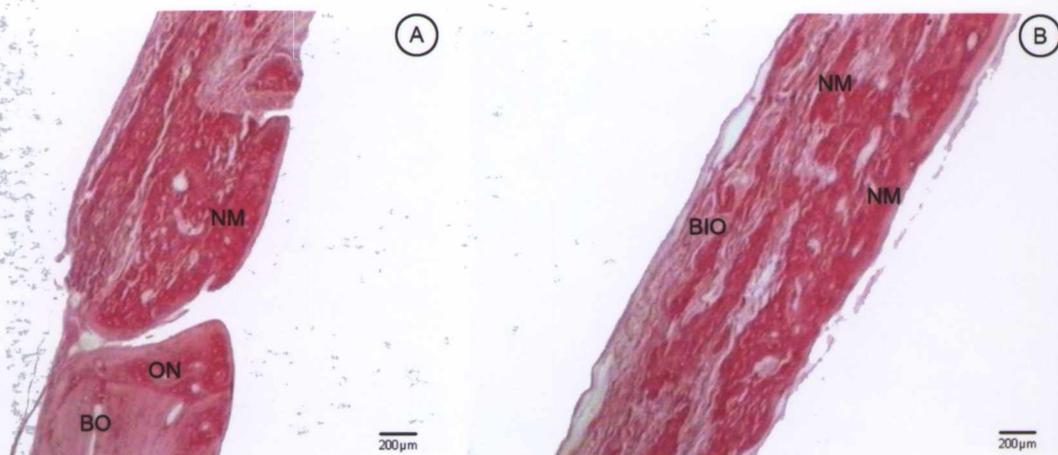


Figura 38. GII 45 D – (A) Grande deposição de matriz osteóide colagênica, na região da borda óssea e **(B)** por entre as fibras do biomaterial. PV; parafina. Barra 200µm.

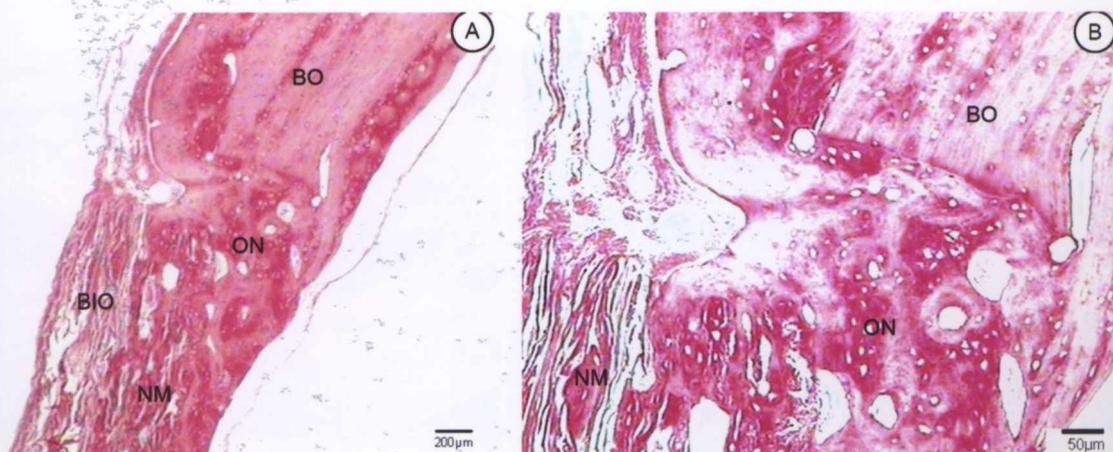


Figura 39. GII 45 D – (A) Mineralização da interface de tecido conjuntivo observado entre a borda óssea e o biomaterial. PV; parafina. Barra 200µm. **(B)** Detalhe da figura "A" com destaque para a deposição de matriz osteóide colagênica. PV; parafina. Barra 50µm.

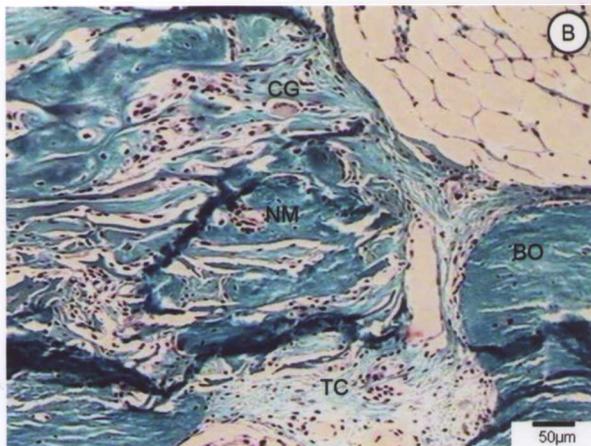
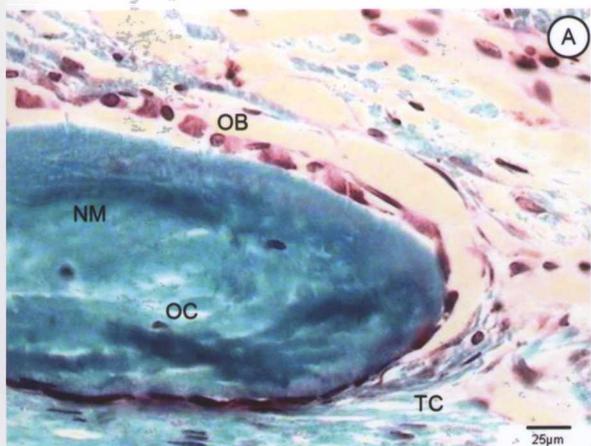


Figura 40. GII 45 D – (A) Núcleo de mineralização circundado por osteoblastos e mais distante por tecido conjuntivo. No centro do núcleo de mineralização nota-se a presença de osteócitos. TG; resina. Barra 25µm. **(B)** Tecido conjuntivo entre o biomaterial e a borda óssea. Nota-se uma célula gigante multinucleada sobre o núcleo de mineralização. TG; resina. Barra 50µm.

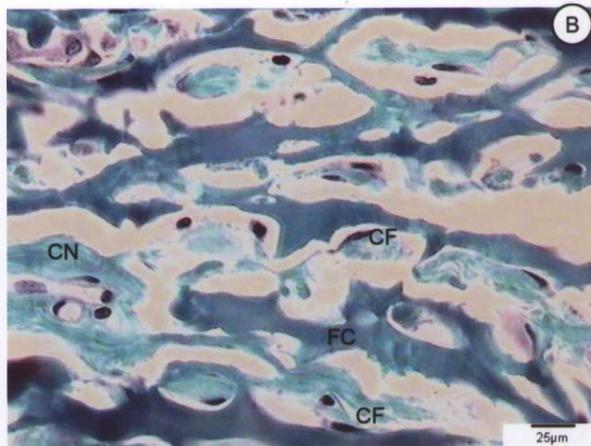
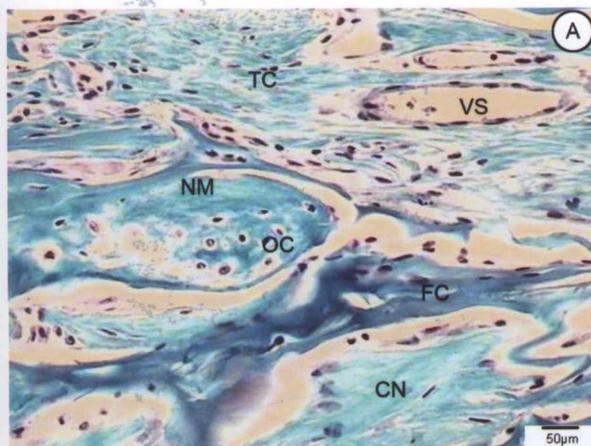


Figura 41. GII 45 D – (A) Núcleo de mineralização com osteócitos, formado entre as fibras do biomaterial; vaso sanguíneo no tecido conjuntivo. TG; resina. Barra 50µm. **(B)** Fibras do biomaterial associadas às células fusiformes e ao tecido conjuntivo neoformado de permeio às suas fibras. TG; resina. Barra 25µm.

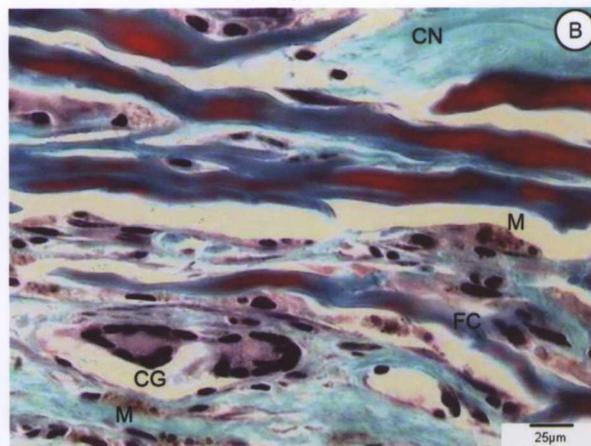
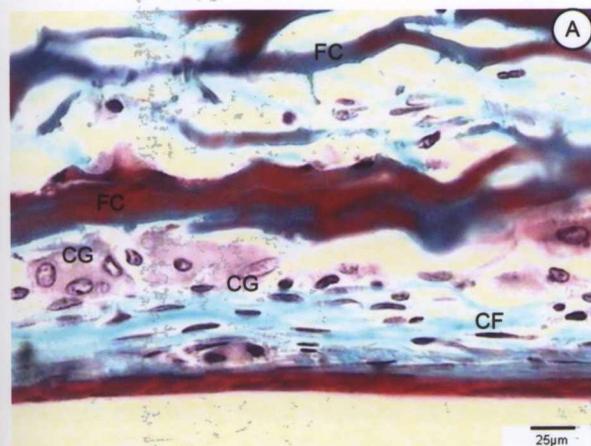


Figura 42. GII 45 D – (A) Células inflamatórias entre as fibras do biomaterial, acompanhadas por algumas células fusiformes. TG; resina. Barra 25µm. **(B)** Área de inflamação; macrófagos contendo pigmento castanho-amarronzado (M), indicativos de hemossiderina. TG; resina. Barra 25µm.

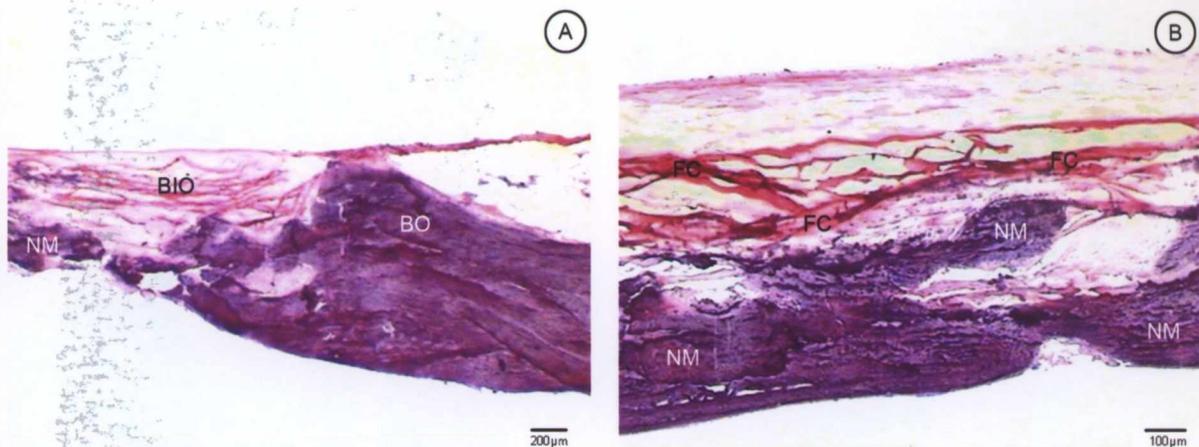


Figura 43. GII 45 D – (A) Nota-se a borda óssea com regeneração discreta na região supraperiosteal; biomaterial implantado sem interface entre este e a margem. HE; resina. Barra 200µm. **(B)** Mineralização na área central do defeito integrando-se ao biomaterial. HE; resina. Barra 100µm.

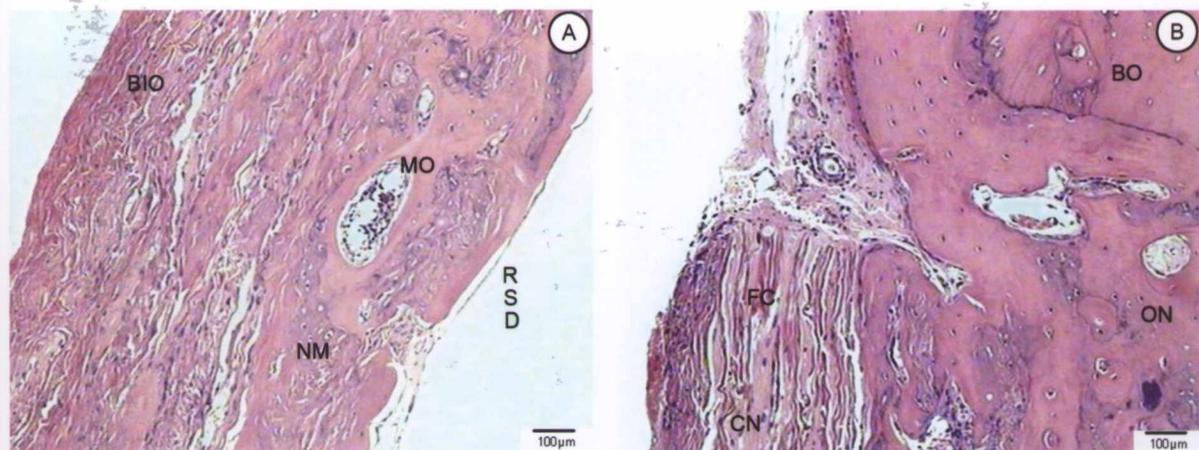


Figura 44. GII 45 D – (A) Observa-se, na região central do defeito, formação de medula óssea (MO) incipiente, circundada por áreas mineralizadas. HE; parafina. Barra 100µm. **(B)** Neoformação óssea entre a borda e o biomaterial, integrando o biomaterial à margem do defeito. HE; parafina. Barra 50µm.

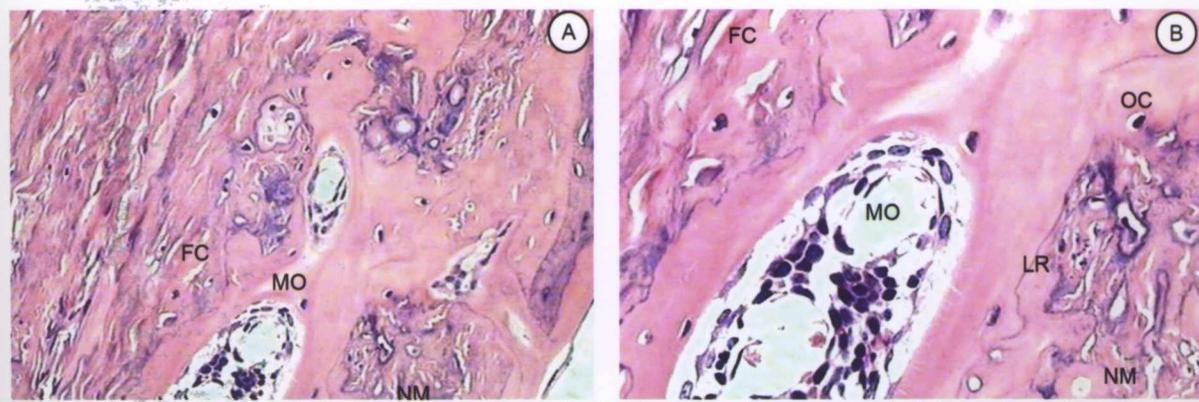


Figura 45. GII 45 D – (A) Deposição abundante de tecido ósseo, já com características de maturação, com formação de medula óssea incipiente, na área central do defeito. HE; parafina. Barra 50µm. **(B)** Detalhe em maior aumento da imagem anterior, evidenciando a medula, os osteócitos e as linhas de reversão. HE; parafina. Barra 25µm.

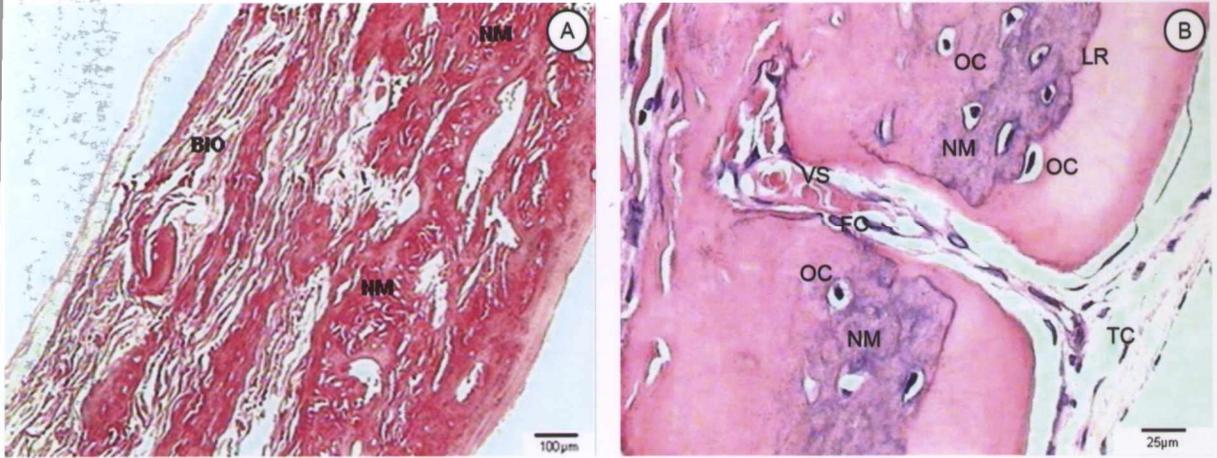


Figura 46. GII 45 D – (A) Núcleos de mineralização na área central do biomaterial, com deposição de grande quantidade de colágeno, ocupando quase toda sua espessura. PV; parafina. Barra 100 μ m. **(B)** Formação de tecido conjuntivo, na área central do defeito, por entre dois núcleos de mineralização, mimetizando a sutura sagital; presença de osteócitos e linhas de reversão. HE; parafina. Barra 25 μ m.

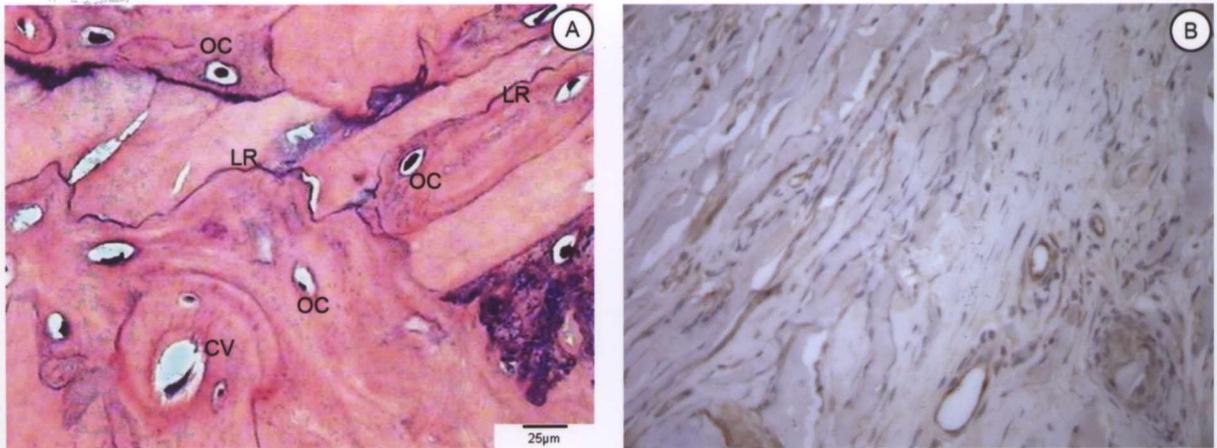


Figura 47. GII 45 D – (A) Organização do tecido ósseo neoformado em camadas, com linhas de reversão, osteócitos e canal vascular (CV). HE; parafina. Barra 25 μ m. **(B)** Expressão de fator VIII no endotélio vascular e secretado para o interstício. Parafina; 40x.

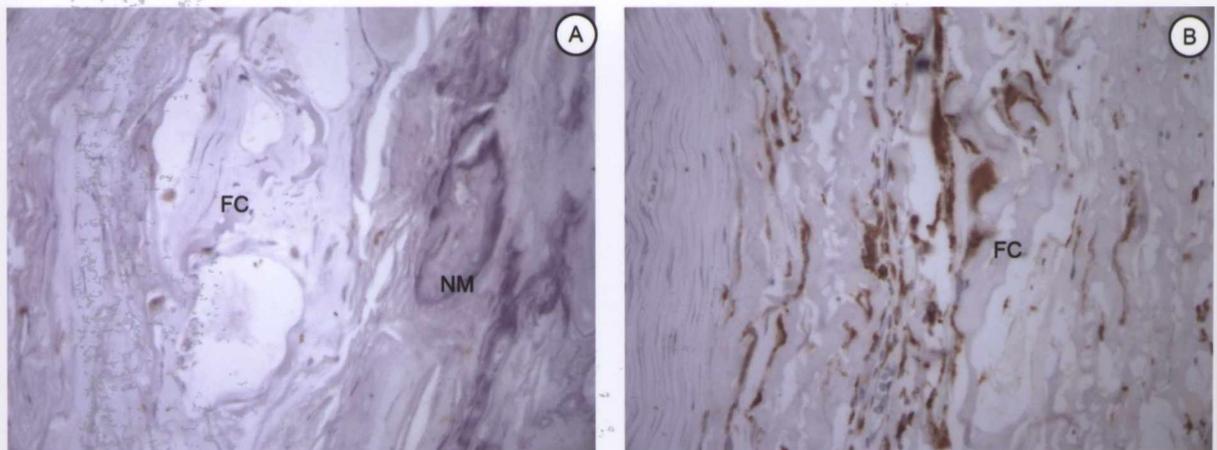


Figura 48. GII 45 D – (A) Expressão de TGF- β em macrófagos circunvizinhos ao núcleo de mineralização. Parafina; 40x. **(B)** Ativação macrófágica evidenciada pelo ED-1. Parafina; 40x.

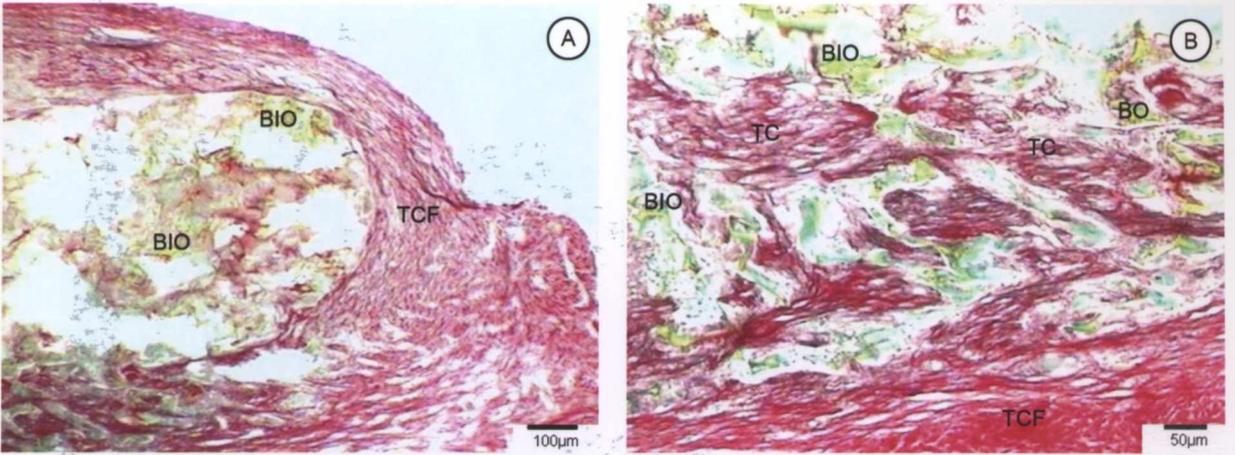


Figura 49. GIII 45 D – (A) Tecido conjuntivo fibroso encapsulando a matriz colagênica neutra. PV; resina. Barra 100µm. **(B)** Biomaterial (em amarelo), bastante fragmentado com formação de tecido conjuntivo circundando seus fragmentos. PV; resina. Barra 50µm.

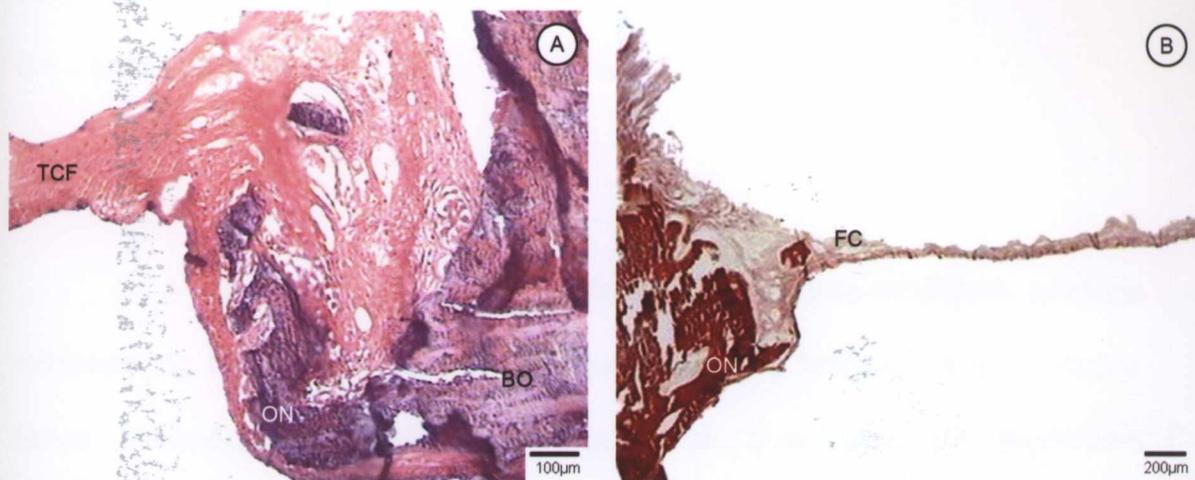


Figura 50. GIV 45 D – (A) Regeneração limitada e restrita à borda com formação de tecido conjuntivo fibroso bastante delgado na área remanescente. HE; resina. Barra 100µm. **(B)** Evidenciação com picrosíríus-vermelho do tecido conjuntivo delgado observado na fotomicrografia da figura "A". PV; resina. Barra 200µm.

90 dias**GI – MCAGA**

A inflamação crônica granulomatosa mostrou-se moderada em toda extensão do biomaterial, com grande quantidade de linfócitos e macrófagos. Estes últimos foram vistos com abundante quantidade de pigmentos citoplasmáticos de coloração castanho-amarronzado, sugestivo de hemossiderina. O edema observado de permeio às fibras do biomaterial, no ponto biológico anterior, mostrou-se reduzido. O biomaterial apresentou fragmentação avançada.

A neomineralização iniciada nas bordas ósseas foi observada ativa em direção centrípeta por entre as fibras do biomaterial (Figura 51), com aspecto reticular, envolvendo aproximadamente dois terços da espessura total da matriz. Essa mineralização mostrou-se com confluência quase completa entre as bordas do defeito, exceto na área central, na região da sutura sagital.

Adicionalmente, em áreas focais, em especial no centro do defeito, notou-se áreas de mineralização entre as fibras do biomaterial na região próxima ao retalho tegumentar, com células semelhantes a osteoblastos ativos. Nas áreas onde não houve neomineralização, evidenciou-se proliferação de fibroblastos e deposição de matriz colagênica, dissociando as fibras colágenas do biomaterial (Figura 52 B). Evidenciou-se ainda, a presença de capilares em toda a área seccional do defeito.

G II – MCA

A reação crônica granulomatosa, circunjacente às fibras do biomaterial, mostrou-se escassa evidenciando sua regressão e foi observada principalmente na porção superior da matriz, voltada para o retalho tegumentar. As fibras colagênicas, apresentaram aspecto residual.

As bordas ósseas apresentaram atividade regenerativa estável. A neomimetalização na região do defeito se faz praticamente em toda sua extensão e em dois terços da espessura do biomaterial, muitas vezes em forma de grandes núcleos, que se conectavam entre si (Figura 53). Circunvizinho a estes, evidenciaram-se células semelhantes a osteoblastos (Figura 55). Nas áreas de neomineralização mais espessa foram vistos canais de vascularização e formação de medula óssea incipiente. No interstício entre os núcleos de mineralização foi notada abundante vascularização (Figura 56).

GIV – Controle

Neste período, notou-se ausência de células inflamatórias e quantidade moderada de vasos sangüíneos, mais acentuada nas proximidades das bordas ósseas. Os fibroblastos permaneceram organizados paralelamente entre si associados ao tecido conjuntivo fibroso de aspecto denso, em toda a área seccional do defeito (Figura 58 B). A regeneração óssea foi evidenciada, escassa e apenas restrita às margens ósseas, de forma semelhante aos pontos biológicos anteriores (Figura 58 A).

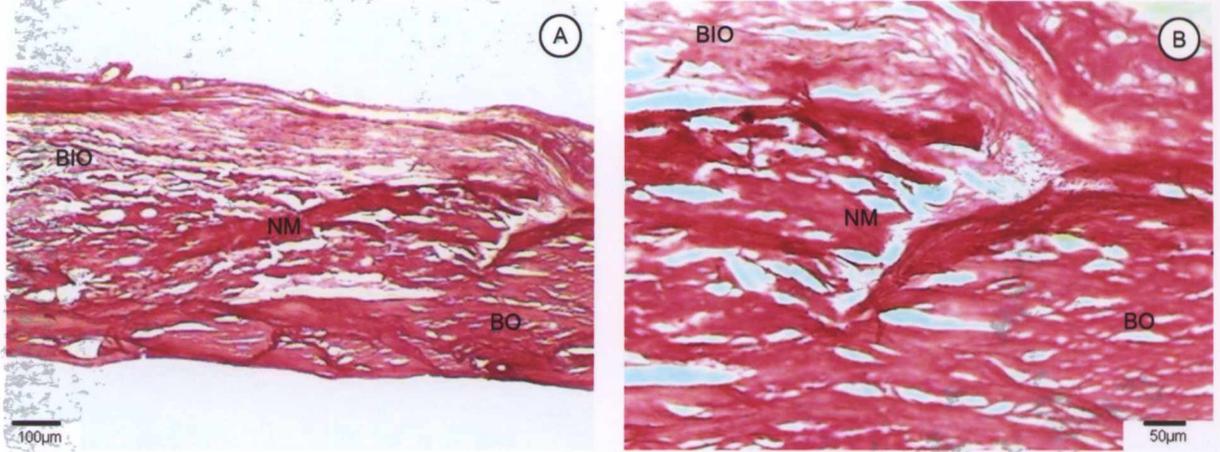


Figura 51. GI 90 D – (A) Biomaterial integrando-se à borda óssea. PV; resina. Barra 100µm. **(B)** Detalhe em maior aumento da fotomicrografia observada em "A". Nota-se, na periferia do material, núcleos de mineralização com maior deposição de colágeno. PV; resina. Barra 50µm.

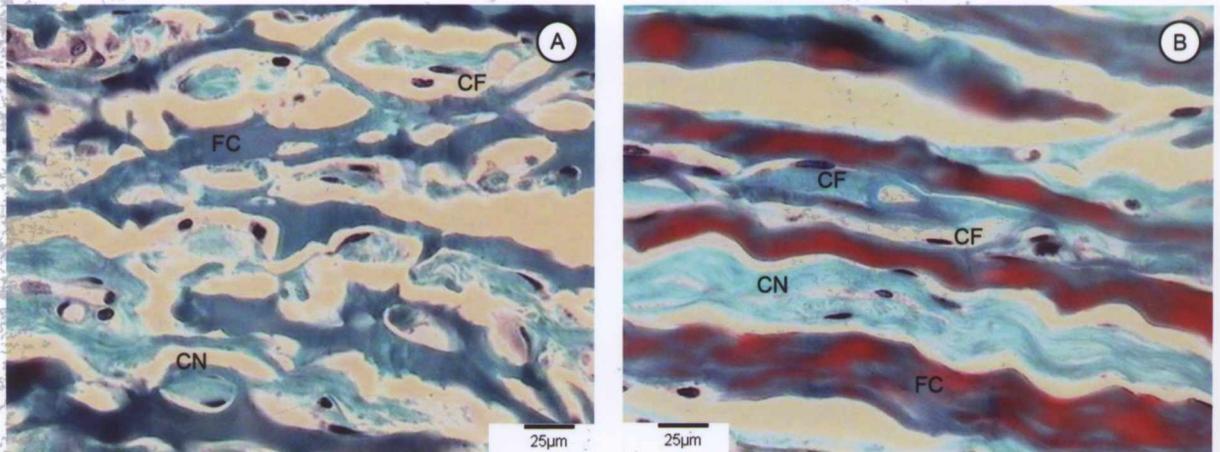


Figura 52. GI 90 D – (A) Biomaterial pouco fragmentado na região central do defeito, na porção superior próxima ao retalho. TG; resina. Barra 25µm. **(B)** Biomaterial íntegro, com células fusiformes aderidas à sua estrutura; tecido conjuntivo neoformado de permeio às fibras do biomaterial. TG; resina. Barra 25µm.

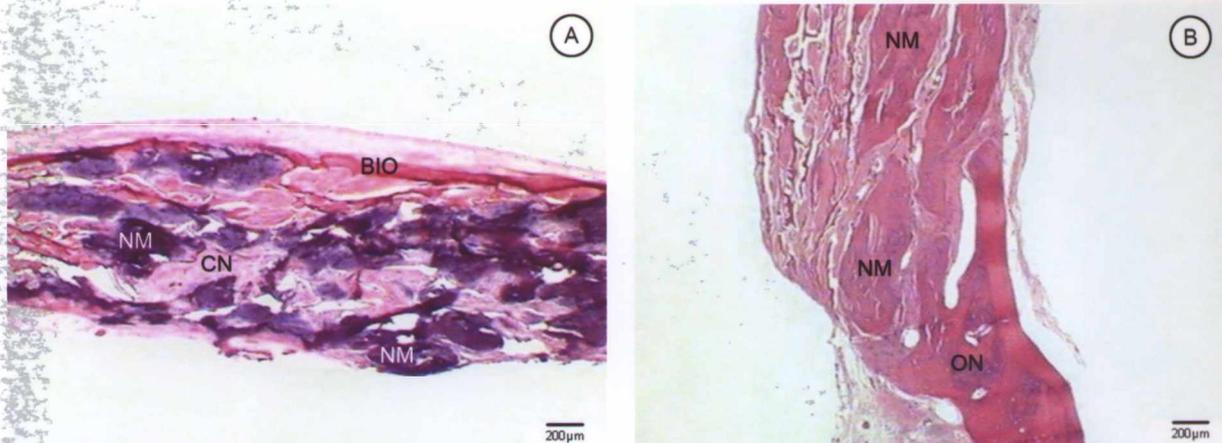


Figura 53. GII 90 D – (A) Mineralização em quase toda a espessura do biomaterial. HE; resina. Barra 200µm. **(B)** Núcleo de mineralização presente no biomaterial integrando-se com o osso novo presente na borda óssea. HE; parafina. Barra 200µm.

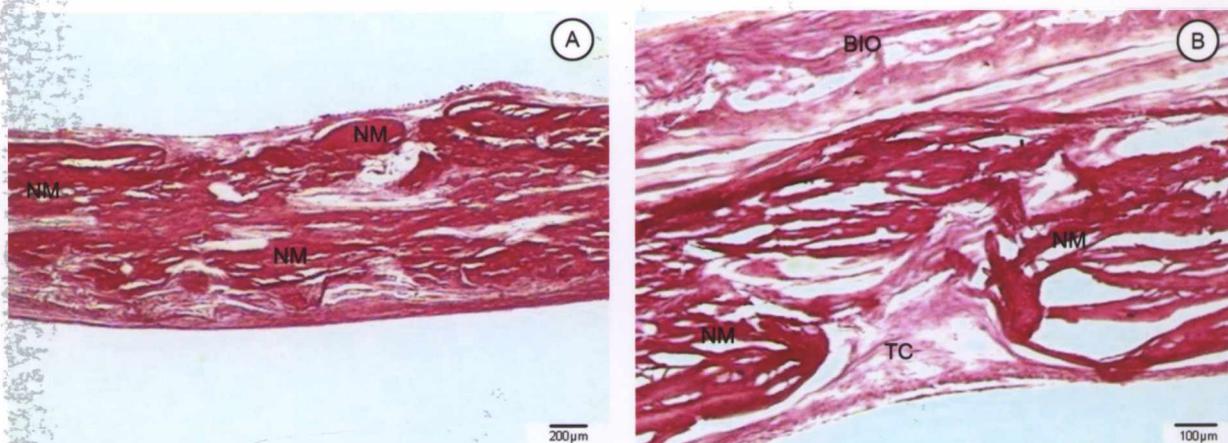


Figura 54. GII 90 D – (A) Núcleos de mineralização, com maior densidade de colágeno, presentes em toda a extensão e espessura do biomaterial. PV; resina. Barra 200µm. **(B)** Nota-se a invaginação do tecido conjuntivo na região central do defeito, de forma semelhante àquela encontrada na sutura sagital. PV; resina. Barra 100µm.

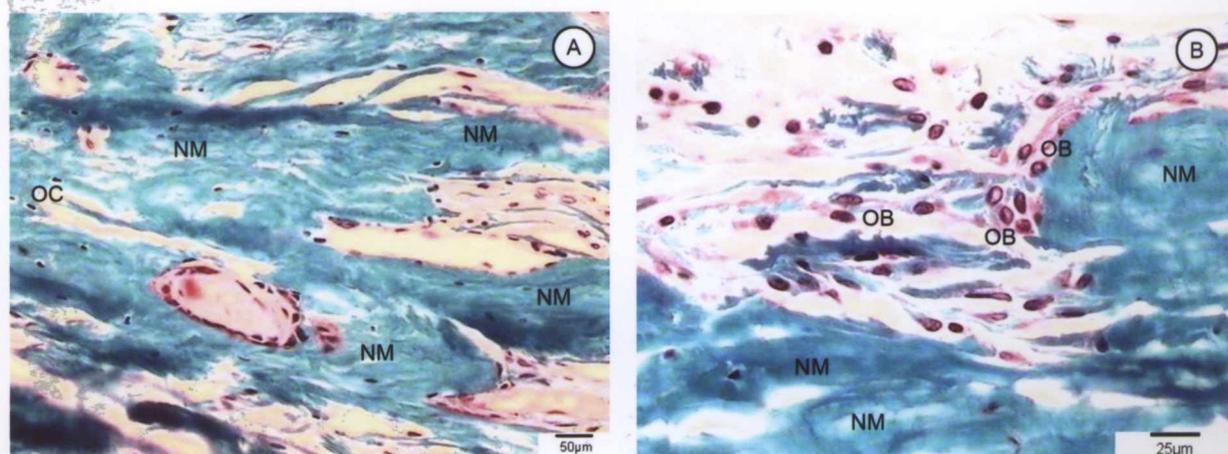


Figura 55. GII 90 D – (A) Áreas de confluência do tecido neomineralizado com osteoblasto na sua superfície. TG; resina. Barra 50µm. **(B)** Osteoblastos circunjacente ao núcleo de mineralização. TG; resina. Barra 25µm.

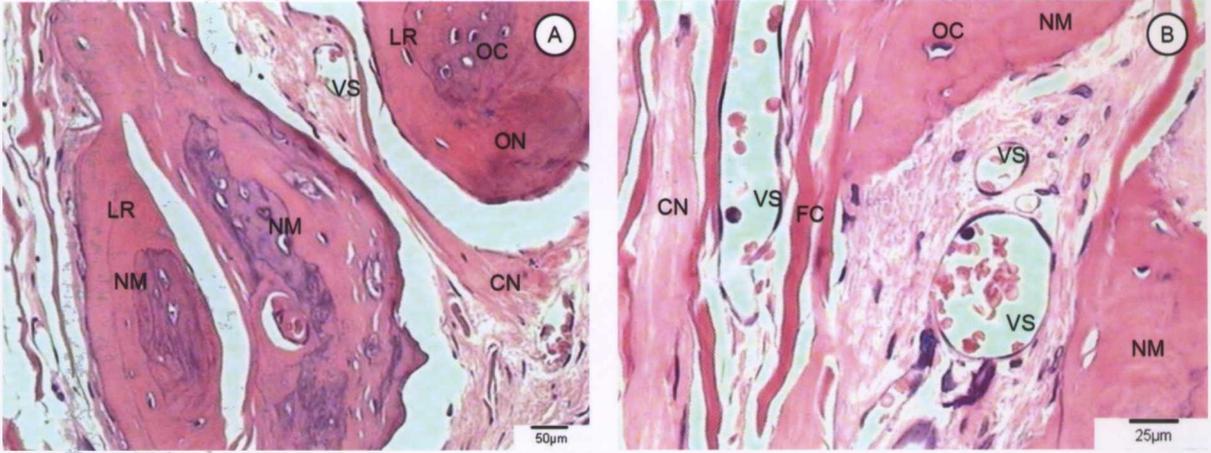


Figura 56. GII 90 D – (A) Neoformação tecidual óssea na região de interface entre a borda óssea e o biomaterial. Nota-se linhas de reversão tanto no osso já organizado quanto na área imatura. HE; parafina. Barra 50µm. **(B)** Neoformação vascular de permeio às fibras do biomaterial e aos núcleos de mineralização. HE; parafina. Barra 25µm.

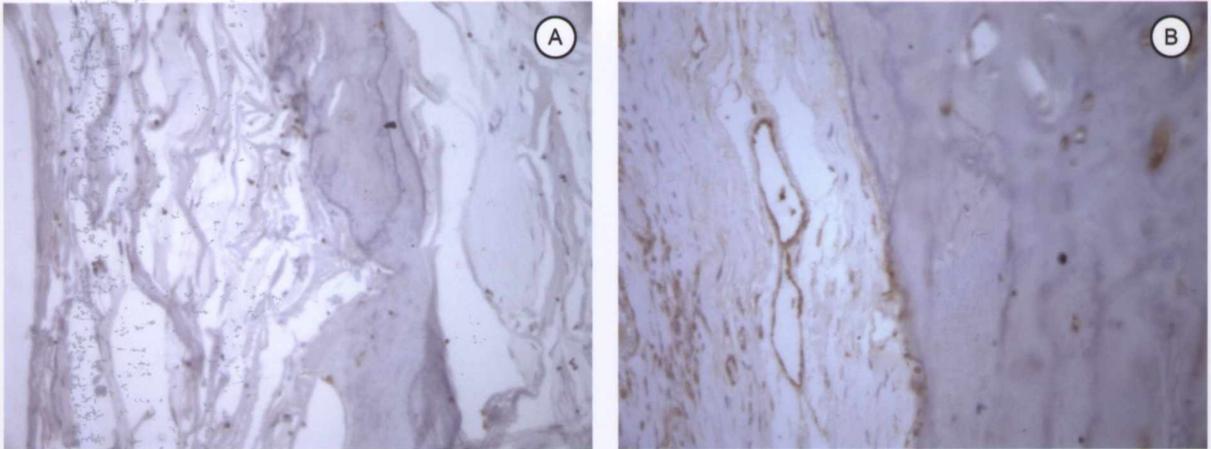


Figura 57. GII 90 D – (A) Escassa marcação positiva para TGF- β em macrófagos ativados. Parafina; 40x. **(B)** Identificação de fator VIII em uma área circunvizinha a um núcleo de mineralização, evidenciando a estreita correlação entre a angiogênese e a neoformação óssea. Parafina; 40x.

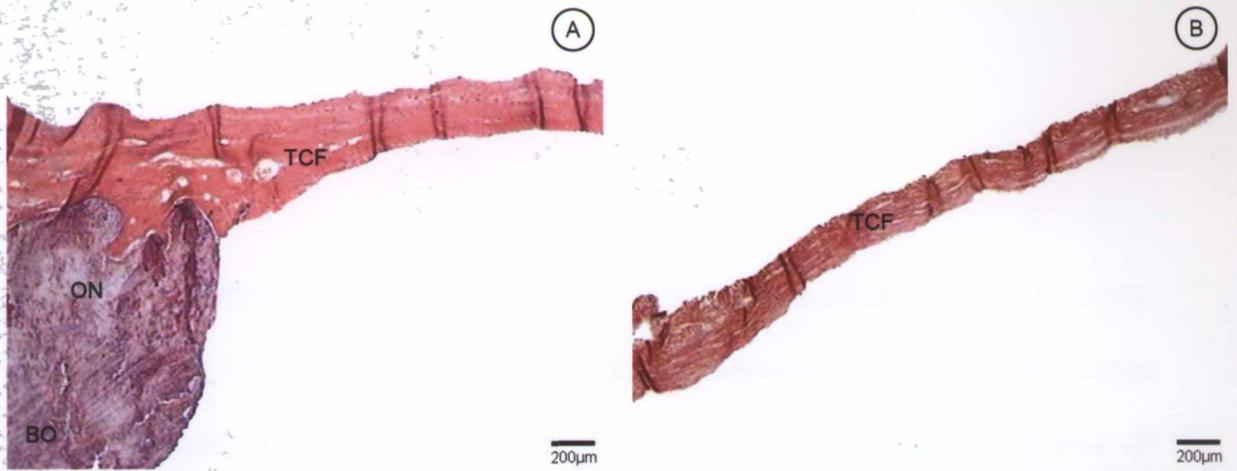


Figura 58. GIV 90 D – (A) Regeneração óssea limitada e estável na borda óssea do defeito. HE; resina. Barra 200µm. **(B)** Formação de tecido conjuntivo fibroso mais adensado e delgado, na área remanescente do defeito. PV; resina. Barra 200µm.

120 dias

GI – MCAGA

O infiltrado inflamatório mononuclear foi visto difuso e muito discreto, em especial nas áreas periféricas do biomaterial onde a inflamação granulomatosa mostrou-se mais evidente (Figura 61 A). Na região abaixo do retalho tegumentar, observaram-se muitos macrófagos com acúmulos citoplasmáticos, de cor marrom-acastanhado, indicativo de hemossiderina (Figura 64 A).

Na interface entre as margens do defeito e a matriz tridimensional, às vezes, foi notada a presença de tecido conjuntivo fibroso com proliferação de células fusiformes, acompanhado de abundante quantidade de capilares sanguíneos (Figura 63 A). Este tecido conjuntivo dissociou as fibras do biomaterial, quando visto de permeio à sua estrutura.

A neomineralização foi observada em toda extensão e espessura do biomaterial, com aspecto ainda reticular, mostrando integração das fibras do biomaterial com a deposição mineral (Figuras 59 e 62). Este último achado foi mais conspícuo na região supradural (Figura 60 A). Foi observado, no tecido mineralizado, áreas mais basofílicas nas regiões mais espessas, com formação medular.

G II – MCA

O infiltrado inflamatório mononuclear observado foi muito discreto e apenas nas regiões próximas ao retalho tegumentar, onde as fibras residuais do biomaterial foram encontradas bastante fragmentadas. As bordas ósseas regenerativas foram observadas estabilizadas, ou seja, sem regeneração.

A neomineralização foi evidenciada ocupando toda a extensão do defeito e quatro quintos da espessura do biomaterial (Figura 65). Este tecido neomineralizado é difuso, com canais, vasos sangüíneos, medula óssea incipiente e formação de lamelas, às vezes, organizadas e outras, ainda, desorganizadas (Figura 68). O tecido conjuntivo presente entre o biomaterial e a borda óssea mostrou-se mineralizado, integrando a matriz colagênica ao osso pré-existente (Figuras 65 B, 66, 71 e 72 B).

G III – MCN

A inflamação observada nos pontos biológicos anteriores mostrou-se bem diminuída. O biomaterial apresentou-se fragmentado, de aspecto residual, circundado por fibrose pouco espessa, com moderada quantidade de células fusiformes (Figura 75). As bordas ósseas se apresentaram estáveis, sem neoformação óssea. Não foi observado áreas de mineralização associadas ao biomaterial.

GIV – CONTROLE

A neoformação óssea permaneceu restrita às bordas ósseas do defeito e a área remanescente foi observada preenchida por tecido conjuntivo de aspecto denso, com redução da espessura da área reparadora, permeado por fibroblastos alinhados paralelamente entre si. Notou-se discretos vasos sangüíneos. Não foi observado núcleos de mineralização na área central do defeito (Figura 76). Nesta, os vasos sangüíneos mostraram-se muito discretos.

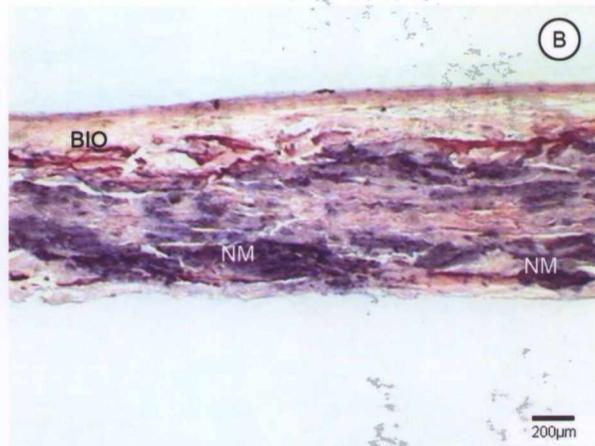
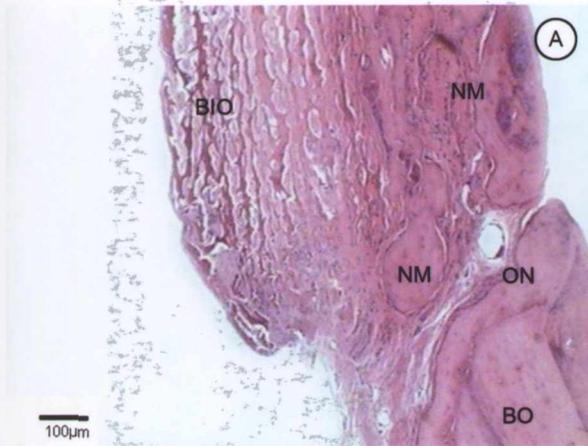


Figura 59. GI 120 D – (A) Biomaterial integrando-se ao osso novo formado na borda óssea. HE; parafina. Barra 100µm. **(B)** Mineralização em toda a extensão do biomaterial, ocupando quase toda a sua espessura. HE; resina. Barra 200µm.

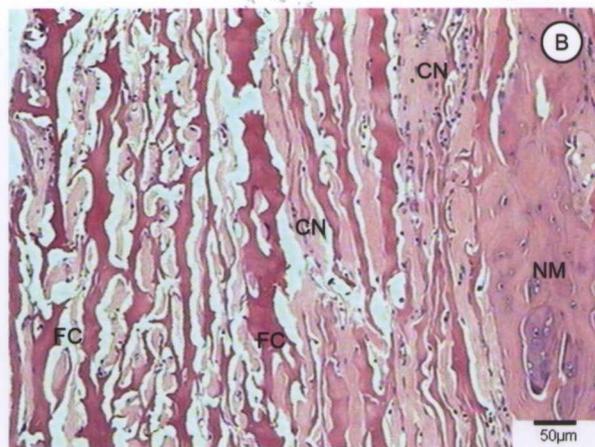
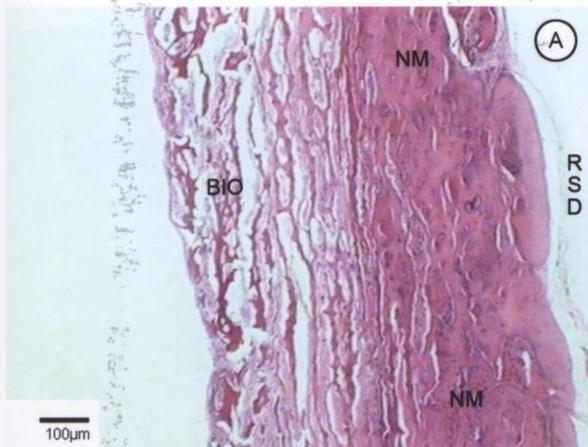


Figura 60. GI 120 D – (A) Grande área de mineralização centripeta, na região central do defeito. HE; parafina. Barra 100µm. **(B)** Observa-se o tecido conjuntivo neoformado de permeio às fibras do biomaterial; biomaterial pouco fragmentado na sua porção superior. HE; parafina. Barra 50µm.

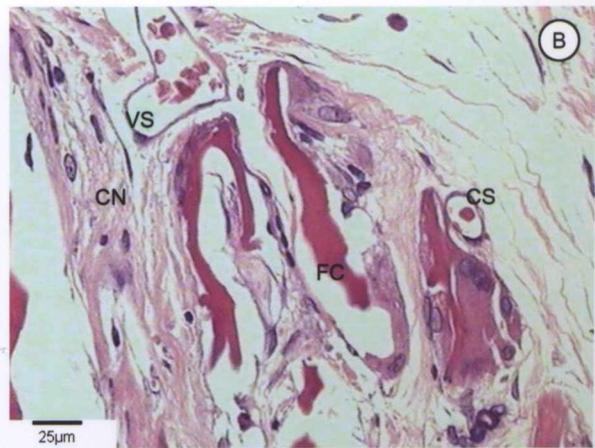
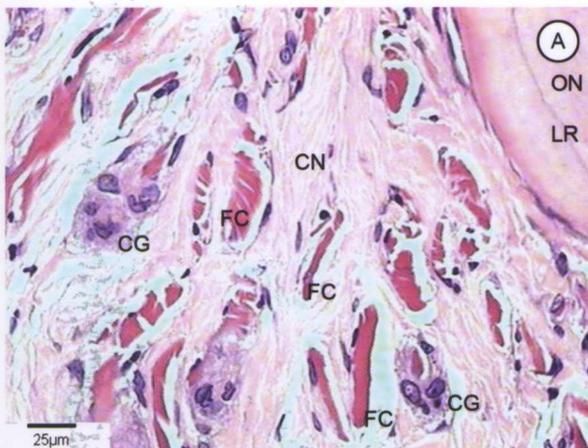


Figura 61. GI 120 D – (A) Biomaterial fragmentado na área de inflamação crônica granulomatosa; presença de células gigantes, algumas fagocitando as fibras do biomaterial. HE; parafina. Barra 25µm. **(B)** Presença de vasos e capilares sanguíneos (CS) associados ao tecido conjuntivo neoformado e às fibras do biomaterial que se encontram fragmentadas. HE; parafina. Barra 25µm.

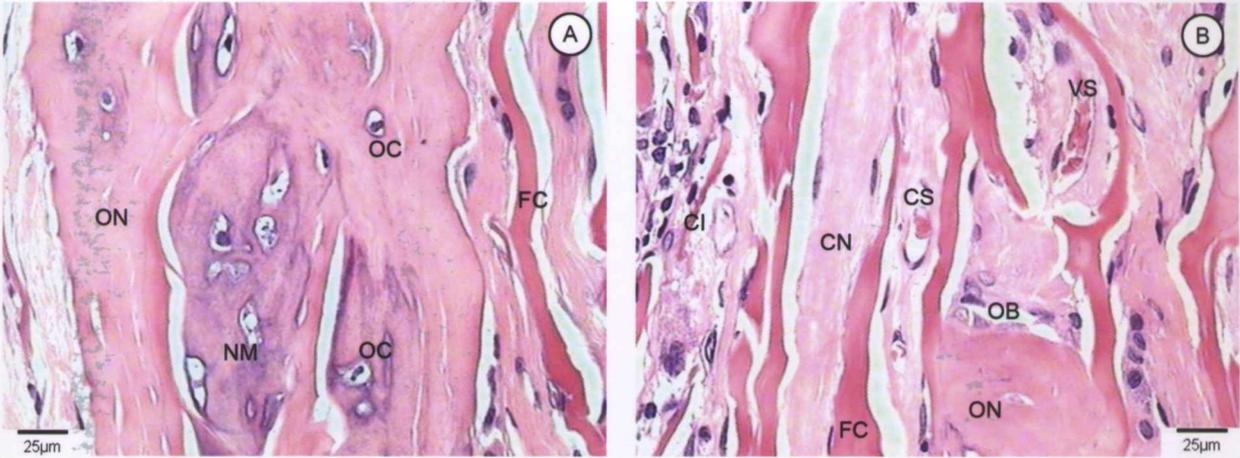


Figura 62. GI 120 D – (A) Formação de tecido ósseo de permeio às fibras da matriz colagênica; área mais basofílica característica de menor deposição mineral. HE; parafina. Barra 25µm. **(B)** Osso novo integrando as fibras à estrutura mineralizada; células inflamatórias associadas ao biomaterial fragmentado. HE; parafina. Barra 25µm.

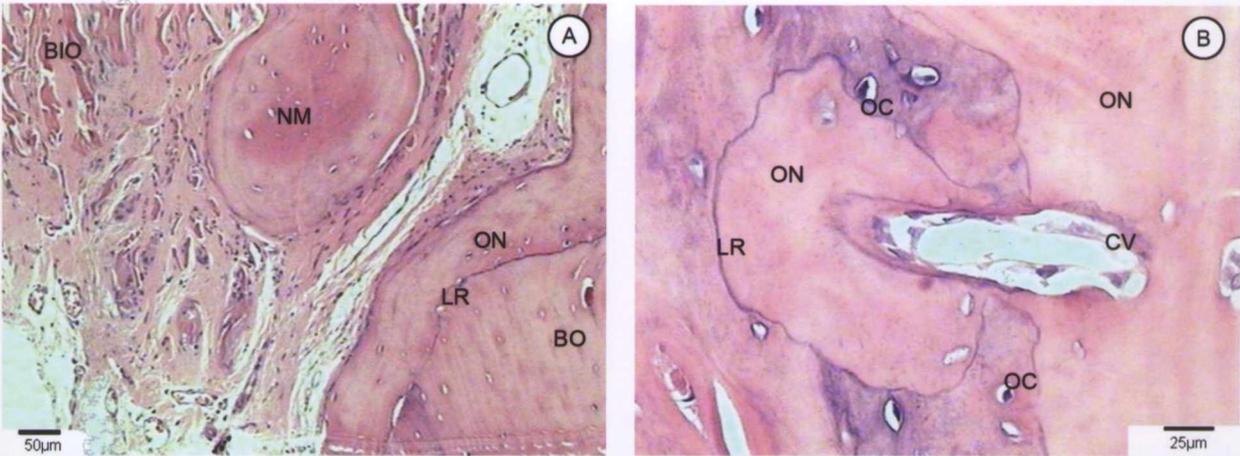


Figura 63. GI 120 D – (A) Mineralização na interface entre o biomaterial e a borda óssea. HE; parafina. Barra 50µm. **(B)** Organização do tecido ósseo neoformado em camadas, ao redor de um canal vascular. HE; parafina. Barra 25µm.

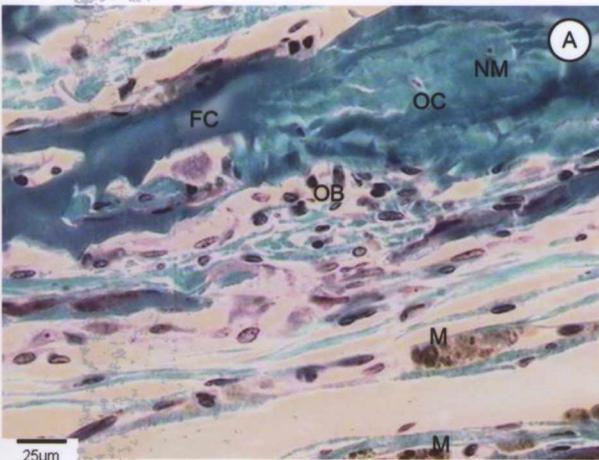


Figura 64. GI 120 D – (A) Macrófagos contendo pigmento castanho-amarronzado; osteoblastos ao redor do núcleo de mineralização. TG; resina. Barra 25µm.

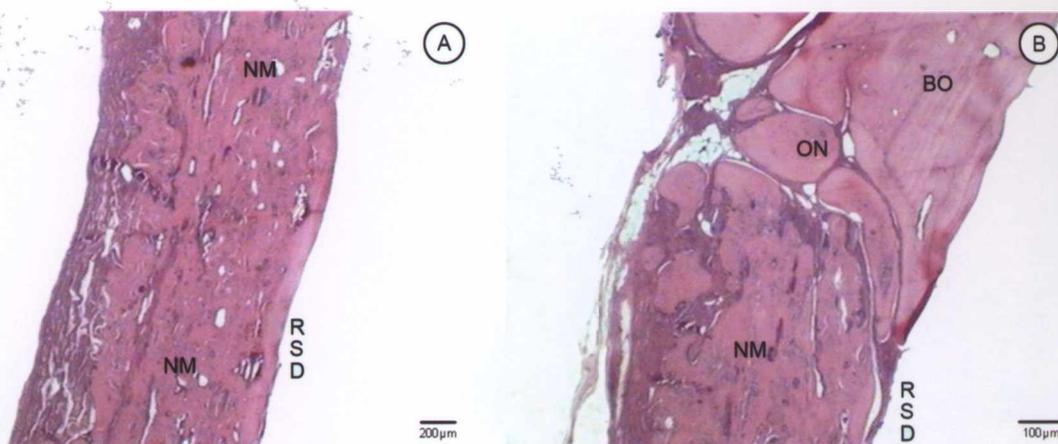


Figura 65. GII 120 D – (A) Extensa área de mineralização confluenta, envolvendo quase toda a espessura da matriz. HE; parafina. Barra 200µm. **(B)** Formação óssea na interface entre o biomaterial e a borda. HE; parafina. Barra 100µm.

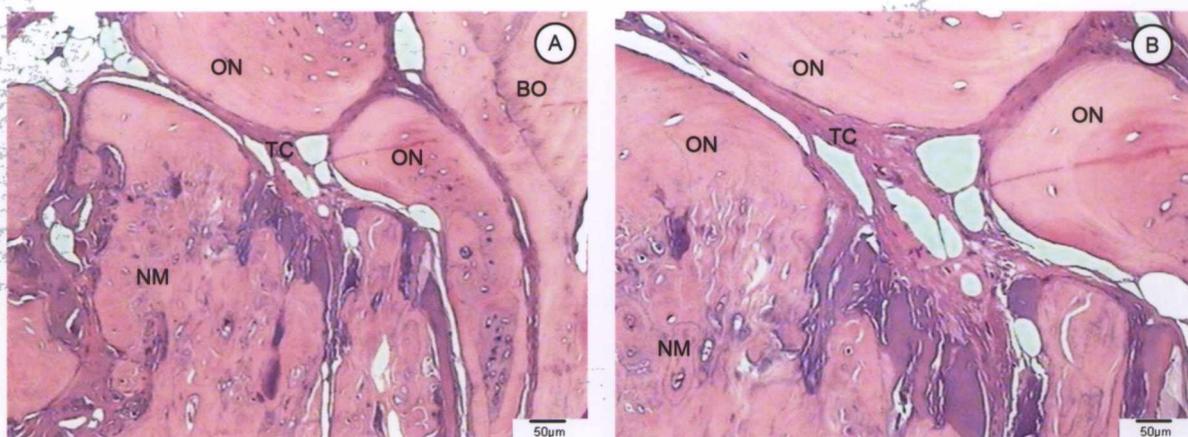


Figura 66. GII 120 D – (A) Biomaterial sendo integrado ao osso novo formado entre este e a borda óssea; a área mais basofílica indica menor deposição mineral. HE; parafina. Barra 50µm. **(B)** Detalhe, em maior aumento, da fotomicrografia "A", mostrando o osso novo organizado em camadas; o núcleo de mineralização. HE; parafina. Barra 50µm.

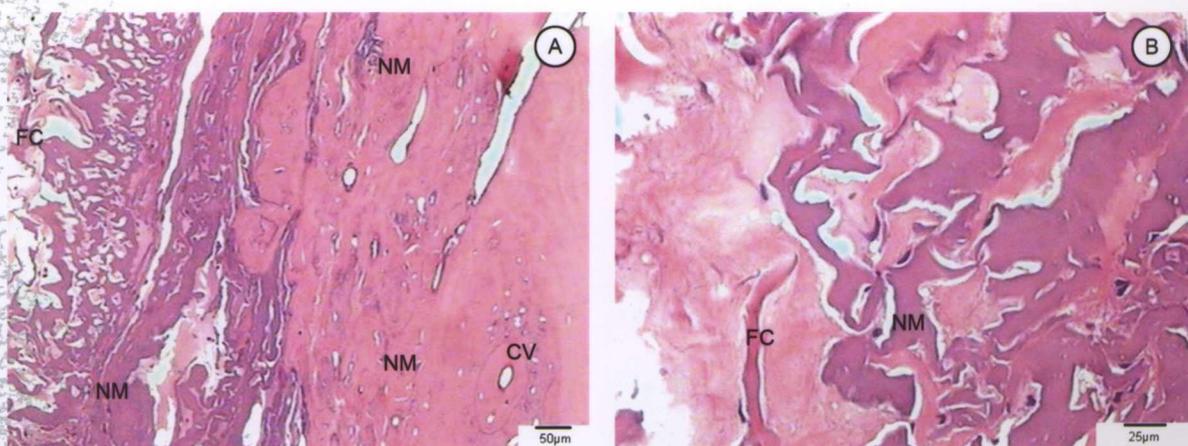


Figura 67. GII 120 D – (A) Grande área de mineralização na região central do defeito. HE; parafina. Barra 50µm. **(B)** Detalhe, em maior aumento, da fotomicrografia "A". Nota-se o aspecto residual do biomaterial circundado por áreas de mineralização recente. HE; parafina. Barra 25µm.

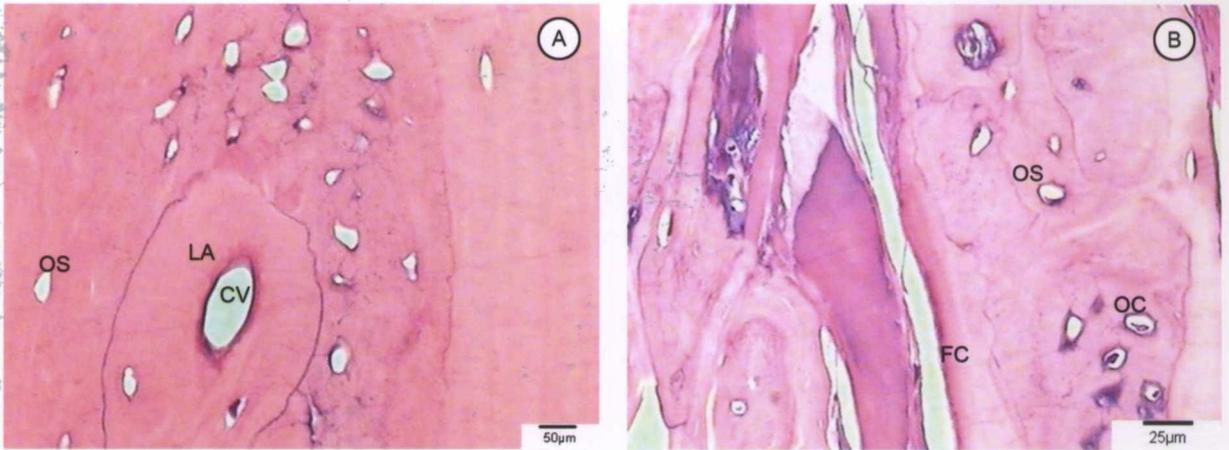


Figura 68. GII 120 D – (A) Nota-se a organização do tecido ósseo em lamela (LA), ao redor de um canal vascular; osteoplasto (OS). HE; parafina. Barra 50 μ m. **(B)** Fibra do material integrada ao osso novo. HE; parafina. Barra 25 μ m.

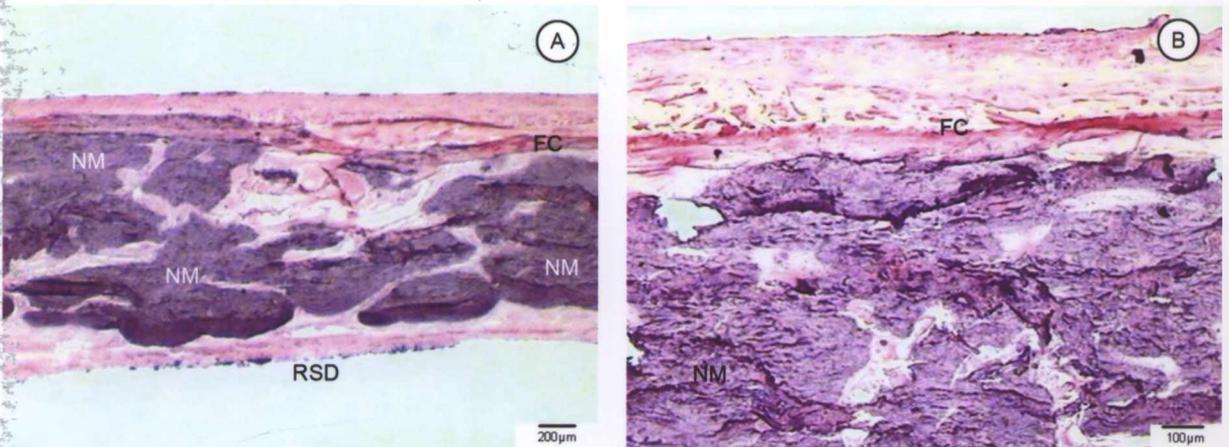


Figura 69. GII 120 D – (A) Extensa mineralização no interior do biomaterial, na região central do defeito, em quase toda a sua espessura. HE; parafina. Barra 200 μ m. **(B)** Detalhe em maior aumento da fotomicrografia da figura "A", com áreas de mineralização confluentes e fragmentos residuais do biomaterial, na porção voltada para o retalho. HE; parafina. Barra 100 μ m.

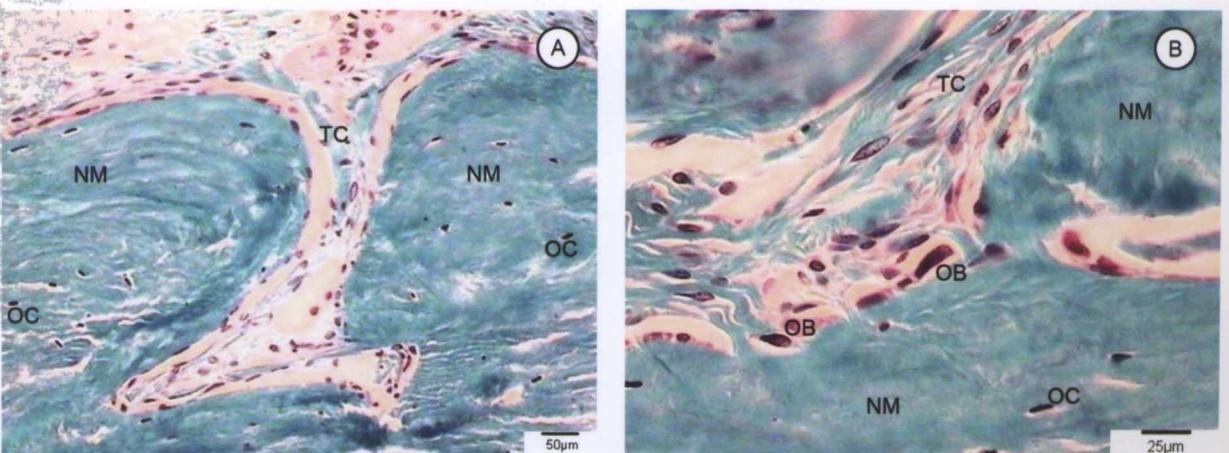


Figura 70. GII 120 D – (A) Interface de tecido conjuntivo formado entre os núcleos de mineralização evidenciados na região central do defeito. TG; resina. Barra 50 μ m. **(B)** Detalhe da fotomicrografia anterior. Nota-se os osteoblastos na superfície dos núcleos de mineralização confluentes. TG; resina. Barra 25 μ m.

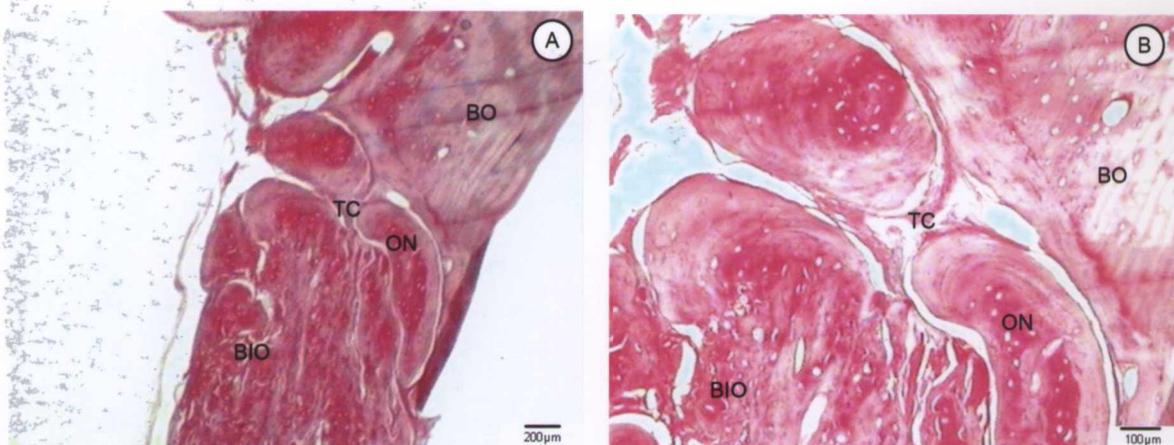


Figura 71. GII 120 D – (A) Área de preenchimento do defeito pelo biomaterial, da interface entre este e a borda óssea, com grande deposição colagênica, de intensidade variável, com maior intensidade nas regiões em maturação óssea. PV; parafina. 200µm. **(B)** Detalhe, em maior aumento, da fotomicrografia "A" destacando as diferentes regiões de maturação. PV; parafina. Barra 100µm.

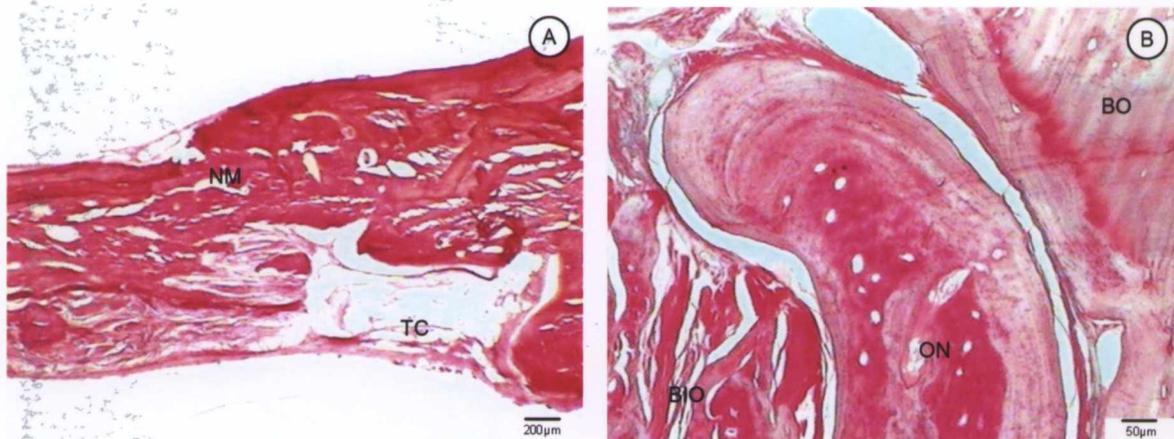


Figura 72. GII 120 D – (A) Invagação de tecido conjuntivo, na área central do defeito, por entre os núcleos de mineralização, de forma semelhante àquela da sutura sagital. PV; resina. Barra 200µm. **(B)** Mineralização na interface observada entre a matriz e a borda óssea. PV; parafina. Barra 50µm.

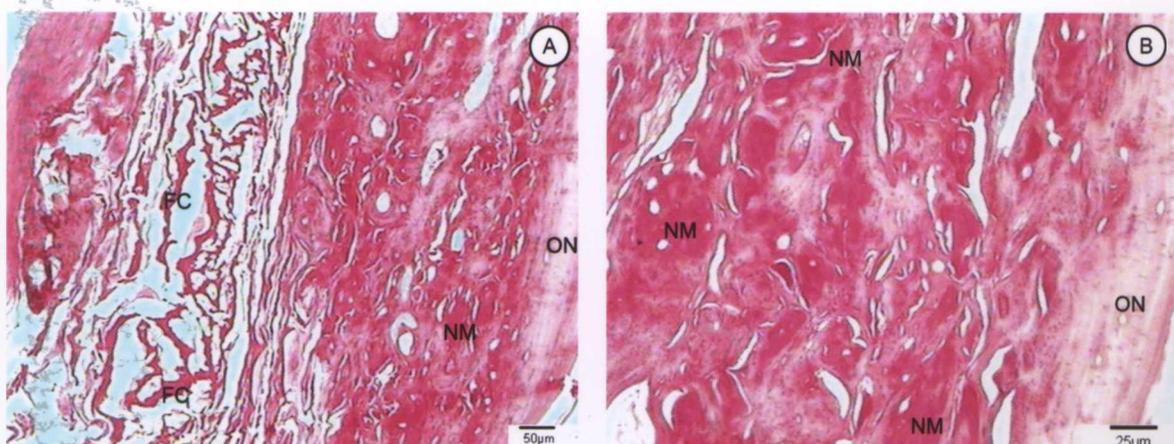


Figura 73. GII 120 D – (A) Fragmentação da fibras colagênicas na porção superior do biomaterial; área mais clara evidencia a organização da matriz colagênica osteóide. PV; parafina. Barra 50µm. **(B)** Grande área de mineralização na região central do biomaterial; nota-se diferentes intensidades de deposição de matriz osteóide; área mais clara evidencia a maturação do osso novo. PV; parafina. Barra 25µm.

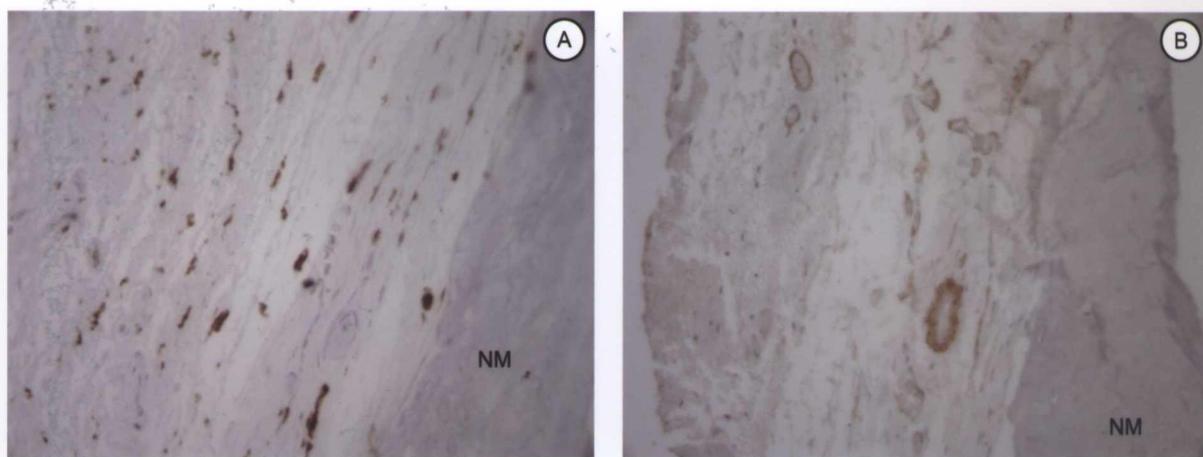


Figura 74. GII 120 D – (A) Identificação imunistoquímica de macrófagos ativados (ED-1). parafina; 40x. **(B)** Identificação dos vasos sanguíneos formados, no interior da matriz colagênica, por actina alfa de músculo liso. Parafina; 40x.

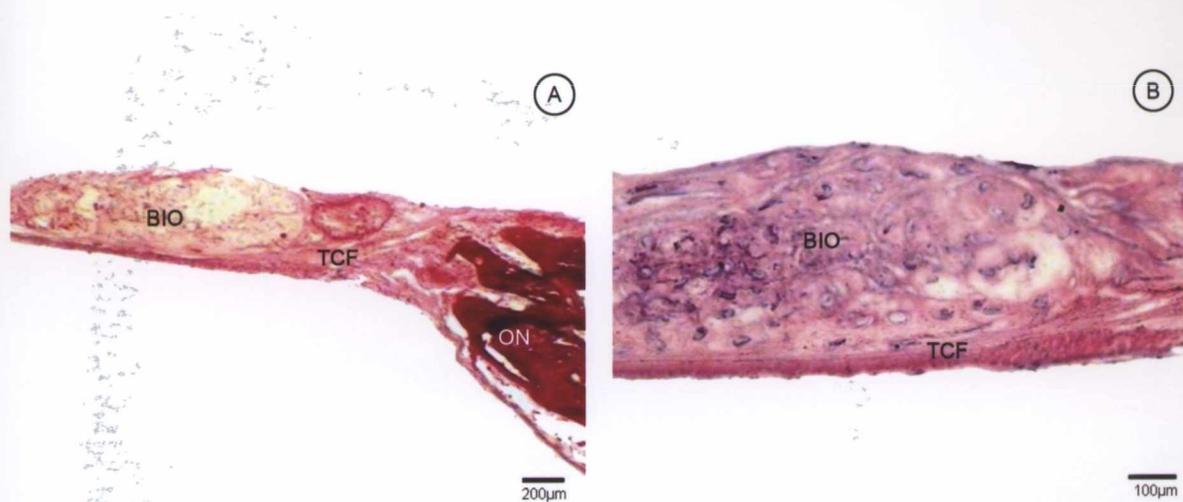


Figura 75. Gill 120 D – (A) Nota-se encapsulamento do biomaterial por tecido conjuntivo fibroso que se estende da borda óssea até o biomaterial. PV; resina. Barra 200µm. **(B)** Nota-se ausência de núcleos de mineralização no interior do biomaterial e o tecido conjuntivo circundando tanto a matriz como seus fragmentos. HE; parafina. Barra 100µm.

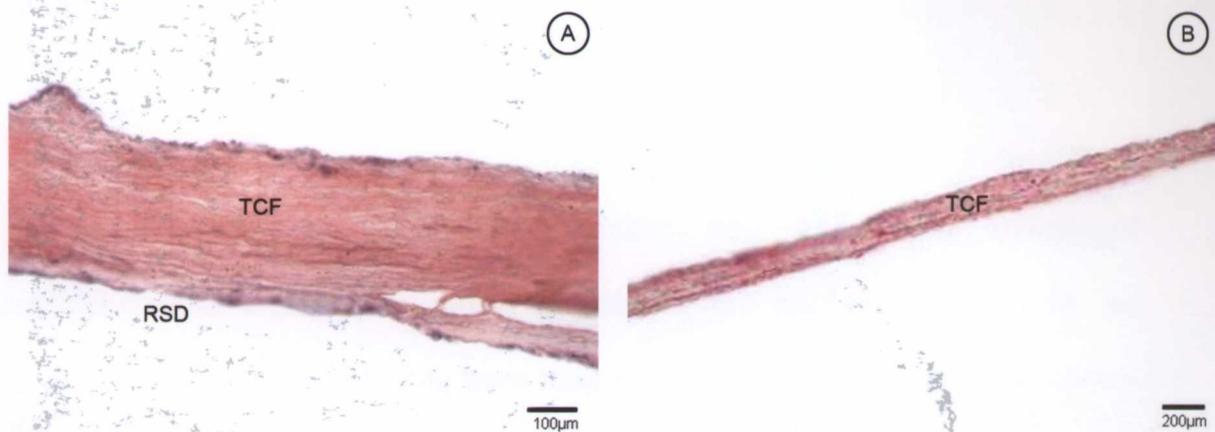


Figura 76. GIV 120 D – (A) Tecido conjuntivo de aspecto mais denso e organizado, na região central do defeito. HE; Parafina. Barra 100µm. **(B)**. Interstício preenchido por tecido conjuntivo denso e delgado, sem áreas de mineralização. HE; Parafina. Barra 200µm.

5.2. ANÁLISE MORFOMÉTRICA

A extensão linear dos defeitos não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre as médias, em nenhum dos grupos, ao longo do período experimental, nem mesmo entre estes, em todos os pontos biológicos observados, como mostra a tabela 4.

Tabela 4. Extensão linear do defeito.

Período Grupo	15 dias	45 dias	90 dias	120 dias	Regressão linear
GI	6,7 ± 0,2	6,2 ± 1,7	7,0 ± 2,0	6,8 ± 0,3	$p = 0,52$ NS
GII	8,4 ± 0,4	8,0 ± 0,5	7,8 ± 0,4	6,5 ± 0,7	$p = 0,09$ NS
GIV	7,5 ± 0,5	7,0 ± 0,6	7,2 ± 1,5	7,6 ± 0,5	$p = 0,80$ NS
ANOVA	GI x GII x GIV				$p = 0,07$ NS
Newman-Keulis	GI x GII				$p > 0,05$ NS
	GI x GIV				$p > 0,05$ NS
	GII x GIV				$p > 0,05$ NS

A mensuração do percentual de tecido neomineralizado (área seccional neoformada mineralizada) nos grupos I e II, mostrou aumento estatisticamente significativo ao longo dos tempos, confirmada pela regressão linear (GI – $p = 0,02$ S e GII – $p = 0,02$ S). No geral, houve uma diferença significativa entre os grupos I, II e IV (ANOVA – $p = 0,03$ S). Ao compararmos os valores de GI com GII (*Newman-Keulis* – $p < 0,05$ S), assim como GI com

GIV (*Newman-Keulis* – $p < 0,05$ S) notamos diferenças estatisticamente significantes. Contudo, quando as médias referentes ao GII são comparadas com GIV, percebe-se que os valores são muito significantes, especialmente aos 90 e 120 dias (*Newman-Keulis* – $p < 0,001$ MS).

No grupo IV, a regressão linear ($p = 0,08$ NS) nos mostrou não ter havido diferenças estatisticamente significantes no percentual de tecido neomineralizado na área seccional do defeito ao longo do período experimental. Neste grupo, o tecido neomineralizado não se modificou de forma expressiva ao longo do tempo.

Tabela 5. Percentual de preenchimento do defeito por tecido neomineralizado, área seccional neomineralizada em relação à área seccional total do defeito.

Período Grupo	15 dias	45 dias	90 dias	120 dias	Regressão linear
GI	23,0 ± 12%	40,0 ± 16%	49,4 ± 18%	66,0 ± 23%	$p = 0,02$ S
GII	49,0 ± 20%	66,0 ± 20%	83,0 ± 10%	87,0 ± 2%	$p = 0,02$ S
GIV	11,7 ± 9%	21,0 ± 18%	23,8 ± 17%	25,4 ± 13%	$p = 0,08$ NS
ANOVA		GI x GII x GIV			$p = 0,03$ S
<i>Newman-Keulis</i>		GI x GII			$p < 0,05$ S
		GI x GIV			$p < 0,05$ S
		GII x GIV			$p < 0,001$ MS

A mensuração dos capilares formados de permeio às fibras dos biomateriais evidenciou formação vascular crescente ao longo do tempo, apesar da análise da regressão linear não ter sido significante em nenhum dos grupos. A comparação entre as médias do GI com aquelas do GII, pelo teste não paramétrico de *Mann-Whitney*, também não nos mostrou diferenças

estatisticamente significantes ($p = 0,11$ NS), nem mesmo aos 90 dias quando o GII exibiu um aumento acentuado na formação vascular.

Tabela 6. Número de capilares sangüíneos na área de $10^6 \mu\text{m}^2$, escolhida aleatoriamente do defeito. Para esta avaliação foram considerados apenas os capilares cortados transversalmente, cuja relação entre o diâmetro horizontal e vertical não ultrapassasse 20%.

Período Grupo	15 dias	45 dias	90 dias	120 dias	Regressão linear
GI	66 ± 52	60 ± 19	105 ± 24	92 ± 17	$p = 0,20$ NS
GII	80 ± 28	109 ± 24	178 ± 41	153 ± 49	$p = 0,19$ NS
<i>Mann-Whitney</i>	GI x GII				$p = 0,11$ NS

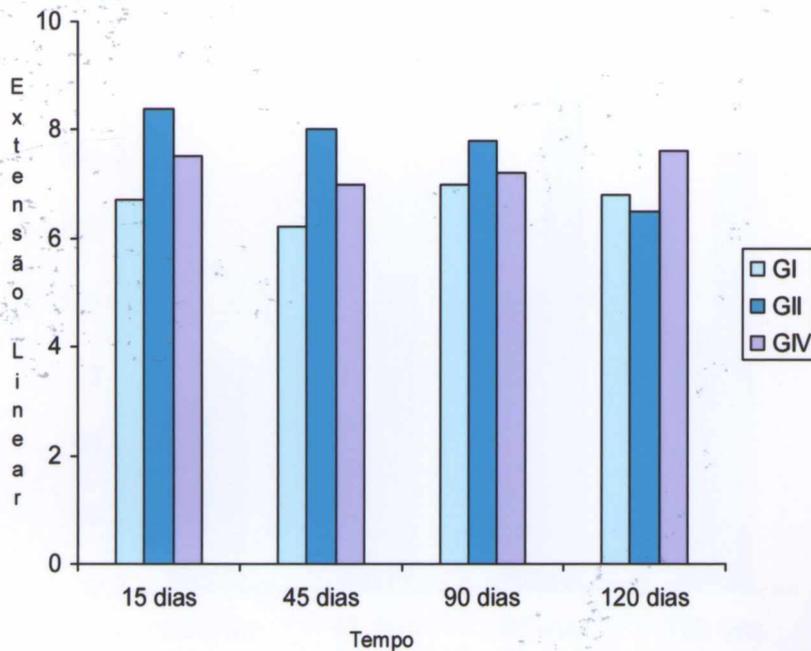


Figura 77. Mensuração da extensão linear do defeito. Nota-se que não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em nenhum ponto biológico (ANOVA – $p = 0,07$ NS).

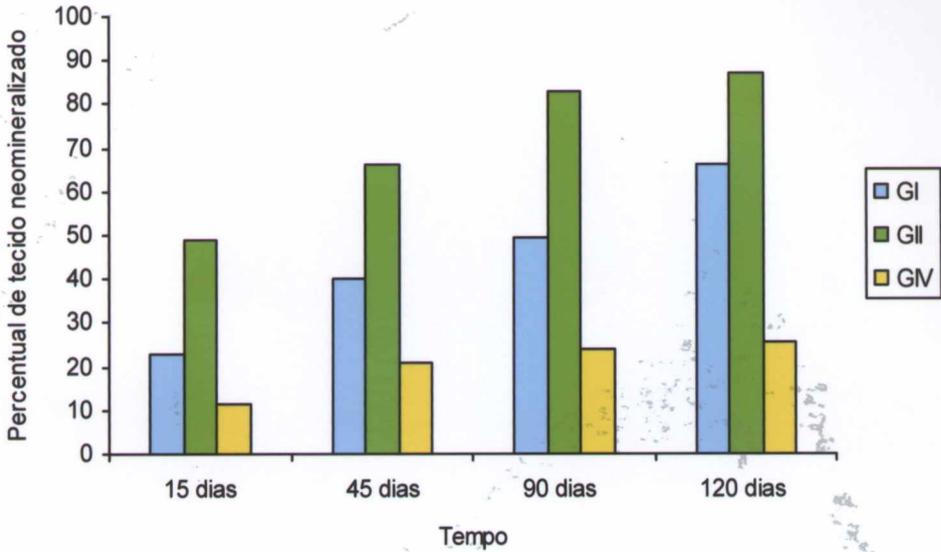


Figura 78. Análise do percentual de tecido neomineralizado na área seccional total do defeito. As colunas gráficas evidenciam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (ANOVA – $p = 0,03$ S). A comparação dos grupos ao longo do período experimental apontou, por meio do teste de regressão linear, diferenças estatisticamente significantes para o GI ($p = 0,02$ S) e o GII ($p = 0,02$ S), e não significantes para o GIII ($p = 0,08$ NS). O confronto entre os grupos GI e GII, assim como entre estes e o GIV, mostrou diferenças estatisticamente significantes.

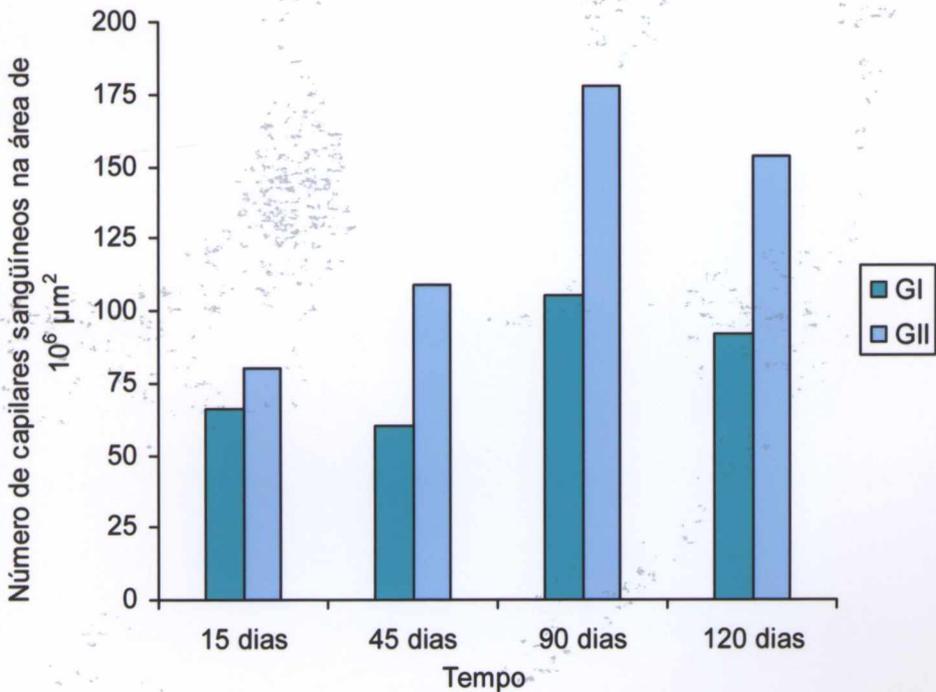


Figura 79. Determinação do número de capilares formados em associação aos biomateriais nos grupos I e II. A angiogênese mostrou-se crescente ao longo dos tempos, até o ponto biológico de 90 dias. A partir deste ponto, evidenciou-se o decréscimo deste fenômeno biológico. O teste de regressão linear, mostrou não ter havido diferenças estatisticamente significantes ao longo dos períodos. A comparação entre as médias do GI e do GII, por meio do teste não-paramétrico de *Mann-Whitney*, não revelou diferenças estatisticamente significantes entre estes ($p = 0,11$ NS), nem mesmo aos 90 dias, quando o GII exibiu um aumento acentuado na formação vascular.

6 DISCUSSÃO

A bioengenharia tecidual óssea tem buscado aprimorar e desenvolver técnicas e materiais apropriados à regeneração tecidual, para que sejam aplicados em situações clínicas onde há ausência ou perda de matriz óssea extensa, condições que restringem a reconstrução tecidual espontânea, tendo em vista as limitações e desvantagens das técnicas alternativas utilizadas atualmente. Estes biomateriais podem ser produzidos a partir de diferentes fontes, naturais ou sintéticas. Dentre os materiais naturais, pode-se destacar o colágeno, polímero de vasta aplicabilidade na área biomédica.

Logo que estas novas técnicas e biomateriais são produzidos ou aprimorados, faz-se necessário realizar estudos experimentais que avaliem suas interações celulares e teciduais, assim como seu potencial osteogênico quando da implantação *in vivo*. Fundamentados nos conceitos biológicos da regeneração tecidual óssea, nestes estudos, os modelos experimentais empregados devem mimetizar aquelas condições em que este mecanismo ocorre de forma limitada. Diante disso, o objetivo do nosso trabalho foi avaliar o potencial osteogênico de dois biomateriais colagênicos aniônicos hidrolisados, reticulados ou não em GA, no formato de matrizes tridimensionais, inseridos em defeito ósseo crítico (8,5mm),

criado em calvária de rato. No grupo controle positivo, foi implantado matriz de colágeno bovino tipo I, acelularizada, sem hidrólise e reticulação em GA, e no grupo controle negativo, não houve implantação de biomaterial, o defeito ósseo permaneceu preenchido apenas por coágulo sangüíneo.

Para ter acesso ao tecido ósseo, optamos por utilizar uma incisão cutânea, bicoronal e semilunar, distando 2cm do local padronizado para a confecção dos defeitos. Esta localização da incisão e posterior reposicionamento do retalho cutâneo, mantido estável por sutura interrompida, teve por objetivo não interferir com o reparo do defeito ósseo (MENDONÇA, 2005).

Nos defeitos críticos, quando não há implementação de técnicas regenerativas, a regeneração óssea é mínima e limitada às bordas e a área remanescente repara-se por fibrose. Nossos achados histológicos estão em consonância com os resultados encontrados por Takagi e Urist (1982), Marden e outros (1994), Sweeney e outros (1995), Chesmel e outros (1998), Ferreira e outros (2004), Marins e outros (2004), Pang e outros (2004), Mendonça (2005), Barreto (2006), Cardoso e outros (2006), Kneser e outros (2006), Miguel e outros (2006) e Intini e outros (2007), Barreto (2008), Carvalho (2008). Morfometricamente, o percentual de preenchimento do defeito, por tecido mineralizado neoformado foi restrito em apenas 25%, aos 120 dias, semelhante aos valores obtidos por Takagi e Urist (1982), reafirmando que suas dimensões são críticas à regeneração espontânea (SCHMITZ e HÖLLINGER, 1986), e ideais para avaliar o potencial osteogênico dos novos biomateriais e métodos terapêuticos regenerativos.

A análise histomorfológica realizada no nosso estudo possibilitou-nos ratificar que a morfologia e dimensão dos defeitos críticos utilizados em nosso trabalho são críticas à regeneração espontânea, uma vez que os resultados obtidos

para o grupo controle negativo demonstraram apenas neoformação óssea reparativa restrita às bordas do defeito, com formação de tecido conjuntivo fibroso na área remanescente, mesmo aos 120 dias. Nestes defeitos, a liberação de fatores de crescimento pelas células presentes nas bordas ósseas estimula a atividade mitótica das células ósseas presentes nas bordas e à diferenciação das células mesenquimais em células da linhagem osteoblástica, as quais sintetizam matriz osteóide com subsequente mineralização (ADAM, 1999). Contudo, devido ao aporte sanguíneo reduzido na área central dos defeitos e à ausência de um suporte estrutural apropriado para os eventos celulares essenciais à regeneração, este último mecanismo mantém-se limitado e restrito às bordas ósseas.

Atribui-se a formação do tecido conjuntivo fibroso à intensa migração centrípeta de fibroblastos adjacentes aos defeitos para o interior destes (GOSAIN e outros, 2003); à diferenciação de células mesenquimais, originadas da medula óssea e do perióstio situado próximo à área lesionada, e até mesmo do tecido conjuntivo circunjacente (FERGUSON e outros, 1999), induzidas pelos fatores de crescimento encontrados no local do reparo. Estas células fibroblásticas são predominantemente encontradas em tecidos conjuntivos formados a partir da cascata de eventos que culmina com o reparo tecidual por cicatrização (PAN; JIANG; CHEN, 2006).

A implantação de biomateriais nos sítios cirúrgicos é sempre seguida de uma reação inflamatória (ROSA e outros, 2003), pois sabe-se que as rupturas vasculares conseqüentes de lesões teciduais promovem a liberação de citocinas e mediadores químicos que iniciam uma resposta inflamatória em paralelo à formação do coágulo sanguíneo (CARANO e FILVAROFF, 2003; HING, 2004; ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2008).

O contato inicial do sangue extravasado, durante a remoção do fragmento ósseo, com a superfície dos biomateriais implantados forma uma matriz provisória, que viabiliza a interação das células envolvidas no reparo com as proteínas plasmáticas na superfície do material (ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2008). Desta forma, esta matriz oferece um suporte estrutural e bioquímico para o reparo tecidual, uma vez que funciona como substrato apropriado para a adesão, a migração (ANDERSON, 2000) e a diferenciação celulares (ANSELME, 2000). Sua formação depende das características físico-químicas do biomaterial implantado (ANDERSON, 2000), as quais interferem diretamente com a qualidade do novo tecido formado (LIU e MA, 2004).

Logo após a formação desta matriz provisória, inicia-se a resposta inflamatória aguda (REDDI; WIENTROUB; MUTHUKUMARAN, 1987), de resolução rápida, geralmente antes de completar uma semana, a depender da extensão da lesão, do sítio de implantação (ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2008) e da qualidade dessa matriz provisória formada na superfície do biomaterial. No nosso estudo, esta resposta mostrou-se ainda persistente, concomitantemente à inflamação crônica, aos 15 dias, apenas no GIII, vista na periferia do biomaterial, provavelmente devido às propriedades antigênicas dos telopeptídeos inerentes à estrutura da proteína do colágeno não tratado (LEVY e outros, 1986; KHOR, 1997; CHEVALLAY e HERBAGE, 2000; WAHL e CZERNUSZKA, 2006). Esta resposta acarretou em taxas de fragmentação e biodegradação acentuadas das fibras colagênicas da matriz implantada nesse grupo, especialmente quando comparado com os grupos I e II.

Nos outros grupos estudados (GI, GII e GIV), a resposta inflamatória aguda não foi observada aos 15 dias. Para este ponto biológico foram identificadas

células mononucleares, macrófagos e linfócitos, características da inflamação crônica, de forma semelhante nos três grupos. Não obstante, a inflamação crônica observada nos grupos I e II foi do tipo crônica granulomatosa. Estes achados são correlacionados à presença de biomateriais quando implantados nos sítios cirúrgicos (ANDERSON, 2000; TSAI e outros, 2005; ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2008).

A intensidade e duração dessa resposta inflamatória evidenciam a biocompatibilidade dos biomateriais (ANDERSON, 2000), conseqüentemente norteiam a aplicação clínica destes, ainda que o desenvolvimento de uma inflamação crônica granulomatosa com células gigantes tipo corpo estranho, circunjacente aos mesmos, seja considerada uma resposta inerente ao mecanismo de cicatrização quando da sua implantação *in vivo* (ANDERSON, 2000; TSAI e outros, 2005; ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2008). Nos estudos realizados por pesquisadores do nosso grupo, este tipo de resposta inflamatória tem sido freqüentemente observada (BARRETO, 2006; CARDOSO e outros, 2006; MIGUEL e outros, 2006; BARRETO, 2008; CARVALHO, 2008), inclusive nos resultados desta pesquisa. Nossos achados histológicos estão em conformidade com aqueles encontrados por Levy e outros (1986), Cirelli e outros (1997), Goissis e outros (1999), Buchaim (2004), Parreira (2004), Rocha e outros (2004), Mendonça (2005), Amaral (2006), que também avaliaram o comportamento histológico de diferentes biomateriais quando implantados *in vivo*.

A participação dos macrófagos no sítio de implantação durante a inflamação crônica em associação aos biomateriais é de relevância ímpar, visto que estas células secretam amplo repertório de substâncias biologicamente ativas, tais como citocinas; interleucina 1, 6, 10, 12, 18; fator de crescimento derivado de

plaquetas (PDGF); fator de crescimento epidérmico (EGF); fator de crescimento fibroblástico (FGF) e fator de crescimento tecidual beta (TGF- β), que direcionam a inflamação e o reparo tecidual em resposta ao biomaterial (ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2008). Para tanto, incitam a proliferação, migração e diferenciação de diferentes tipos celulares e, por fim, a regeneração ou formação de um tecido conjuntivo cicatricial e sua remodelação (ANDERSON, 2000). Diante da importância destes fatores solúveis na regeneração tecidual, nosso trabalho também investigou, por métodos imunistoquímicos indiretos, a presença do TGF- β e do fator VIII durante o reparo dos defeitos. Nossos resultados mostraram-se positivos para a secreção destes fatores apenas nos períodos iniciais de 15 dias. Entretanto, houve marcação celular positiva para macrófagos ativados (TGF- β e ED-1) durante todo estudo.

Tais achados imunistoquímicos ilustram as evidências histomorfológicas relativas à inflamação, a neoformação vascular e a regeneração óssea. No nosso estudo, este último evento foi observado apenas no GI e GII, provavelmente devido aos fatores solúveis supracitados associados aos parâmetros microestruturais atribuídos às matrizes de colágeno em função da hidrólise e reticulação em GA, sugerindo ter havido uma adequada interação célula-biomaterial. O tratamento químico de hidrólise, além de ter melhorado os parâmetros microestruturais inerentes ao colágeno do pericárdio bovino, aumentou a adesão celular em uma vez e meia (BET e outros, 2003).

A presença das cargas aniônicas resultantes deste tratamento químico, antes da síntese de nova MEC no interior das matrizes, presumidamente possibilitou a inserção de fatores de crescimento diversos (ROCHA; GOISSIS; ROSSI, 2002; ROCHA e outros, 2004), especialmente aqueles secretados pelas células

inflamatórias. Estes fatores estão correlacionados com o estabelecimento da linhagem osteoblástica. O novo padrão de interação eletrostática observado após a hidrólise seletiva modifica a barreira hidrofóbica presente na região *gap/overlap* (BET e outros, 2003) e, conseqüentemente, favorece a deposição de íons cálcio por entre as fibrilas de tropocolágeno (GOISSIS; MAGINADOR; MARTINS, 2003). A sobreposição desses fenômenos biomiméticos culminou com a regeneração dos defeitos, tanto nos animais do grupo I quanto do grupo II.

A análise histomorfométrica evidenciou diferenças estatisticamente significantes no percentual de tecido neomineralizado entre os grupos I e II. Neste último, a reação inflamatória crônica mostrou-se, no geral, menos intensa e, provavelmente, favoreceu a maior neoformação de tecido mineralizado, estatisticamente significativa, de permeio às fibras das matrizes. No grupo GI, a citotoxicidade do GA, desencadeada pela liberação dos aldeídos livres ou adsorvidos à superfície das matrizes durante a sua reticulação, desencadeou uma resposta inflamatória mais conspícua e menor migração celular centrípeta (SPEER e outros, 1980), conseqüentemente, menor mineralização. Esta menor migração celular foi semelhante àquela observada por Petite e outros (1995), quando também avaliaram matrizes de pericárdio bovino reticuladas em GA (0,05%).

Os núcleos de mineralização, vistos de permeio às fibras do biomaterial do GI e GII, formaram-se, inicialmente, a partir da região próxima à dura-máter e se estenderam em direção à porção superior das matrizes. Isto se justifica devido à liberação de fatores de crescimento pelas células da dura-máter e pela presença de células mesenquimais e da linhagem osteoblástica presentes nesta membrana conjuntiva, que, quando devidamente estimuladas, diferenciam-se em osteoblastos ativos que secretam matriz osteóide (GOSAIN e outros, 2003). De acordo com o

exposto, fica evidente que a regeneração destes defeitos ocorre a partir da indução à proliferação e diferenciação de células presentes na dura-máter (WANG e GLIMCHER, 1999). Contudo, a continuidade dos mecanismos regenerativos, nestes defeitos, requer um arcabouço tridimensional apropriado aos eventos celulares, inclusive à formação vascular no interior de sua estrutura.

Contrariamente às observações dos grupos supracitados, nos GIII e GIV, não foi vista regeneração óssea além da neoformação reparadora localizada nas bordas ósseas. No GIII, por certo não houve a regeneração óssea em razão dos parâmetros microestruturais, os quais favoreceram uma intensa resposta inflamatória e uma taxa de degradação elevada, não compatível com a neomineralização. Estes achados são similares àqueles encontrados por Wang e outros (2006), Intini e outros (2007) e Xu e outros (2007), quando estudaram defeitos críticos preenchidos com gel de colágeno tipo I, os quais apresentaram degradação similar àquela observada no grupo GIII. Esta resposta é esperada para biomateriais colagênicos não modificados quimicamente, em virtude da susceptibilidade do colágeno à ação das enzimas, especialmente, das colagenases (CHEN; HO; SHEU, 2005).

De acordo com os eventos biológicos da regeneração óssea e os princípios da bioengenharia tecidual óssea, as matrizes implantadas nestes sítios devem apresentar biodegradação controlada, compatível com neoformação tecidual (LIU e MA, 2004; CAPES; ANDO; CAMERON, 2005; DONZELLI e outros, 2007) à medida em que há substituição do biomaterial ou sua integração ao novo tecido. Para que os biomateriais colagênicos permaneçam por longos períodos, faz-se necessário, portanto, submetê-los a tratamentos físicos ou químicos (PETITE e outros, 1995) que melhorem suas propriedades biológicas nativas. Um agente

amplamente utilizado na reticulação desta proteína é o GA (PETITE e outros, 1995; CIRELLI e outros, 1997; CHEVALLAY e HERBAGE, 2000; SCHMIDT e BAIER, 2000; ANGELE e outros, 2004), aldeído bifuncional que estabelece ligações cruzadas e aumenta o tempo de permanência do biomaterial no sítio de implantação (BOWES e CATER, 1965; FRIESS, 1998; CHARULATHA e RAJARAM, 2003).

No nosso estudo, optamos por utilizar este agente na concentração de 0,05%, pois esta melhora as propriedades mecânicas do colágeno, ao mesmo tempo em que oferece biocompatibilidade ao biomateriais (CIRELLI e outros, 1997). As matrizes reticuladas com agente, implantadas no GI, apresentaram biodegradação compatível com a neoformação tecidual óssea, indicando substancial melhora nas suas propriedades físico-químicas. Todavia, as matrizes do grupo GII que não foram reticuladas em GA também apresentaram tempo de permanência semelhante. Diante disto, pode-se concluir que a hidrólise seletiva dos resíduos de Asp e Gln, além de adicionar cargas elétricas negativas ao colágeno, com aumento na adesão celular (PLEPIS; GOISSIS; DAS-GUPTA, 1996; LACERDA; PEPLIS; GOISSIS, 1998; BET; GOISSIS; LACERDA, 2001; ROCHA; GOISSIS; ROSSI, 2002), e criar poros à estrutura densa do pericárdio bovino (ROCHA; GOISSIS; ROSSI, 2002), pôde também favorecer um maior tempo de permanência das matrizes quando implantadas *in vivo* para o modelo experimental estudado.

Como já abordado anteriormente, as características físico-químicas dos arcabouços matriciais tridimensionais devem ser controladas com vistas a favorecerem os eventos celulares essenciais à reconstituição do tecido ósseo. A porosidade e suas interconexões, a topografia superficial e a biodegradação também são parâmetros que têm sido amplamente discutidos nos últimos anos. Segundo Wintermantel e outros (1996), O'Brien e outros (2005) e Arpornmaeklong e outros

(2007), matrizes que apresentam poros com diâmetros entre 50 e 150 μ m são apropriadas à osteogênese, particularmente por possibilitarem a migração de osteoblastos, que apresentam tamanho entre 10 a 30 μ m (ARONOW e outros, 1990).

As matrizes avaliadas neste estudo (GI e GII) apresentaram poros com diâmetro médio de 42 μ m (ROCHA; GOISSIS; ROSSI, 2002), e assim, possibilitou-nos visualizar osteoblastos no interior da matriz, dispostos em arranjo paralelo à orientação de suas fibrilas, fato fundamental para a neomineralização observada em todos os pontos biológicos dos grupos I e II. De acordo com a análise morfométrica, percebeu-se aumento estatisticamente significativo na mineralização ocorrida na área seccional do defeito ao longo dos tempos estudados, tanto para o GI quanto para o GII. No entanto, vale ressaltar que, ao compararmos os percentuais de preenchimento de tecido neomineralizado na área seccional do defeito, constatou-se uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos I e II. Isto se justifica devido à citotoxicidade do GA, responsável por uma menor infiltração celular de permeio às fibras da matriz colagênica (SPEER e outros, 1980). As matrizes implantadas nos grupos I e II mostraram integrar-se ao tecido mineralizado neoformado, de forma semelhante àquela evidenciada por Rocha, Goissis, Rossi, (2002), Rosa e outros (2003), Rocha e outros (2004) e Miguel e outros (2006), que estudaram matrizes colagênicas com características físico-químicas semelhantes, contudo em sítios cirúrgicos diferentes, exceto Miguel e outros (2006), que os implantaram também em defeito ósseos críticos.

As colunas gráficas relativas ao GIV apresentam percentuais de neoformação tecidual mineralizada menos expressivos em relação aos grupos anteriormente mencionados, ao tempo em que corrobora com as afirmações de Takagi e Urist (1982), Schmitz e Höllinger (1986), Marden e outros (1994), Sweeney

e outros (1995), Chesmel e outros (1998), Ferreira e outros (2004), Marins e outros (2004), Pang e outros (2004), Mendonça (2005), Cardoso e outros (2006), Kneser e outros (2006), Miguel e outros (2006) e Intini e outros (2007), relativas à limitada capacidade regenerativa do tecido ósseo nestas condições.

É sabido que a regeneração óssea é um mecanismo dependente da neoformação vascular. Assim, nos estudos de medicina regenerativa, a angiogênese é um fenômeno fundamental para a finalização dos mecanismos biológicos regenerativos. No nosso estudo, evidenciamos a formação vascular de permeio às fibras das matrizes, principalmente, nos grupos I e II. Os achados histológicos do grupo II relativos à angiogênese, foram reforçados pelas marcações imunoistoquímicas, as quais foram positivas para actina alfa de músculo liso e para o fator VIII, observada em células contráteis da parede dos vasos sanguíneos. A análise morfométrica referente à neoformação vascular, demonstrou que este evento biológico manteve-se menos intenso no GI, quando comparado ao GII, havendo consistência entre a quantidade de vasos neoformados e o percentual de tecido mineralizado formado neste segundo grupo. Estes achados são coerentes com as observações relativas à regeneração óssea, as quais reconhecem uma íntima conexão entre formação vascular e osteogênese (CARANO e FILVAROFF, 2003).

O formato tridimensional das matrizes em estudo, é um outro aspecto relevante a ser analisado, uma vez que estas atuam como substrato para a células e fatores solúveis fundamentais na regeneração tecidual. No que tange a este parâmetro, nossos resultados sugerem que o formato destas matrizes e a manutenção da sua arquitetura (GI e GII) foram determinantes para a ocorrência dos eventos biológicos impostos pelos mecanismos de regeneração tecidual óssea, haja vista que este formato apresenta similaridade com a arquitetura óssea, no que se

refere ao trânsito de moléculas sinalizadoras, fatores de crescimento, células e vasos sanguíneos. Diante do exposto, foi possível notar, no GI e GII, neoformação vascular, migração e diferenciação fibroblástica e osteoblástica, além da presença de fatores solúveis, como TGF- β , fator VIII, evidenciados na análise imunohistoquímica.

Ademais, as matrizes colagênicas implantadas no GI e no GII, atuaram como barreira física contra o avanço de tecido conjuntivo circunjacente em direção ao defeito, o que poderia comprometer substancialmente a sua regeneração, como referido por Kellomäki e outros (2000) e Donzelli e outros (2007).

O promissor comportamento biomimético das matrizes colagênicas aniônicas estudadas, quanto à regeneração de defeitos críticos, evidenciaram o seu potencial uso em aplicações clínicas futuras.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

De acordo com as condições experimentais e resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

- Os biomateriais colagênicos aniônicos avaliados neste estudo foram biocompatíveis;
- Estas matrizes apresentaram elevado potencial osteogênico com regeneração dos defeitos ósseos críticos;
- As matrizes colagênicas aniônicas sem reticulação em glutaraldeído (GII) evidenciaram maior potencial osteogênico do que as matrizes reticuladas (GI).
- O tratamento químico por hidrólise seletiva das matrizes colagênicas aniônicas, por si só, possibilitou a sua degradação controlada, sem contribuição adicional do GA.

Referências

REFERÊNCIAS

- ADAM, J. A. A simplified model of wound healing: with particular reference to the critical size defect. *Math. Comput. Model.*, v.30, p.23-32, 1999.
- ALVES, M. G. B. *Ageing e alteração da região overlap-gap do colágeno tipo I: repercussão sobre a mineralização e seu papel na osteoporose*. 2006, 105f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia), Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos.
- AMARAL, M. B. *Citotoxicidade in vitro e biocompatibilidade in vivo de compósitos a base hidroxiapatita, colágeno e quitosana*. 2006, 98f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia), Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos.
- ANDERSON, H. C. Molecular biology of matrix vesicles. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, s/v, p.266-280, 1995.
- ANDERSON, J. M. The cellular cascades of wound healing. In: DAVIES, J. E. (Ed.) *Bone Engineering*. Toronto: Squared Incorporated, cap.7, p.81-93, 2000.
- ANDERSON, J. M.; RODRIGUEZ, A.; CHANG, D. T. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin. Immunol.*, v.20, p.86-100, 2008.
- ANGELE, P.; ABKE, J.; KUJAT, R.; FALTERMEIER, H.; SCHUMANN, D.; NERLICH, M.; KINNER, B.; ENGLERT, C.; RUSZCAZAK, Z.; MEHRL, R.; MUELLER, R. Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices. *Biomaterials*, v.25, p.2832-2841, 2004.
- ANSELME K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*, v.21, p.667-681, 2000.
- ARONOW, M. A.; GERSTENFELD, L.C.; OWEN, T. A.; TASSINARI, M. S. STEIN, G. S.; LIAN, J. B. Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria. *J. Cell Physiol.*, v.143, p.213-221, 1990.

- ARPORNMAEKLONG, P.; SUWATWIROTE, N.; PRIPATNANONT, P.; OUNGBHO, P. Growth and differentiation of mouse osteoblasts on chitosan-collagen sponges. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, v.36, p.328-337, 2007.
- BADYLAK, S. F. The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials*, v.28, p.3587-3593, 2007.
- BALCERZAK, M; HAMADE, E.; ZHANG, L.; PIKULA, S.; AZZAR, G.; RADISSON, J.; BANDOROWICZ-PIKULA, J.; BUCHET, R. The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process. *Acta Biochim. Pol.*, v.50, p.1019-1038, 2003.
- BARRETO, E. C. *Avaliação in vivo do reparo de defeito ósseo com biomaterial do tipo microesferas cerâmicas*. 2006. 103f. Dissertação (Mestrado em Odontologia), Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- BARRETO, I. C. *Utilização de microesferas de hidroxiapatita no reparo de defeitos críticos em calvária de rato*. 2008. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfológicas), Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro/Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- BATISTA, T. M.; MARTINS, V. C. A.; PLEPIS, A. M. G. Calcificação *in vitro* de matrizes colagênicas derivadas de pericárdio bovino e pele de porcina. In: *IV Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomaterias*. Caxambu, 2006.
- BAXTER, L. C.; FRAUCHIGER, V.; TEXTOR, M.; GWYNN, I.; RICHARDS, R. G. Fibroblast and osteoblast adhesion and morphology on calcium phosphate surfaces. *Eur. Cell Mater.*, v.4, p.1-17, 2002.
- BEHONICK, D. J.; XING, Z.; LIEU, S.; BUCKLEY, J. M.; LOTZ, J. C.; MARCUCIO, R. S.; WERB, Z.; MICAU, T.; COLNOT, C. Role of matrix metalloproteinase 13 in both endochondral and intramembranous ossification during skeletal regeneration. *PLoS One*, v.2, p.1-10, 2007.
- BET, M. R.; GOISSIS, G.; LACERDA, C. A. Characterization of polyanionic collagen prepared by selective hydrolysis of asparagines and glutamine carboxamide side chains. *Biomacromolecules*, v.2, p.1074-1079, 2001.
- BET, M. R.; GOISSIS, G.; VARGAS, S.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. Cell adhesion and cytotoxicity studies over polyanionic collagen surfaces with variable negative charge and wettability. *Biomaterials*, v.24, p.131-137, 2003.
- BOSCH, C.; MELSEN. B.; VARGERVIK, K. Guided bone regeneration in calvarial bone defects using polytetrafluoroethylene membranes. *Cleft Palate-Craniofac. J.*, v.32, p.311-317, 1995
- BOSCH, C.; MELSEN. B.; VARGERVIK, K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regeneration materials. *J. Craniofac. Surg.*, v.9, n.4, p.310-316, 1998.

BOSKEY, A. L. Mineral-matrix interactions in bone and cartilage. *Clin. Orthop. Relat. Res. s/v.*, p.244-274, 1992.

BOSKEY, A. L.; PASCHALIS, E. Matrix protein and biomineralization. *In: Davies JE. Bone Engineering*, cap.5, p.44-62, 2000.

BOSTROM, M. P. G. Expression of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Clin. Orthop. Relat. Res., s/v.*, p.S116-S123,1998.

BOWES, J. H.; CATER, C. W. The reaction of glutaraldehyde with proteins and other biological materials. *J. Microsc.*, v.85, p.193-200, 1965.

BOYAN, B. D.; HUMMERT, T. W.; DEAN, D. D.; SCHWARTZ, Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials*, v.17, p.137-146, 1996.

BRUNEL, G.; PIANTONI, P.; ELHARAR, F.; BENQUÉ, E.; MARIN, P.; ZAHEDI, S. Regeneration of rat calvarial defects using a bioabsorbable membrane technique: influence of collagen cross-linking. *J. Periodontol.*, v.67, p.1342-1348, 1996.

BUCHAIM, R. L. *Biocompatibilidade de matrizes de colágeno aniônico e sua influência na orientação do crescimento celular*. 2004, 81f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde), Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, 2004.

CACCIAFESTA, V.; DALSTRA, M.; BOSCH, C.; MELSEN, B.; ANDREASSEN, T. T. Growth hormone treatment promotes guided bone regeneration in rat calvarial defects. *Eur. J. Orthod.*, v.23, p.733-740, 2001.

CANCEDDA, R.; GIANNONI, P.; MASTROGIACOMO, M. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. *Biomaterials*, v.28, p.4240-4250, 2007.

CAPES, J. S.; ANDO, H. Y.; CAMERON, R. E. Fabrication of polymeric scaffolds with a controlled distribution of pores. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, v.16, p.1069-1075, 2005.

CARANO, A. D.; FILVAROFF, E. H. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov. Today*, v.8, p.980-984, 2003.

CARDOSO, A. K. M. V.; BARBOSA JUNIOR, A. A.; MIGUEL, F. B.; MARCANTONIO JUNIOR, E.; FARINA, M.; SOARES, G. D. A.; ROSA, F. P. Histomorphometric analysis of tissue responses to bioactive glass implants in critical defects in rat calvaria. *Cell Tissues Organs.*, v.184, p.128-137, 2006.

CARVALHO, F. A. A. *Avaliação in vivo de matrizes tridimensionais de quitosana para a bioengenharia tecidual óssea*. 2008. 115f. Dissertação (Mestrado em Odontologia), Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia.

- CHARULATHA, V.; RAJARAM, A. Influence of different crosslinking treatments on the physical properties of collagen membranes. *Biomaterials*, v.24, p.759-767, 2003.
- CHEN, R. N.; HO, H. O.; SHEU, M. T.; Characterization of collagen matrices crosslinked using microbial transglutaminase. *Biomaterials*, v.26, p.4229-4235, 2005.
- CHESMEL, K. D.; BRANGER, J.; WERTHEIM, H.; SCARBOROUGH, N. Healing response to various forms of human demineralized bone matrix in athymic rat cranial defects. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v.56, p.857-863, 1998.
- CHEVALLAY, B.; HERBAGE, D. Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: applications for tissue engineering and gene therapy. *Med. Biol. Eng. Comput.* v.38, p.211-218, 2000.
- CIRELLI, J. A.; MARCANTONIO JR, E.; MARCANTONIO, R. A. C.; LIA, R. C. C.; GOISSIS, G.; ROSSA JR, C. Evaluation of anionic collagen membranes in the treatment of class II furcation lesions: an histometric analysis in dogs. *Biomaterials*, v.18, p.1227-1234, 1997.
- COSTA, R. C. C.; MIGUEL, F. B.; ROSA, F. P. Estratégias de bioengenharia tecidual na reconstrução óssea. *R. Ci. Med. Biol.* v.4, p.70-76, 2005.
- COURTMAN, D. W.; PEREIRA, C. A.; KASHEF, V.; McCOMB, D.; LEE, J. M.; WILSON, G. J. Development of a pericardial acellular matrix biomaterial: biochemical and mechanical effects of cell extraction. *J. Biomed. Mater. Res.*, v.28, p.655-666, 1994.
- COWLES, E. A.; DeROME, M. E.; PASTIZZO, G.; BRAILEY, L. L.; GRONOWICZ, G. A. Mineralization and the expression of matrix proteins during *in vivo* bone development. *Calcif. Tissue Int.*, v.62, p.74-82, 1998.
- CROFTS, C. E.; TROWBRIDGE, E. A. The tensile strength of natural and chemically modified bovine pericardium. *J. Biomed. Mater. Res.*, v.22, p.89-98, 1988.
- CUKIERMAN, E. PANKOV, R.; STEVENS, D. R.; YAMADA, K. M. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*, v.294, p.1708-1712, 2001.
- CUNHA, M. R.; SANTOS JUNIOR, A. R.; GENARI, S. C. Cultura de osteoblastos sobre membranas de colágeno polianiónico: avaliação preliminar do potencial de indução da formação de tecido ósseo visando reparação tecidual. *Bol. Med. Vet.*, v.1, p.73-85, 2005.
- CUNHA, M. R. *Implantes tridimensionais de colágeno polianiónico em falas ósseas produzidas no fêmur de ratas ovariectomizadas*. 2006. 126f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural), Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

DAAMEN, W. F.; NILLESEN, S. T. M.; HAFMANS, T.; VEERKAMP J. H.; LUYN, M. J. A.; KUPPERVELT, T. H. Tissue response of defined collagen-elastin scaffolds in young and adult rats with special attention to calcification. *Biomaterials*, v.26, p.81-92, 2005.

DeLACURE, M. D. Physiology of bone healing and bone grafts. *Otolaryngol. Clin. North Am.*, v.27, p.859-874, 1994.

DONZELLI, E; SALVADÈ, A.; MIMO P.; VIGANÒ, M.; MORRONE, M.; PAPAGNA, R.; CARINI, F.; ZAOPO, A.; MILOSO, M.; BALDONI, M.; TREDICI, G. Mesenchymal stem cells cultured on a collagen scaffold: *in vitro* osteogenic differentiation. *Arch. Oral Biol.*, v.52, p.64-73, 2007.

FARAJ, K. A.; KUPPEVELT, T. H.; DAAMEN, W. F. Construction of collagen scaffolds that mimic the three-dimensional architecture of specific tissues. *Tissue Eng.*, v.13, p.2387-2394, 2007.

FERGUSON, C.; ALPERN, E.; MICLAU, T.; HELMS, J. A. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mech. Dev.*, v.87, p.57-66, 1999.

FERREIRA, G. R.; CESTARI, T. M.; GRANJEIRO, J. M.; TAGA, R. Lack of repair of rat skull critical size defect treated with bovine morphometric protein bound to microgranular bioabsorbable hydroxyapatite. *Braz. Dent. J.*, v.15, p.175-180, 2004.

FRAME, J. W. A convenient animal model for testing bone substitute materials. *J. Oral Surg.*, v.38, p.176-180, 1980.

FRIESS, W. Collagen: biomaterial for drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v.45, p.113-136, 1998.

GARCÍA, A. J.; REYES, C. D. Bio-adhesive surfaces to promote osteoblast differentiation and bone formation. *J. Dent. Res.*, v.84, p.407-413, 2005.

GAVILANES, J. G.; BUITRAGO, G. G.; LIZARBE, M. A.; MUNICIO, A. M.; OLMO, N. Stabilization of pericardial tissue by glutaraldehyde. *Connect. Tissue Res.*, v.13, p.37-44, 1984.

GIANCOTTI, F. G.; RUOSLAHTI, E. Integrin signaling. *Science*, v.285, p.1028-1032, 1999.

GÓES, J. C.; FIGUEIRÓ, S. D.; PAIVA, J. A. C.; VASCONCELOS, I. F.; SOMBRA, A. S. B. On the piezoelectricity of anionic collagen films. *J. Physics. Chem. Solids*, v.63, p.465-470, 2002.

GOISSIS, G.; PICCIRILI, L.; GOES, J. C.; PLEPIS, A. M. G.; DAS-GUPTA, D. K. Anionic collagen: polymer composites with improved dielectric and rheological properties. *Artif. Organs*, v.22, p.203-209, 1998.

GOISSIS, G.; BRAILE, D. M.; GIGLIOTI, A. F. Desenvolvimento de processo automático para a reticulação progressiva de matrizes de colágeno com glutaraldeído. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, s/v., 92-97, 1999.

GOISSIS, G.; LACERDA, C.; BARBOSA, M. P.; PINATTI, A. Surface tension control of collagen biomaterials by the selective hydrolysis of internal carboxyamides of the protein matrix. *Rev. Bras. Eng. Biomed.*, v.15, p.55-61, 1999.

GOISSIS, G.; MAGINADOR, S. V. S.; MARTINS, V. C. A. Biomimetic mineralization of charged collagen matrices: *in vitro* and *in vivo* study. *Artif. Organs*, v.27, p.437-443, 2003.

GONÇALVES, E. A. L.; GUIMARÃES, S. A. C.; GARCIA, R. B. Proteínas morfogenéticas ósseas: terapêutica molecular no processo de reparo tecidual. *Rev. Odontol. UNESP*, v.12, p.299-304, 1998.

GOSAIN, A. K.; SANTORO, T. D.; SONG, L. S.; CAPEL, C. C.; SUDHAKAR, P. V.; MATLOUB, H. S. Osteogenesis in calvarial defects: contribution of the dura, the pericranium, and the surrounding bone in adult versus infant animals. *Plastic Reconstr. Surg.*, v.112, p.515-527, 2003.

GRATZER, P. F.; SANTERRE, J. P.; LEE, J. M. Modulation of collagen proteolysis by chemical modification of amino acid side-chains in acellularized arteries. *Biomaterials*, v.25, p.2081-2094, 2004.

GREEN, D.; WALSH, D.; MANN, S.; OREFFO, R. O. C. The potential of biomimesis in bone tissue engineering: lessons from the design and synthesis of invertebrate skeletons. *Bone*, v.30, p.810-815, 2002.

HILL, P. A.; ORTH, M. Bone remodeling. *Br. Dent. J.*, v.25, p.101-107, 1998.

HING, K. A. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? *Philos. Transact. A Math. Phys. Eng. Sci.*, v.362, p.2821-2850, 2004.

HUTMACHER, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, v.21, p.2529-2543, 2000.

IKADA, Y. Challenges in tissue engineering. *J. R. Soc. Interface*, v.3, p.589-601, 2006.

INTINI, G.; ANDREANA, S.; INTINI, F. E.; BUSHITE, R. J.; BOBEK, L. A. Calcium sulfate and platelet-rich plasma make a novel osteoinductive biomaterial for bone regeneration. *J. Transl. Med.*, v.5, p.1-13, 2007.

JORGE-HERRERO, E.; FERNÁNDEZ, P.; TURNAY, J.; OLMO, N.; CALERO, P.; GARCÍA, R.; FREILE, I.; CASTILLO-OLIVARES, J. L. Influence of different chemical cross-linking treatments on the properties of bovine pericardium and collagen. *Biomaterials*, v.20, p.539-545, 1999.

KELLOMÄKI, M.; NIIRANEN, H.; PUUMANEN, K.; ASHAMMAKHI, N.; WARIS, T.; TÖRMÄLÄ, P. Bioabsorbable scaffolds for guided bone regeneration and generation. *Biomaterials*, v.21, p.2495-2505, 2000.

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

KLEINMAN, H. K.; KLEBE, R. J.; MARTIN, G. R. Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. *J. Cell Biol.*, v.88, p.473-485, 1981.

KNESER U.; SCHAEFER, D. J.; POLYKANDRIOTIS, E.; HORCH, R. E. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. *J. Cell Mol. Med.*, v.10, p.7-19, 2006.

KNUDSON, M. J.; COOPER, C. S.; BLOCK, C. A.; HAWTREY, C. E.; AUSTIN, J. C. Calcification of glutaraldehyde cross-linked collagen in bladder neck injections in children with incontinence: a long-term complication. *J. Urol.*, v.176, p.1143-1146, 2006.

LACERDA, C.; PLEPIS, A. M. G.; GOISSIS, G. Hidrólise seletiva de carboxiamidas de resíduos de asparagina e glutamina em colágeno: preparação e caracterização de matrizes aniônicas para uso como biomateriais. *Quim. Nova*, v.21, p.267-271, 1998.

Le GUEHENNEC, L.; GOYENVALLE, E.; AGUADO, E.; HOUCHEMAND-CUNY, M.; ENKEL, B.; PILET, P.; DACULSI, G.; LAYROLLE, P. Small-animal models for testing macroporous ceramic bone substitutes. *J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater.*, v.72B, p.69-78, 2005.

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

LEVY, R. J.; SCHOEN, F. J.; SHERMAN, F. S.; NICHOLS, J.; HAWLEY, M. A.; LUND, S. A. Calcification of subcutaneously implanted type I collagen sponges: effects of formaldehyde and glutaraldehyde pretreatments. *Am. J. Pathol.*, v.122, p.71-82, 1986.

LIANG, H. C.; CHANG, Y.; HSU, C. K.; LEE, M. H.; SUNG, H. W. Effects of crosslinking degree of an acellular biological tissue on its tissue regeneration pattern. *Biomaterials*, v.25, p.3542-3552, 2004.

LIEBSCHNER, M. A. K. Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. *Biomaterials*, v.25, p.1697-1714, 2004.

LIM, S. C.; LEE, M. J.; YEO, H. H. Effects of various implant materials on regeneration of calvarial defects in rats. *Pathol. Int.*, v.50, p.594-602, 2000.

LIU, C.; XIA, Z.; CZERNUSZKA, J. T. Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *Chem. Eng. Res. Des.*, v.85, p.1051-1064, 2007.

- LIU, X.; MA, P. X.; Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Ann. Biomed. Eng.*, v.32, p.477-486, 2004.
- LOGEART-AVRAMOGLU, D.; SCHAEFER, D. J.; POLYKANDRIOTIS, E. ; HORCH, R. E. Engineering bone: challenges and obstacles. *J. Cell Mol. Med.*, v.9, p.72-84, 2005.
- MARDEN, L. J.; HOLLINGER, J. O.; CHAUDHARI, A.; TUREK, T. ; SCHAUB, R. G.; RON, E. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 is superior to desmineralized bone matrix in repairing craniotomy defects in rat. *J. Biomed. Mater. Res.*, v.28, p.1127-1138, 1994.
- MARINS, L. V.; CESTARI, T. M.; SOTTOVIA, A. D.; GRANJEIRO, J. M.; TAGA, R. Radiographic and histological study of perennial bone defect repair in rat calvaria after treatment with blocks of porous bovine organic graft material. *J. Appl. Oral. Sci.*, v.12, p.62-69, 2004.
- MASTROGIACOMO, M; SCAGLIONE, S.; MARTINETTI, R.; DOLCINI, L.; BELTRAME, F.; CANCEDDA, R.; QUARTO, R. Role of scaffold internal structure on *in vivo* bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials*, v.27, p.3230-3237, 2006.
- MEGHJI, S. Bone remodelling. *Br. Dent. J.*, v.172, p.235-242, 1992.
- MEIKLE, M. C.; BORD, S.; HEMBRY, R. M.; COMPSTON, J.; CROUCHER, P. I.; REYNOLDS, J. J. Human osteoblasts in culture synthesize collagenase and other matrix metalloproteinases in response to osteotropic hormones and cytokines. *J. Cell Sci.*, v.103, p.1093-1099, 1992.
- MENDONÇA, T. A. *Caracterização físico-química e análise histológica do potencial osteocondutor de diferentes implantes xenogênicos no reparo de defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de ratos (Rattus norvegicus)*. 2005. 190f. Dissertação (Mestrado em Odontologia), Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru.
- MEYER, U.; BÜCHTER, A.; WIESMANN, H. P.; JOOS, U.; JONES, D. B.; Basic reactions of osteoblasts on structured material surfaces. *Eur. Cell Mater.*, v.9, p.39-49, 2005.
- MIGUEL, F. B., CARDOSO, A. K.; BARBOSA JUNIOR, A. A.; MARCANTONIO JUNIOR, E.; GOISSIS, G.; ROSA, F. P. Morphological assessment of the behavior of threedimensional anionic collagen matrices in bone regeneration in rats. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, v.78, p.334-339, 2006.
- MULLIKEN, J. B.; GLOWACKI, J. Induced osteogenesis for repair and construction in the craniofacial region. *Plast. Reconstr. Surg.*, v.65, p.553-559, 1980.

- NEFFUSSI, J. R.; BRAMI, G.; MODROWSKI, D.; OBOEUF, M.; FOREST, N. Sequential expression of bone matrix proteins during rat calvaria osteoblast differentiation and bone nodule formation *in vitro*. *J. Histochem. Cytochem.* v.45, p.493-503, 1997.
- O'BRIEN, F. J.; FARELL, E.; WALLER, M. A.; CONNELL, I.; O' MAHONEY, D. O.; McGARRY, J. P.; MURPHY, B. P.; MCHUNG, P. E.; CAMPBELL, V. A.; PRENDERGAST, P. J. Scaffolds and cells: preliminary biomechanical analysis and results for the use of a collagen-GAG scaffold for bone tissue engineering. In: PRENDERGAST, P. J.; MCHUNG, P. E. (Ed.) *Topics in biomechanical engineering*, cap.4, p.167-183, 2004.
- O'BRIEN, F. J.; HARLEY, B. A.; WALLER, M. A.; YANNAS, I. V.; GIBSON, L. J.; PRENDERGAST, P. J. The effect of pore size on permeability and cell attachment in collagen scaffolds for tissue engineering. *Technol. Health Care.* v.15, p.3-17, 2007.
- O'BRIEN, F. J.; HARLEY, B. A.; YANNAS, I. V.; GIBSON, L. J. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials*, v.26, p.433-441, 2005.
- ORTEGA, N.; BEHONICK, D. J.; WERB, Z. Matrix remodeling during endochondral ossification. *Trends Cell Biol.*, v.14, p.86-93, 2004.
- PAN, H.; JIANG, H. L.; CHEN, W. L. Interaction of dermal fibroblasts with electrospun composite polymer scaffolds prepared from dextran and poly lactide-coglycolide. *Biomaterials*, v.27, p.3209-3220, 2006.
- PANG, E. K.; IM, S. U.; KIM, C.; CHOI, S. H.; CHAI, J. K.; KIM, C. K.; HAM, S. B.; CHO, K. S. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-4 dose bone formation in a rat calvarial defect model. *J. Periodontol.*, v.75, p.1364-1370, 2004.
- PARREIRA, D. R. *Matrizes tridimensionais de colágeno aniônico, elastina como suporte para reconstrução de tecidos moles: um estudo da integração matriz-tecido*. 2004, 55f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia), Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.
- PAULA, M. *Compósitos colágeno aniônico: ramsana como biomateriais injetáveis, caracterização e mecanismo de interação*. 2003, 96f. Tese (Doutorado em Ciências, Química Analítica), Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos.
- PAULA, M.; GOISSIS, G.; MARTINS, V. C. A. Rheological behavior of anionic collagen injectable gels in the presence of rhamosan for plastic surgery applications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, v.18, p.1683-1690, 2007.
- PEARCE, A. I.; RICHARDS, R. G.; MILZ, S.; SCHNEIDER, E.; PEARCE, S. G. Animal models for implant biomaterials research in bone: a review. *Eur. Cell Mater.*, v.13, p.1-10, 2007.

- PETITE, H.; DUVAL, J. L.; FREI, V.; ABDUL-MALAK, N.; SIGOT-LUIZARD, M. F.; HERBAGE, D. Cytocompatibility of calf pericardium treated by glutaraldehyde and by the acyl azide methods in an organotypic culture model. *Biomaterials*, v.16, p.1003-1008, 1995.
- PLEPIS, A. M. G.; GOISSIS, G.; DAS-GUPTA, D. K. Dielectric and pyroelectric characterization of anionic and native collagen. *Pol. Eng. Sci.*, v.36, p.2932-2938, 1996.
- RADHIKA, M.; BABU, M.; SEHGAL, P. K. Cellular proliferation on desamidated collagen matrices. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, v.124, p.131-139, 1999.
- REDDI, A. H.; WIENTROUB, S.; MUTHUKUMARAN, N. Biologic principles of bone induction. *Orthop. Clin. North Am.*, v.18, p.207-212, 1987.
- RHO, J. Y.; KUHN-SPEARING, L.; ZIOUPOS, P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Med. Eng. Phys.*, v.20, p.92-102, 1998.
- ROCHA, L. B.; BROCHI, M. A. C.; BELLUCCI, A. D.; ROSSI, M. A. Efficacy of polyanionic collagen matrices for bone defect healing. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, v.71, p.355-9, 2004.
- ROCHA, L. B.; GOISSIS, G.; ROSSI, M. A. Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. *Biomaterials*, v.23, p.449-456, 2002.
- ROSA, F. P.; LIA, R. C. C.; SOUZA, K. O. F.; GOISSIS, G.; MARCANTONIO JUNIOR, E. Tissue response to polyanionic collagen: elastin matrices implanted in rat calvaria. *Biomaterials*, v.24, p.207-212, 2003.
- RUPPRECHT, MERTEN, H. A.; KESSLER, P.; WILTFANG, J. Hydroxyapatite cement (BoneSourceTM) for repair of critical sized calvarian defects: an experimental study. *J. Craniomaxillofac. Surg.*, v.31, p.149-53, 2003.
- SANTIN, M.; RHYS-WILLIAMS, W.; O'REILLY, J.; DAVIES, M. C.; SHAKESHEFF, K.; LOVE, W. G.; LLOYD, A. W.; DENYER, S.P. Calcium-binding phospholipids as a coating material for implant osteointegration. *J. R. Soc. Interface*, v.3, p.277-281, 2006.
- SCHMIDT, C. E.; BAIER, J. M. Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. *Biomaterials*, v.21, p.2215-2231, 2000.
- SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin. Orthop. and Relat. Res.*, v.225, p.299-308, 1986.
- SEAL, B. L.; OTERO, T.C.; PANITCH, A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Mater. Sci. Eng. R.*, v.34, p.147-230, 2001.

SHIN, H.; JO, S.; MIKOS, A. G. Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials*, v.24, p.4353-4364, 2003.

SILVA, S. V. *Mineralização biomimética in vivo e in vitro de matrizes de colágeno aniônico: modelo de biomineralização*. 2005. 119f. Tese (Doutorado em Ciências, Química Analítica), Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

SODEK, J.; McKEE, M. D. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol.*, v.24, p.99-126, 2000.

SOMMER, B; BICKEL, M.; HOFSTETTER, W.; WETTERWALD, A. Expression of matrix proteins during the development of mineralized tissues. *Bone*, v.19, p.371-380, 1996.

SPEER, D. P.; CHVAPIL, M.; ESKELSON, C. D.; ULREICH, J. Biological effects of residual glutaraldehyde in glutaraldehyde-tanned collagen biomaterials. *J. Biomed. Mater., Res.*, v.14, p.753-764, 1980.

STEVENS, M. M.; GEORGE, J. H. Exploring and engineering the cell surface interface. *Science*, v.310, p.1135-1138, 2005.

STRASSER, S.; ZINK, A.; JANKO, M.; HECKL, W. M.; THALHAMMER, S. Structural investigations on native collagen type I fibrils using AFM. *Biophys. Res. Commun.*, v.354, p.27-32, 2007.

STREET J.; BAO, M.; DeGUZMAN L.; BUNTING. S., PEALE, F. V.; JR; FERRARA. N.; STEINMETZ H.; HOFFEL, J.; CLELAND, J. L.; DAUGHERTY A.; BRUGGEN, N.; REDMOND, H. P.; CARANO, R.A.; FILVAROFF E. H. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.99, p.9656-9661, 2002.

SWAMINATHAN, R. Biochemical markers of bone turnover. *Clin. Chim. Acta*, v.313, p.95-105, 2001.

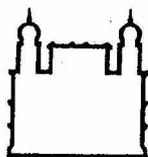
SWEENEY, T. M.; OPPERMAN, L. A.; PERSING, J. A.; OGLE, R. C. Repair of critical size rat calvarial defects using extracellular matrix protein gels. *J. Neurosurg.*, v.83, p.710-715, 1995.

TAKAGI, K.; URIST, M. R. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. *Ann. Surg.*, v.196, p.100-109, 1982.

TEITELBAUM, S. L. Bone resorption by osteoclasts. *Science*, v.289, p.1504-1508, 2000.

TILLER, J. C.; BONNER, G.; PAN, L. C.; KLIBANOV, A. M. Improving biomaterial properties of collagen films by chemical modification. *Biotechnol. Bioeng.*, v.73, p.246-252, 2001.

- TSAI, A. T.; RICE, J.; SCATENA, M.; LIAW, L.; RATNER, B. D.; GIACHELLI, C. M. The role of osteopontin in foreign body giant cell formation. *Biomaterials*, v.26, p.5835-5843, 2005.
- VARDAXIS, N. J.; BOON, M. E.; RUIJGROK, J. M. Calcification of cross-linked collagen-elastin membrane implants *in vivo* and their proposed use bone regeneration. *Biomaterials*, v.17, p.1489-1497, 1996.
- VATS, A.; TOLLEY, N. S.; POLAK, J. M.; GOUGH, J. E. Scaffolds and biomaterials for tissue engineering: a review of clinical applications. *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.*, v.28, p.165-172, 2003.
- VERNA, C.; BOSCH, C.; DALSTRA, M.; WIKESJÖ, U. M. E.; TROMBELLI, L. Healing patterns in calvarial bone defects following guided bone regeneration in rats: A micro-CT scan analysis. *J. Clin. Periodontol.*, v.29, p.865-870, 2002.
- VIANNA, U. Histofisiologia do tecido ósseo. *Rev. Bras. Clin. Ter.*, v.17, p.331-339, 1988.
- VORTKAMP, A.; PATHI, S.; PERETTI, G. M.; CARUSO, E. M.; ZALESKE, D. J.; TABIN, C. J. Recapitulation of signals regulating embryonic bone formation during postnatal growth and in fracture repair. *Mech. Dev.*, v.71, p.65-76, 1998.
- WAHL, D. A.; CZERNUSZKA, J. T. Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair. *Eur. Cell Mater.*, v. 11, p. 43-56, 2006.
- WANG, J.; GLIMCHER, M. J. Characterization of matrix-induced osteogenesis in rat calvarial bone defects: I differences in the cellular response to demineralized bone matrix implanted in calvarial defects and in subcutaneous sites. *Calcify. Tissue Int.*, v. 65, p. 156-165, 1999.
- WANG, J.; ZHOU, H. Y.; SALIH, E.; XU, L.; WUDERLICH, L.; GU, X.; HOFSTAETTER, J. G.; TORRES, M.; GLIMCHER, M. J. Site-specific *in vivo* calcification and osteogenesis stimulated by bone sialoprotein. *Calcif. Tissue Int.*, v.79, p.179-189, 2006.
- WEIGEL, T.; SCHINKEL, G.; LENDLEIN, A. Design and preparation of polymeric scaffolds for tissue engineering. *Expert Rev. Med. Devices*, v.3, p.835-851, 2006.
- WENG, J.; WANG, M. Producing chitin scaffolds with controlled pore size and interconnectivity for tissue engineering. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, v.12, p.855-860, 2001.
- WINTERMANTEL, E.; MAYER, J.; BLUM, J.; ECKERT, K. L.; LÜSCHER, P.; MATHEY, M. Tissue engineering scaffolds using superstructures. *Biomaterials*, v.17, p.83-99, 1996.
- XU, L.; ANDERSON, A. L.; LU, Q.; WANG, J. Role of fibrillar structure of collagenous carrier in bone sialoprotein-mediated matrix mineralization and osteoblast differentiation. *Biomaterials*, v.28, p.750-761, 2007.



Ministério da Saúde

155

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADÔ

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº 012/2006, sobre o projeto intitulado "Bioengenharia tecidual óssea com matrizes tridimensionais colagênicas aniônicas implantadas em calvária de rato", sob a responsabilidade da Dra. Fabiana Paim Rosa, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Código Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em 24/08/2006. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até 24/08/2007.

We certify that the protocol nº 012/ 2006 about the project entitled "Bioengenharia tecidual óssea com matrizes tridimensionais colagênicas aniônicas implantadas em calvária de rato" agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 24/08/2006 meeting. In the present version, this project is licensed and valid until 24/08/2007)

Salvador, 25 de agosto de 2006

Dra. Aldina Barral
Coordenadora da CEUA -CPqGM/FIOCRUZ

ALDINA BARRAL
Coordenadora da CEUA - CPqGM
Mat. 2844532 CPqGM - Fiocruz

Comitê de Ética No Uso de Animais - Rua Waldemar Falcão, nº 121, Brotas, Salvador, Bahia,
CEP: 40295-001, Brasil

Tel: (71) 356-0129 Ramal: 239 Fax: (71) 356-2155
e-mail: abarral@cpqgm.fiocruz.br

PROTOCOLO UTILIZADO NAS TÉCNICAS DE IMUNOISTOQUÍMICA

Animal: rato

Cortes: em parafina;

Fixador: Formol tamponado 10% vinte e quatro horas

Descalcificador: em ácido nítrico

Anticorpos: α -sma (1:100), ED-1 (1:100), FVIII. (1:100), TGF- β (1:100).

Material: calvária de rato com defeito ósseo crítico e matriz colagênica implantado.

1º dia

1. Fixação dos cortes à lâmina	40min
2. Desparafinização em xilol I	15min
3. Desparafinização em xilol II	15min
4. Desparafinização em xilol III	15min
5. Hidratação em álcool 100%	05min
6. Hidratação em álcool 90%	05min
7. Hidratação em álcool 80%	05min
8. Hidratação em H ₂ O destilada	20min
9. Hidratação em H ₂ O destilada	20min
10. Bórax	30min
11. Lavar em água H ₂ O (2 banhos)	5mi cada
12. Recuperação antigênica: Tripsina 10min + Steamer 10min (Tampão citrato pH 6,0 + Tween 20 0,2%)	10min
13. Deixe esfriar em Temperatura ambiente	
14. Lavar em H ₂ O destilada (2 banhos)	5min cada
15. Inibição peroxidase endógena H ₂ O ₂ 3% em metanol	20min
16. Lavar em H ₂ O destilada (2 banhos)	5min cada
17. Bloqueio de ligações inespecíficas PBS-BSA 5%, Triton 0,1% e Tween 0,05 (usar <i>parafilm</i> em câmara úmida)	1h
18. Lavar rapidamente em PBS pH 7,4	
19. Bloqueio da biotina endógena Avidina	10min
20. Lavar rapidamente em PBS pH 7,4	
21. Biotina	10min
22. Lavar rapidamente em PBS pH 7,4	
23. Incubação com os anticorpos Colocar na câmara úmida e deixar <i>overnight</i> na geladeira	<i>overnight</i>

2º dia

24. Deixar em temperatura ambiente	30min
25. Lavar em PBS Tween 0,25%	05min
26. Incubar com anticorpo secundário Kit LSAB (rato)	15min
27. Biotina	01h
28. Lavar em PBS-Tween 0,25%	05min
29. Streptavdina	30min
30. Lavar PBS-Tween 0,25%	05min
31. Revelar com DAB	controlar
32. Lavar PBS-Tween 0,25%	05min
33. Lavar H ₂ O destilada (2 banhos)	05min
34. Contra-corar com Hematoxilina de <i>Harris</i> diluída 1:3	1min30seg.
35. Mergulhar rapidamente em H ₂ O ácida	2x
36. Lavar em corrente – retirar o excesso de Hematoxilina	
37. Montagem	
Desidratar em álcool 80%	5min
Desidratar em álcool 90%	5min
Desidratar em álcool 100%	5min
Clarificar em xilol I	15min
Clarificar em xilol II	15min
Clarificar xilol III	15min
Montar em <i>Entellan</i>	

MIGUEL, Fúlvio Borges, *Avaliação do potencial osteogênico de matrizes tridimensionais colagênicas aniônicas, reticuladas ou não em glutaraldeído, na regeneração de defeitos críticos, em calvária de rato*. 2008, 158f. Tese (Doutorado em Patologia Humana), Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia/Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador.

Autorizo a reprodução, parcial ou total, deste trabalho para fins de comutação bibliográfica.

Salvador, 10 de junho de 2008.

Fúlvio Borges Miguel