

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Matrizes de colágeno aniônico: eficácia e aspectos
biológicos no reparo de defeitos ósseos.

Lenaldo Branco Rocha

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto – USP para obtenção do título
de Doutor em Ciências Médicas. Área de
concentração: Patologia – Opção: Patologia
Experimental

Ribeirão Preto

São Paulo - Brasil

2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Matrizes de colágeno aniônico: eficácia e aspectos
biológicos no reparo de defeitos ósseos.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto – USP para obtenção do título
de Doutor em Ciências Médicas. Área de
concentração: Patologia – Opção: Patologia
Experimental

Aluno: Lenaldo Branco Rocha

Orientador: Prof. Dr. Marcos A. Rossi

Ribeirão Preto

São Paulo - Brasil

2005

Trabalho realizado no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP com apoio financeiro da CAPES (Bolsa de Doutorado em 2001) e da FAPESP (Processos 01/05634-0, 01/08438-8 e 01/14059-0)

“Remember, it’s supposed to be fun.”

Comentário sobre ciência do físico Richard P. Feynman, Prêmio Nobel de Física em 1965, para o físico, e então aluno seu, Leonard Mlodinow.

“Think simple.”

Lembrete na lousa de discussão de experimentos do laboratório do Prof. Federick Grinnell do Departamento de Biologia Celular do Southwestern Medical Center – University of Texas.

Dedico esse trabalho...

Aos meus pais, **Floriano** e **Eunice**, e aos meus irmãos **Leandro** e **Fabiano**.

À minha esposa, **Juliana**.

Sem o amor, carinho e apoio deles a minha jornada teria sido solitária e um fardo impossível de carregar.

Agradecimentos

Ao **Prof. Dr. Marcos A. Rossi**, meu orientador e amigo, por me manter no caminho certo e sempre me lembrar que isso deve ser divertido.

Ao **Prof. Dr. Gilberto Goissis e sua equipe**, pelo preparo das amostras das matrizes de colágeno aniônico usadas neste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Konradin Metze e ao Dr. Randall Luis Adam**, do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP e ao **Prof. Dr. Neucimar Jerônimo Leite** do Departamento de Sistemas de Informação do Instituto de Computação da UNICAMP, por terem realizado a análise de textura de imagens que tanto enriqueceu esse trabalho.

Às técnicas **Lígia Santoro, Maria Elena Riul e Mônica Azevedo de Abreu**, pela ajuda no processamento do material e execução dos protocolos experimentais; e principalmente pela enorme paciência.

À técnica **Maria Paula Montiani Scandar**, pelos esforços e conselhos na execução das histoenzimologias.

À técnica **Adriana Luísa Gonçalves de Almeida**, pelos conselhos sobre o processamento de tecido ósseo não descalcificado.

Às minhas amigas de laboratório, **Cibele Maria Prado, Mara Rúbia Celes, Gisele Faria, Andiará de Rossi, Érica Carolina Campos e Karina Magalhães Alves da Mata** pelo convívio e discussões, mais frutíferas do que elas possam imaginar.

À **Profa. Dra. Simone Gusmão Ramos e sua equipe**, a técnica **Elaine Medeiros Floriano** e os pós-graduandos **Cristina Tonin Beneli, Priscila Freitas Barbosa e Daniel Henrique Gonçalves**, pela amizade durante todos esses anos.

À CPG-Patologia, em especial o seu antigo coordenador, o **Prof. Dr. Luís César Peres**, pelo apoio nesses anos de estudos.

Às funcionárias do biotério **Maria Aparecida Caetano Apolinário e Ivone Paula da Silva**, pelos cuidados com animais utilizados neste trabalho.

Às secretárias **Neide Terezinha Gonçalves, Regina Mara C. F. Bueno e Rosângela Castania N. Paiva e todo corpo de funcionários do Departamento de Patologia**, pela amizade e apoio ao longo desses anos.

Aos meus sogros, o **Prof. Dr. Roberto Passetto Falcão e a Dra. Anita Pfrimer Falcão**, e aos meus cunhados **Andréia, Alexandre e Carolina**, por serem o ponto de referência familiar aqui em Ribeirão Preto.

À você que, devido à minha memória quase senil, esqueci de citar o seu nome aqui, o meu muito obrigado.

Sumário

1.	Introdução	1
2.	Objetivos	12
2.1.	Objetivo geral	12
2.2.	Objetivos específicos	12
3.	Materiais e Métodos	13
3.1.	Preparo das matrizes de colágeno polianiónico	13
3.2.	Animais e grupos experimentais	13
3.3.	Procedimento cirúrgico	14
3.4.	Análise radiográfica	15
3.5.	Análise histológica	16
3.6.	Análise de dimensão fractal e entropia	17
3.7.	Histoenzimologia para fosfatase alcalina e fosfatase ácida	18
3.8.	Microscopia óptica de alta resolução	19
3.9.	Microscopia eletrônica de transmissão	20
3.10.	Imunoistoquímica	20
4.	Resultados	22
4.1.	Eficácia das matrizes de colágeno aniônico na regeneração de defeitos ósseos de tamanho crítico	22
4.2.	Incorporação de matrizes de colágeno aniônico à matriz extracelular do tecido ósseo	37
4.3.	Matrizes de colágeno aniônico propiciam um ambiente favorável para células osteogênicas	43
5.	Discussão	46
6.	Conclusões	57
7.	Resumo	58
8.	Abstract	60
9.	Bibliografia	62
10.	Anexo	78

1. Introdução

Uma das características únicas do tecido ósseo é a sua capacidade de recuperação à agressão. Após uma injúria, para que ocorra a recuperação da integridade estrutural e/ou da anatomia normal, são reativados mecanismos funcionais durante a morfogênese das estruturas ósseas do esqueleto. Dessa maneira, o reparo do tecido ósseo pode ser descrito como um processo regenerativo, no qual novo tecido é formado seguindo a programação genética que originou o osso e não pela reposição da área por tecido cicatricial ou expansão clonal do tecido adulto. Histologicamente, esse processo possui grande semelhança morfológica com a ossificação endocondral observada no embrião [1,2], tendo como característica mais marcante o arcabouço cartilaginoso, originado da condensação de células mesenquimais, formado no sítio de reparo de ossos de origem endocondral antes do início da ossificação [3,4]. Isso não se limita à morfologia do processo de reparo, muitos dos genes que regulam a esqueletogênese e o crescimento ósseo são reativados durante o reparo ósseo [4,5]. O conjunto de genes reativados incluem fatores de transcrição reguladores da diferenciação condroblástica e osteoblástica como o *indian hedgehog* (*ihh*) e o *core binding factor-1* (*cbfa-1*), assim como genes relacionados à revascularização e remodelação da matriz extracelular [4,5].

Contudo, mesmo com tal aparato celular e molecular disponível para a recuperação do tecido ósseo, um certo número de vezes esse mecanismo falha e causa transtornos estéticos e funcionais para os indivíduos afetados. Alguns fatores podem ser decisivos para esse desfecho, especialmente nos casos envolvendo trauma, como por exemplo, idade e condição geral de saúde do paciente, localização anatômica do defeito ou fratura, presença de infecção, tamanho do defeito, mobilidade de fragmentos ósseos, etc. Outros quadros clínicos envolvem não a falha do

mecanismo do processo de reparo, mas a ocorrência de uma lesão e/ou doença cuja progressão leve à destruição de uma estrutura óssea envolvida, situação normalmente observada na ocorrência de “tumores” ou cistos intra ou justa-ósseos; algumas doenças infecciosas, como a periodondite, também estão envolvidas no surgimento de defeitos ósseos. Menos comuns são os defeitos congênitos decorrentes da má formação óssea na vida intra-uterina. Para se obter a regeneração de um defeito ósseo a conduta clínica a ser tomada é eliminar, quando possível, os fatores envolvidos com o aparecimento do defeito e favorecer a osteogênese no interior do defeito. Dada a característica localizada dos defeitos ósseos, o favorecimento da osteogênese é obtido com uso de medidas locais, essencialmente o uso de enxertos ósseos e biomateriais adequados para esse uso.

Independente de sua origem e/ou concepção, existem duas propriedades básicas que os enxertos e biomateriais usados no tratamento ósseo podem apresentar: a osteocondução e a osteoindução. A osteocondução é a capacidade que um biomaterial tem de atuar como suporte para o crescimento de novo tecido ósseo [6,7]. A osteoindução é a propriedade que algumas proteínas têm de induzir a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em células osteogênicas [8]. Células da linhagem osteogênicas também podem ser associadas a biomateriais para otimizar a formação de novo tecido ósseo [9,10]. Apesar desses conceitos definirem eventos aparentemente distintos, a correta aplicação deles está relacionada à seleção de materiais que apresentem uma combinação de fatores que induzam uma resposta ótima, do ponto de vista biológico, mecânico e químico, do tecido receptor do enxerto.

Atualmente o enxerto mais utilizado é o enxerto ósseo autógeno, seguido de enxertos sintéticos e uma pequena porcentagem de osso alógeno, de acordo com levantamento recente

realizado em hospitais japoneses [11]. Nos Estados Unidos cerca de 400.000 procedimentos hospitalares de enxertia óssea são realizados anualmente, aproximadamente um terço são autógenos de crista ilíaca, enquanto os demais de outros locais ou de osso homólogo preservado [12]. Embora não exista estatística disponível no Brasil acerca do uso de enxertos ósseos, a situação em nosso país não deve ser muito diferente da descrita pelos japoneses. Entretanto, se considerarmos nichos específicos de uso de enxertos, como cirurgias odontológicas ambulatoriais, é provável que o uso de substitutos sintéticos apresente uma maior porcentagem de uso.

A preferência pelo emprego do osso autógeno ocorre devido às suas excelentes propriedades biológicas. As células osteogênicas presentes no enxerto atuam imediatamente no sítio de reparo contribuindo para a aceleração do processo regenerativo [13,14]. Há evidência de que, à medida que o enxerto é reabsorvido, fatores osteoindutores são liberados, recrutando e induzindo a diferenciação de osteoblastos e células mesenquimais indiferenciadas [15,16]. Ademais, parte do enxerto pode permanecer viável, contribuindo estruturalmente para a recuperação do defeito [17,18]. O osso autógeno também atua como substrato osteocondutor para o processo regenerativo [19,20], além de oferecer suporte mecânico direto para a estrutura óssea danificada [21], contribuindo para uma rápida recuperação funcional. O osso autógeno apresenta baixo risco de resposta adversa pelo receptor e o risco de transmissão de doenças ao paciente pode ser considerado nulo se manipulado corretamente. Contudo, o osso autógeno está disponível em quantidades limitadas, sendo, algumas vezes, necessário submeter o paciente a mais de uma intervenção cirúrgica. Outro grande inconveniente no uso desses enxertos é o aumento da morbidade e risco cirúrgico devido à necessidade de pelo menos um sítio operatório adicional para a colheita do enxerto [22-24].

Um substituto ao enxerto autógeno comumente utilizado é o osso preservado, seja de origem humana ou animal. Além de suas propriedades osteocondutoras, utilizando-se protocolos de processamento adequados, podem reter moléculas bioativas com potencial osteoindutor [25,26]. Mas esses enxertos também podem apresentar complicações sérias, como fraturas, infecções e formação de seqüestro ósseo [27]. Uma das grandes desvantagens do seu uso é o risco de transmissão de doenças, e, portanto, a necessidade de uma infra-estrutura para se processar e testar a segurança desse tipo de enxerto [28], aumentando o custo do tratamento e limitando a sua utilização a centros devidamente equipados.

Nos últimos 40 anos diversos biomateriais têm sido desenvolvidos com o objetivo de suplantiar essas limitações inerentes aos principais enxertos utilizados no tratamento de defeitos ósseos. As primeiras tentativas de se utilizar materiais como substitutos temporários do tecido ósseo foram feitas nos anos 20 [29]. Biomateriais específicos para serem usados em defeitos ósseos apareceram somente nos anos 60 e 70 [30]. Inicialmente, os biomateriais deveriam possuir “uma combinação adequada de propriedades físicas para serem iguais às do tecido sendo repostado com uma resposta tóxica mínima por parte do recipiente” [31]. O paradigma na época é que eles deveriam ser “inertes”, não induzindo reações adversas, principalmente a resposta imune no local de implantação [30]. Nesse período surgiram materiais como os cimentos de polimetilmetacrilato e as primeiras cerâmicas e materiais à base de fosfato de cálcio [29] usados em uma gama diversa de aplicações como cirurgias odontológicas, ortopedia, reconstruções cranianas, etc [29].

Atualmente a lista de biomateriais utilizados e/ou propostos para o tratamento de defeitos ósseos é longa e cresce continuamente. Contudo, alguns dos mais estudados são os baseados em

silicato, os baseados em sais de cálcio (fosfato, sulfato e carbonato), o poli-metilmetacrilato, os poliésteres, os poli-anidridos, as poliuretanas, etc. Todos são considerados potencialmente úteis [32-34] e possuem propriedades que indiquem o seu uso no tratamento de defeitos ósseos; porém, nenhum está isento de limitações e falhas que possam contra-indicar o seu uso. Normalmente isso está ligado ao tempo de reabsorção desses materiais, usualmente imprevisível e de difícil controle, além de muitos biomateriais não serem reabsorvíveis [35-39]. Os produtos de degradação podem ter um efeito local deletério, como os ácidos produzidos pela hidrólise de poliésteres [40-42], principalmente por prolongar a resposta inflamatória. A resistência mecânica que os biomateriais possuem também é fator limitante importante na aplicação no tratamento de defeitos ósseos [7,43]. Mesmo características topográficas dos biomateriais podem influenciar o processo de reparo ósseo, podendo, por exemplo, inibir ou estimular a proliferação dos osteoblastos [44].

São as limitações dos enxertos disponíveis que mantêm ativos os esforços de aperfeiçoamento dos materiais existentes e o contínuo desenvolvimento de novas opções. O objetivo final desses esforços é encontrar um material ou conjunto de materiais que possam ser usados de maneira segura, previsível e eficiente permitindo a plena recuperação estética e funcional de pacientes com defeitos ósseos.

Um material que tem sido amplamente usado em diversas aplicações biomédicas é o colágeno tipo I [45]. Essa proteína é a mais abundante presente nos animais vertebrados, correspondendo no tecido ósseo a cerca de 85-90% da porção orgânica. A estrutura do colágeno tipo I é uma tripla hélice de polipeptídeos cuja seqüência de aminoácidos consiste da repetição do grupo GLY-X-Y [46]. No microscópio eletrônico as fibras do colágeno tipo I apresentam em

periodicidade característica conhecida como período D, cujo comprimento varia de 55-67 nm dependendo do tecido analisado e do processamento ao qual foi submetido [47]. O período D possui duas regiões distintas, o *gap*, com cerca de 40 nm, correspondendo ao espaço que existe entre as extremidades das moléculas de tropocolágeno, e o *overlap*, onde há a sobreposição de duas moléculas adjacentes [48-50].

As funções fisiológicas do colágeno tipo I no tecido ósseo, tais como suporte e atividade reguladora de diversas funções celulares dos osteoblastos [51-54] e a regulação do processo de biomineralização [55-57], fazem dessa proteína uma matéria-prima atraente para a produção de biomateriais voltados para o tratamento de defeitos ósseos. Ademais, o colágeno tipo I possui estrutura química extremamente conservada entre diferentes espécies de animais, permitindo o uso de colágeno xenógeno de forma segura [58,59], com casos esporádicos de reação adversa relatados [60,61]. Uma vez implantado, o colágeno tipo I possui efeito hemostático local e é degradável e removível pelas vias metabólicas fisiológicas. Além do mais, o colágeno tipo I pode ser facilmente manipulado em diferentes formas [62], o que permite projetar estruturas otimizadas para uma aplicação definida.

O uso do colágeno tipo I como biomaterial para regeneração óssea têm sido proposto na sua forma nativa [63,64], apesar de relatos considerando-o, isoladamente, um material osteocondutor ineficiente [65]. Combinações com outros materiais têm sido propostas para se otimizar as propriedades biológicas de ambos materiais utilizados no compósito preparado. A combinação com fosfato de cálcio ou hidroxiapatita pode melhorar as propriedades mecânicas do conjunto [66,67], permitindo a utilização em sítios cuja função possua demanda mecânica grande. Potencialização da migração celular, por exemplo, pode ser obtida com a combinação do

hialuronato com o colágeno [68,69], o que permite uma rápida recuperação de defeitos ósseos [70]. Algumas modificações na estrutura do colágeno que são descritas como melhorias nas suas propriedades como biomaterial são as ligações cruzadas [71,72], a esterificação [73], a incorporação de grupos acil [74], a desaminação do grupo ϵ -amino da lisina [75], o bloqueio dos grupos guanidina dos resíduos de arginina [75] e a remoção de grupos amidas [76,77]. Contudo, nenhum desses materiais foi avaliado para uso no tratamento de defeitos ósseos.

Uma modificação na estrutura do colágeno de grande interesse para o tratamento de defeitos ósseos é a hidrólise de grupos carboxiamidas através de um tratamento alcalino [49,78,79]. Essa técnica, de baixo custo, pode ser aplicada diretamente a uma fonte colágeno, como o pericárdio ou tendão bovinos, não requerendo prévio isolamento dessa proteína. Células presentes nessas fontes de colágeno são eliminadas com o tratamento alcalino [80,81], evitando reação imune contra as matrizes preparadas. A hidrólise dos grupos carboxiamidas resulta em grupos carboxílicos que em pH fisiológico possuem carga elétrica negativa [78,79]. Dada a possibilidade de se controlar o tempo de reação é possível controlar o número de cargas negativas adicionadas até o máximo de cerca de 134 grupos carboxílicos a mais por molécula de colágeno [78]. A presença de cargas elétricas negativas adicionais faz com que o colágeno aniônico apresente propriedades físico-químicas que podem atuar como promotoras da osteogênese: o colágeno torna-se altamente piezelétrico [82], com aumento da eletro-negatividade [83,84] e do número de grupos funcionais para adesão celular através de integrinas [85]. O efeito piezelétrico ocorre devido à distribuição heterogênea que as novas cargas elétricas possuem, localizando-se principalmente nas extremidades do período D das fibras colágenas [49,79,84]. Essa assimetria na distribuição de cargas é que está associada à propriedade piezelétrica de um material [86].

Materiais carregados eletricamente não estão entre os mais estudados como substitutos de enxertos ósseos, constituindo um grupo muito pequeno dentro do universo de biomateriais. Nem todos também possuem um claro potencial terapêutico. Além disso, não existe uma clara concordância sobre que tipo de carga elétrica, positiva ou negativa, teria efeito positivo sobre o processo de reparo ósseo. Por exemplo, encontrou-se [87] uma diferença de adesão de células de ovário de hamster sobre dois materiais com cargas elétricas negativas, o ácido acrílico e a N,N-dimetil aminopropil acrilamida: na primeira, poucas células aderiram, e na outra, muitas células aderiram, comportamento atribuído à diferenças dos grupos funcionais presentes no substrato. Resposta semelhante foi obtida em um estudo com resinas Amberlite com diferentes perfis de carga elétrica e grupos funcionais quando implantadas no subperiósteo de calotas cranianas de embriões de rato mantidas *in vitro* [88]. Curiosamente, foi observado que resinas com grupos carboxílicos inibem a migração de osteoblastos. Numa série de estudos com hidroxiapatitas polarizadas [89-91] mostrou-se que superfícies com cargas elétricas negativas favorecem a adesão celular, a atividade osteoblástica e a osteointegração. Todavia, o provável mecanismo envolvido nas propriedades superiores da hidroxiapatita eletronegativa envolve a formação de uma camada semelhante à apatita pela nucleação de íons cálcio diretamente sobre a superfície do material [90].

O efeito de cargas elétricas superficiais sobre células pode ir além da questão da adesão celular. Células derivadas de medula óssea cultivadas em substrato neutro e substratos carregados positiva e negativamente, revelaram que o substrato positivo estimulava a adesão celular, porém inibia a formação de prolongamentos celulares e a diferenciação celular, além de diminuir a atividade da fosfatase alcalina e a síntese da osteopontina [92], indicando um possível efeito de cargas superficiais na função e diferenciação celular.

O uso de forças eletromagnéticas no tratamento de defeitos ósseos não está limitado à cargas elétricas superficiais, mas também à aplicação direta de campos eletromagnéticos para estimulação da osteogênese [93,94]. Isso levou ao uso de correntes elétricas exógenas de baixa intensidade para o estímulo da osteogênese por meio de eletrodos em fraturas não unidas [95,96]. Quando utilizada dessa maneira, há um consenso de que o estímulo da osteogênese está associado à cargas elétricas negativas [94,97,98]. Essa proposta terapêutica tem se mostrado eficaz como tem demonstrado diversos estudos experimentais [94,97,98]. Contudo a maneira clássica de se fazer o estímulo elétrico envolve procedimentos de implantação e posterior remoção de eletrodos, além do uso de uma fonte de energia elétrica, o que envolve procedimentos cirúrgicos e clínicos que criam custos e dificuldades operacionais que limitam o uso desse procedimento.

Materiais piezelétricos oferecem um grande vantagem sobre os aparelhos externos pois geram correntes elétricas de maneira espontânea ao serem deformados mecanicamente [99]. Alguns materiais preparados na forma de filmes para fixação, envolvendo o sítio de reparo ósseo, foram descritos como eficazes no estímulo da osteogênese [100-103]. Porém esses filmes não reabsorvíveis, o que constitui limitação ao uso devido à necessidade de se realizar nova cirurgia para a remoção dos filmes.

O colágeno aniônico e o polilactato são os únicos materiais descritos na literatura que são piezelétricos e reabsorvíveis, apesar do polilactato só ser piezelétrico quando preparado com as suas cadeias orientadas [99], o que constitui uma limitação técnica em comparação com colágeno aniônico.

Estudos preliminares demonstraram que as matrizes de colágeno aniônico possuem excelente resposta biológica na regeneração óssea. Na forma de membranas para regeneração

óssea guiada, o colágeno aniônico demonstrou ser capaz de isolar lesões periodontais evitando a migração de tecido epitelial e conjuntivo para o interior do defeito e permitindo a recuperação dos defeitos [104]. Para o preenchimento de defeitos ósseos, o único estudo realizado até o momento foi desenvolvido em nosso laboratório e utilizou como modelo experimental a indução de defeito em tibia de rato, defeito esse capaz de se regenerar espontaneamente [81]. Demonstrou-se que as matrizes constituem suporte eficiente para a osteogênese, visto que praticamente não houve atraso no processo de regeneração óssea comparando-se os grupos experimentais com o controle [81]. As matrizes de colágeno aniônico também são capazes de suportar a osteogênese quando implantadas sobre superfícies ósseas íntegras [105], podendo vir a ser de grande utilidade como enxertos *onlay*, comumente utilizados em cirurgias para ganho de volume ósseo na odontologia e em cirurgias estéticas da face. Nesse mesmo estudo fez-se interessante observação acerca da osteogênese na presença de matrizes de colágeno aniônico: a neoformação óssea ocorrendo a partir de focos coalescentes de ossificação no interior da matriz [105]. Em ambos estudos foi observada a ausência de frentes de reabsorção das matrizes, levantando-se a hipótese de que o colágeno aniônico seria, pelo menos em parte, incorporado à estrutura da matriz extracelular do tecido ósseo neoformado. O quadro inflamatório observado foi também de baixa intensidade. Paralelamente, estudos *in vitro* demonstraram que o colágeno aniônico favorece a adesão celular [85,106] e estimula a produção de fosfatase alcalina por células osteoblásticas [106].

Observando o conjunto de resultados obtidos com as matrizes de colágeno aniônico vê-se que elas parecem constituir substrato adequado para a osteogênese. Com base nesses estudos buscamos determinar se as matrizes de colágeno aniônico são capazes de atuar eficientemente como material osteocondutor em defeitos ósseos incapazes de regenerar espontaneamente.

Também investigamos se, pelo menos em parte, a matriz avaliada está sendo incorporada à estrutura da matriz extracelular mineralizada do tecido ósseo, atuando desse modo como uma verdadeira matriz provisória. E, por fim, avaliamos o perfil de expressão de fatores de crescimento favoráveis à osteogênese associado à presença de uma das matrizes de colágeno polianiónico.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Analisar o processo de reparo ósseo de defeitos ósseos de tamanho crítico na presença de matrizes de colágeno aniônico com diferentes densidades de carga elétricas negativas utilizando como modelo experimental defeito ósseo produzido cirurgicamente em calota craniana de ratos.

2.2. Objetivos específicos

- 1- Avaliar a eficácia de matrizes de colágeno aniônico como materiais osteocondutores para regeneração de defeitos ósseos de tamanho crítico;
- 2- Determinar se, pelo menos em parte, as matrizes de colágeno aniônico estão sendo incorporadas à matriz extracelular do tecido ósseo neoformado;
- 3- Investigar a relação de fatores de crescimento ligados ao processo de osteogênese com a estrutura das matrizes de colágeno aniônico.

3. Materiais e Métodos

3.1. Preparo das matrizes de colágeno polianiônico

As matrizes foram preparadas pelo Prof. Dr. Gilberto Goissis no Departamento de Química e Física Molecular do Instituto de Química de São Carlos – USP. As matrizes foram preparadas a partir de pericárdio bovino fresco selecionado originalmente para confecção de próteses valvares cardíacas. As amostras de pericárdio foram tratadas por 24, 36 e 48 horas com uma solução alcalina (3 mL/g) contendo dimetil-sulfóxido 6%, sais (cloreto 3,0 M e sulfato 0,9 M) de metais alcalinos (K^+ 1,2 M e Na^+ 2,0 M) e alcalino terrosos (Ca^{++} 0,91 M) a 20°C. O material resultante foi equilibrado em uma solução (6 mL/g) contendo sais (cloreto 0,13 M e sulfato 0,17 M) de metais alcalinos (K^+ 0,13 M e Na^+ 0,7 M) e alcalino terrosos (Ca^{++} 0,7 M) por 12 horas. Os sais presentes nos materiais resultantes foram removidos através de lavagens sucessivas em ácido bórico 3% (3x2h), água deionizada (3X6h), EDTA 0,3% pH11 (3x2h) e, finalmente, água deionizada (6x2h). As matrizes foram liofilizadas e mantidas em embalagens assépticas. A partir desse ponto as matrizes serão denominadas de acordo com o tempo de tratamento inicial: BP24 (24 horas), BP36 (36 horas) e BP48 (48 horas). Antes do procedimento de implantação nos defeitos ósseos as matrizes foram cortadas em discos de 4mm de diâmetro com auxílio de um *punch* para pele e rehidratadas em solução salina fisiológica estéril por 24 horas.

3.2. Animais e grupos experimentais

As amostras de matrizes de colágeno polianiônico foram implantadas na calota craniana de ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar com peso entre 280 e 300 gramas. Esses animais foram obtidos no Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da USP. Após o procedimento

cirúrgico, os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Patologia da FMRP-USP em gaiolas individuais na primeira semana pós-operatório. Após esse período foram mantidos em grupos de até 3 animais em gaiolas de tamanho apropriado. Durante todo tempo os animais tiveram livre acesso à água e à ração para roedores. Foram seguidas as recomendações do Comitê de Ética no Uso de Animais em Experimentação da FMRP-USP.

Cada animal recebeu implantes das matrizes BP24 e BP48 nos ossos parietais esquerdo e direito, respectivamente, ou a matriz BP36 no parietal direito, enquanto no esquerdo o defeito criado foi deixado vazio (controle). Os animais foram sacrificados 3, 7, 15, 30, 60 dias e 1 ano após o implante, quando os ossos parietais foram removidos e processados (n=8).

3.3. Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina (74 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg) aplicados na face ventral da coxa direita. Procedeu-se, então, a tricotomia do escalpe e limpeza da pele com solução alcoólica de iodo. Foi realizada uma incisão de cerca de 2 centímetros sobre a linha sagital mediana diretamente sobre a calota craniana incluindo, num só golpe, a pele e o periósteo. O periósteo foi descolado de maneira a expor totalmente os ossos parietais. A craniotomia foi realizada sob irrigação constante com solução salina estéril usando-se trefina de 4mm de diâmetro montada em contra-ângulo odontológico e motor elétrico para implantodontia operando a 1000 RPM. O defeito foi feito no meio de cada osso parietal, de modo a não envolver as suturas cranianas. Extremo cuidado foi tomado para se evitar qualquer dano às meninges. Fragmentos gerados no sítio foram removidos com irrigação vigorosa com salina estéril e curetagem delicada da bordas do defeito ósseo. A seguir, as matrizes foram posicionadas nos defeitos ósseos conforme esquema acima descrito. Para finalizar, o periósteo foi

reposicionado passivamente e a pele suturada com fio de seda 3-0. Cada animal recebeu uma única dose (0,1 mL/Kg) de Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte (Fort Dodge Ltda, Campinas, SP, Brasil).

Após os períodos acima especificados, os animais foram sacrificados com inalação de atmosfera saturada com CO₂. A calota craniana foi novamente exposta com incisão envolvendo somente a pele. Toda estrutura óssea do epicrânio foi removida (ossos parietais, temporais, frontais e occipital) com sua cobertura de tecido mole (periósteo e músculos) usando-se uma tesoura para fio de aço. Depois de removidos os parietais foram separados mantendo-se, contudo, o periósteo em posição para evitar deslocamento das matrizes. Para fixação das peças foi utilizado o formol tamponado a 10%, pH 7,4, à temperatura ambiente ou o PLP (paraformaldeído a 2%, lisina 0,075M e periodato de sódio 0,01M) [107] a 4°C por 24 horas, para processamento para microscopia óptica. Para microscopia eletrônica de transmissão as peças foram fixadas na mistura de glutaraldeído a 2%/ paraformaldeído a 2% em tampão cacodilato 0,1M com sacarose 8% por 1 hora a 4°C.

3.4. Análise radiográfica

Foram radiografados os parietais controles e os que receberam uma das três matrizes e colhidos 3, 7, 15, 30 e 60 dias pós-operatório. As radiografias foram realizadas em um aparelho de mamografia Senographe DMR (General Electric, Milwaukee, WI, USA) com ajuste padronizado: 30kV, 5mA, tempo de exposição de 4,5s, distância do cabeçote do aparelho ao filme 66cm, alvo e filtro de molibdênio. As peças ósseas foram organizadas sobre filmes radiográficos de 18x24 cm. Devido à distorção anódica presente nesse tipo de aparelho, cada peça foi radiografada duas vezes, alterando sua posição 180° na área exposta aos raios-X. Assim,

foram obtidas duas radiografias de cada parietal, uma mais exposta que outra, permitindo uma análise densitométrica posterior sem viés. As radiografias foram fotografadas e os negativos digitalizados utilizando um escâner SprintScan 45 (Polaroid Corp, Cambridge, MA, USA). A densidade óssea na área dos defeitos foi medida utilizando o programa NIH Image 1.62 (programa de domínio público disponível na internet em <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>). A medida foi realizada selecionando a área do defeito com um círculo de 4mm de diâmetro e obtendo uma medida em escala de cinza. A escala de cinza utilizada foi invertida: sendo 0 equivalente ao preto (radiolucência absoluta) e 255 ao branco (radiopacidade absoluta).

Os dados densitométricos foram analisados com o programa de análise estatística Prism 4.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA). Os dados foram analisados como duas medidas replicadas. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão. A diferença estatística foi determinada utilizando análise de variância de um critério (*one-way ANOVA*) seguido pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni. Foram consideradas significantes as diferenças com valor de $p < 0,05$.

3.5. Análise histológica

Parietais fixados em formol a 10% foram descalcificados com ácido tricloroacético a 10% por 18 horas, seguido de neutralização do ácido com sulfato de sódio a 5% por 15 min, desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados e incluídos em parafina. Também foram processados dessa maneira os grupos coletados 1 ano após a implantação das matrizes. Cortes seriados de 5 μ m de espessura foram corados com hematoxilina e eosina ou resorcina-fucsina de Weigert para evidenciação de fibras elásticas. A avaliação dos cortes corados

foram feitos em um microscópio Leica DMR (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Alemanha).

3.6. Análise de dimensão fractal e entropia

Foram obtidas 30 imagens da área de reparo de 3 parietais diferentes de cada grupo experimental, utilizando-se uma câmera digital Leica DC300F (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Heerbrugg, Alemanha). Também foram digitalizadas imagens do tecido ósseo normal adjacente aos defeitos para uso como controle da organização tecidual. Metade das imagens foram obtidas de lâminas coradas com hematoxilina e eosina em campo claro; a outra metade foi obtida da autofluorescência dos mesmos campos com o microscópio em modo de epifluorescência com o filtro de banda larga para fluoresceína. Essas imagens foram salvas no formato *bitmap* do Windows, extensão .BMP, sem compressão, e modo de cor RGB. Posteriormente as imagens foram convertidas para escala de cinza com valores de luminosidade entre 0 e 255.

As imagens de campo claro foram utilizadas para as análises matemáticas e as imagens obtidas da epifluorescência foram utilizadas para efeito comparativo com os gráficos obtidos devido ao destaque que é dado à organização da matriz extracelular nessas imagens.

A complexidade das imagens foi obtida calculando a dimensão fractal [108]. No nosso caso, o cálculo foi feito a partir da imagem pseudo-3D, na qual o eixo Z corresponde aos graus de luminosidade entre 0 e 255, obtida de cada fotomicrografia digital. Dessa forma foram avaliadas a complexidade do arranjo dos *pixels* das imagens e a complexidade dos graus de cinza (luminosidade) das imagens.

As diferenças de luminosidade nas imagens também foram avaliadas determinando a entropia de Shannon dos histogramas das imagens. Com isso avaliamos a presença de diferentes graus de cinza nas imagens: imagens com todas as tonalidades presentes têm valores altos enquanto imagens com pouca variação de tons têm valores baixos.

As relações entre a dimensão fractal e o tempo de regeneração dos defeitos ósseos foram estudados através de regressões matemáticas (*curve fitting*), comparando modelos lineares, hiperbólicos, exponenciais e curvas de potência. Foi escolhido o modelo com a maior proximidade aos dados originais (método do maior r^2). A estabilidade do modelo escolhido foi testada com o método de *bootstrap resampling* com substituição. Nesse procedimento criamos por sorteio com reposição, a partir dos dados originais, 100 novos conjuntos de imagens, nos quais um determinado número presente no conjunto original pode ser representado uma ou várias vezes, ou, nenhuma vez..

Como controle foram utilizadas imagens do tecido ósseo da calota craniana adjacente aos defeitos. Os valores obtidos foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste comparação múltipla de Duncan.

3.7. Histoenzimologia para fosfatase alcalina e fosfatase ácida

Para estudo de atividade das fosfatases foram utilizadas peças ósseas fixadas com PLP. Após a fixação, as peças foram descalcificadas com EDTA-G [109] e processadas rotineiramente para inclusão em parafina. A exceção foi o uso de parafina de baixo ponto de fusão (Paraplast X-tra) e o uso de estufa a vácuo a 54°C. Antes de realizar as reações, os cortes foram desparafinizados e reidratados.

Para detectar a atividade da fosfatase alcalina os cortes foram incubados *overnight* com cloreto de magnésio a 1% em tampão tris-maleato 0,1M, pH 8,5. A seguir, os cortes foram incubados por duas horas em uma solução contendo naphthol AS-MX fosfato sal di-sódico (Sigma-Aldrich), 5 mg, N,N-dimetilformamida, 0,25 ml, fast blue BB (Sigma-Aldrich), 30 mg, água destilada, 25 ml, tampão tris-maleato 0,1M, pH8,5, 25 ml , e duas gotas de sulfato de magnésio a 10%. Após esse período os cortes foram lavados em água corrente por 15 minutos, contra-corados com safranina-O por um minuto e lavados novamente. Antes de serem montados com meio de montagem aquoso (gel de glicerol de Kaiser) os cortes foram secados à temperatura ambiente por 24 horas.

Na reação para detecção da atividade da fosfatase ácida resistente ao tartarato foi utilizado semelhante ao protocolo descrito para a fosfatase alcalina com as seguintes modificações: tampão tris-maleato pH 5, fast blue BB foi substituído pelo fast red ITR e foi adicionado tartarato de sódio 0,1M à solução incubadora.

3.8. Microscopia óptica de alta resolução

Amostras da matriz BP36 colhidas 15 dias após a implantação foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (50%, 70%, 90%, 95% e 100%) e incluídas em Historesin Plus (Leica Instrument Gmbh, Heidelberg, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante da resina, essas amostras não foram descalcificadas. Cortes de 1 μm de espessura foram obtidos utilizando-se navalhas de vidro. Os cortes foram corados com azul de toluidina, lavados e secados em platina aquecida a 60°C. A lamínula foi montada com água apenas no momento de observação das lâminas no microscópio, sendo removidas após o uso, devido à rápida remoção do azul de toluidina.

3.9. Microscopia eletrônica de transmissão

Amostras das 3 matrizes de colágeno aniônico foram processadas para análise ao microscópio eletrônico de transmissão. Também foram processadas amostras descalcificadas com EDTA do grupo controle e amostras não descalcificadas do grupo BP36 colhidas 15 dias após implantação. Os fragmentos de tecido foram fixados por 1h a 4°C com glutaraldeído a 2,5%/paraformaldeído a 2% com glicose a 5% em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,4. Após a fixação, quando necessário o tecido ósseo foi descalcificado, lavado em tampão cacodilato, pós-fixado com tetróxido de ósmio a 1%, desidratado em concentrações crescentes de acetona e incluídas em resina Spurr (EMS, Hatfield, PA, EUA). Cortes finos foram corados com ácido fosfotúngstico e analisados em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM109 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) operado à 80kV.

3.10. Imunoistoquímica

Foram utilizados anticorpos primários contra os fatores de crescimento IGF-I (*Insulin-like growth factor-I*), BMP2/4 (*Bone morphogenetic protein 2 e 4*), PDGF-A (Fator de crescimento derivado de plaquetas-a), PDGF-B (Fator de crescimento derivado de plaquetas-b), TGF- β (*Transforming growth factor- β*) e o VEGF (Fator de crescimento do endotélio vascular) (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz CA, USA), e o marcador de macrófagos ED-1 (Serotec Ltd, Oxford, UK). A técnica imunoistoquímica utilizada foi a imunoperoxidase. Resumidamente, após desparafinização, os cortes foram incubados em tripsina a 0,25% por 15 min à temperatura ambiente para recuperação de sítios antigênicos. Seguiu-se, após lavagem com solução salina tamponada com fosfato (PBS), incubação com peróxido de hidrogênio a 3% por 20 min, para depletar a peroxidase endógena, nova lavagem e incubação com albumina de soro bovino (BSA)

1%/Glicina 0,1M por 30 min, para bloquear pontos de ligação inespecíficas do anticorpo. Os anticorpos primários, diluídos na concentração 1:100 em BSA 1%, foram incubados *overnight* à temperatura de 4°C. Os anticorpos secundários biotinilados, específicos contra a espécie no qual foi produzido o primário, foram diluídos na concentração de 1:200 e incubados à temperatura ambiente por 1 hora. Logo após serem lavados, os cortes foram incubados com conjugado avidina-biotina-peroxidase por 30 min. Por fim, a reação foi revelada incubando-se com diaminobenzidina até a formação de uma coloração de tonalidade marrom. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Mayer e a lamínula montada com Permount.

4. Resultados

4.1. Eficácia das matrizes de colágeno aniônico na regeneração de defeitos ósseos de tamanho crítico

A avaliação radiográfica foi a primeira realizada com a intenção de determinar se as matrizes de colágeno aniônico seriam capazes de atuar como suporte para osteogênese em defeitos ósseos de tamanho crítico permitindo a total regeneração dos defeitos. Os períodos avaliados foram 3, 7, 15, 30 e 60 dias. Foram radiografados tanto parietais do grupo controle quanto dos três grupos que receberam uma das matrizes (n=5). Fotografias representativas das radiografias estão apresentadas na Figura 1 e os valores de densidade óssea na Figura 2.

Nos dias 3, 7 e 15 não houve diferença significativa entre o aspecto radiográfico dos grupos controle e experimentais. De maneira geral todas as radiografias referentes a esses períodos podem ser descritas como uma área circular radiolúcida com os bordos bem definidos. Algumas variações observadas foram pequenas áreas radiopacas próximas à borda dos defeitos controles a partir do dia 7. Nos grupos BP24 e BP48 haviam em alguns animais áreas de radiopacidade difusa no interior do defeito. Contudo essas variações não resultaram em diferenças significativas nos valores da densidade óssea.

No dia 30 pós-operatório houve um aumento significativo na radiopacidade média dos grupos experimentais em relação aos períodos anteriores e ao grupo controle. Nos grupos BP36 e BP48 havia áreas radiolúcidas entremeio a áreas radiopacas. Contudo apenas no grupo BP48 isso refletiu numa menor densidade óssea média. O grupo controle não apresentou variação no valor densitométrico em relação ao dia 15, e seu aspecto continuou uma área circular radiolúcida com

pequenas áreas radiopacas na periferia. O parâmetro para considerar uma região radiolúcida nos grupos experimentais foi a radiolucidez observada no grupo controle.

Por fim, 60 dias pós-operatório os defeitos dos grupos experimentais apresentavam-se como uma área radiopaca, com poucas e discretas áreas radiolúcidas. O grupo BP48 é o que apresentava áreas de radiolucidez mais extensas, resultando em densidade óssea média menor que os grupos experimentais BP24 e BP36.

Após a análise radiográfica todas as peças acima citadas foram processadas para análise histológica. Também foram avaliadas histologicamente peças colhidas 365 dias (1 ano) pós-operatório, tanto do grupo controle quanto dos grupos experimentais.

A evolução histológica do grupo controle (Figura 3) revelou a presença predominante de tecido conjuntivo fibroso no interior dos defeitos ósseos criados. Esse tecido apresentou maior celularidade nos períodos iniciais, principalmente 3, 7 e 15 dias. Áreas de neoformação óssea eram limitadas à periferia dos defeitos, em contato com os bordos da estrutura óssea original.

Nos grupos experimentais (Figuras 4-6) observamos que nos dias 3 e 7 pós-operatório a estrutura espongiiforme das matrizes estava íntegra. No dia 3, apenas hemácias e alguns leucócitos foram observados no interior das matrizes. Sete dias após a cirurgia o mesmo conjunto de células podia ser observado, além de raras células mesenquimais em áreas superficiais das matrizes.

Após 15 dias de implantação todas as matrizes de colágeno encontravam-se extensamente colonizadas por células osteogênicas e vasos sangüíneos de pequeno calibre. Diversos osteoblastos podiam ser vistos em contato com estrutura das matrizes. A estrutura espongiiforme das matrizes ainda era identificável, todavia tecido osteóide pôde ser identificado.

Com 30 dias o tecido ósseo neoformado ocupava grandes porções do interior das matrizes de colágeno aniônico. O aspecto histológico do tecido era o mesmo para as três matrizes: um tecido ósseo pouco maduro rico em osteócitos. A matriz extracelular possuía um aspecto irregular, algumas vezes semelhante à organização do colágeno implantado.

Aos 60 dias o primeiro aspecto que chama a atenção é o volume de tecido ósseo presente no interior das matrizes, em especial as matrizes BP24 e BP36: por vezes, toda a extensão onde deveria estar uma dessas matrizes estava totalmente tomada por osso. Nas porções mais externas, esse osso possuía aspecto bem maduro com presença de lamelas e um número menor de osteócitos. Em regiões mais profundas o quadro histológico era semelhante ao observado aos 30 dias. A matriz BP48 ainda persistia em diversas áreas, apesar do aspecto bem maduro do tecido ósseo neoformado no seu interior.

Um ano pós-operatório os defeitos que receberam as matrizes estavam totalmente preenchidos por tecido ósseo de aspecto compacto com algumas áreas de medula óssea hematopoiética com alguns adipócitos. Resíduos das matrizes implantadas eram raros e ocupavam áreas muito pequenas no interior do osso. Persistia em porções da matriz extracelular do tecido ósseo o aspecto semelhante à matriz implantada.

A pergunta seguinte a ser respondida foi: Como evoluiu a organização da matriz extracelular do tecido ósseo nos defeitos que receberam as matrizes de colágeno aniônico? Inicialmente, avaliamos através da auto-fluorescência dos cortes corados com hematoxilina e eosina a organização da matriz extracelular dos defeitos na presença das matrizes de colágeno aniônico (Figuras 7-9). Nessa técnica a estrutura espongiforme das matrizes é evidente até o dia 15 pós-operatório. A partir do dia 30 foi possível diferenciar a estrutura do colágeno implantado

da estrutura do tecido ósseo. Contudo, em diversos pontos não havia descontinuidade entre as duas estruturas.

No dia 60 a matriz BP48 possuía osso com lamelas concêntricas no interior da área de reparo, estrutura essa só observada nos defeitos que receberam as matrizes BP24 e BP36 no período de 365 dias. Antes disso apenas lamelas longitudinais podiam ser vistas.

Quando feitas as análises matemáticas dessas imagens foi observado uma rápida diminuição tanto da entropia quanto da dimensão fractal já nos períodos iniciais, tendência que se manteve até 1 ano pós-operatório. Todas as curvas foram descritas com grande precisão por uma regressão não-linear.

Para entropia melhor aproximação foi obtida com a fórmula hiperbólica:

$$y = 1/(A + B \times x) \quad (1)$$

Com os coeficientes:

A=0,196 e B=0,000097488 para a matriz BP24;

A=0,198 e B=0,00008556 para a matriz BP36;

A=0,201 e B=0,00008516 para a matriz BP48.

Para a dimensão fractal a fórmula foi exponencial:

$$y = A \times x^B \quad (2)$$

Com os coeficientes:

A=2,50 e B=-0,01909 para a matriz BP24;

A=2,484 e B=-0,01735 para a matriz BP36;

A=2,474 e B=-0,017736 para a matriz BP48.

Em todas as regressões o valor calculado de r^2 ficou acima de 0,75.

Na análise com os 100 conjuntos obtidos com o *bootstrapping resampling* obtivemos a mesma fórmula da regressão em 98% das vezes para o grupo BP24, 93% para o grupo BP36 e 94% para o grupo BP48. A dimensão fractal dos três grupos experimentais apresentou diferença estatística com tecido ósseo controle nos três últimos períodos analisados (Figura 10).

Não houve diferença estatística nos valores da entropia.

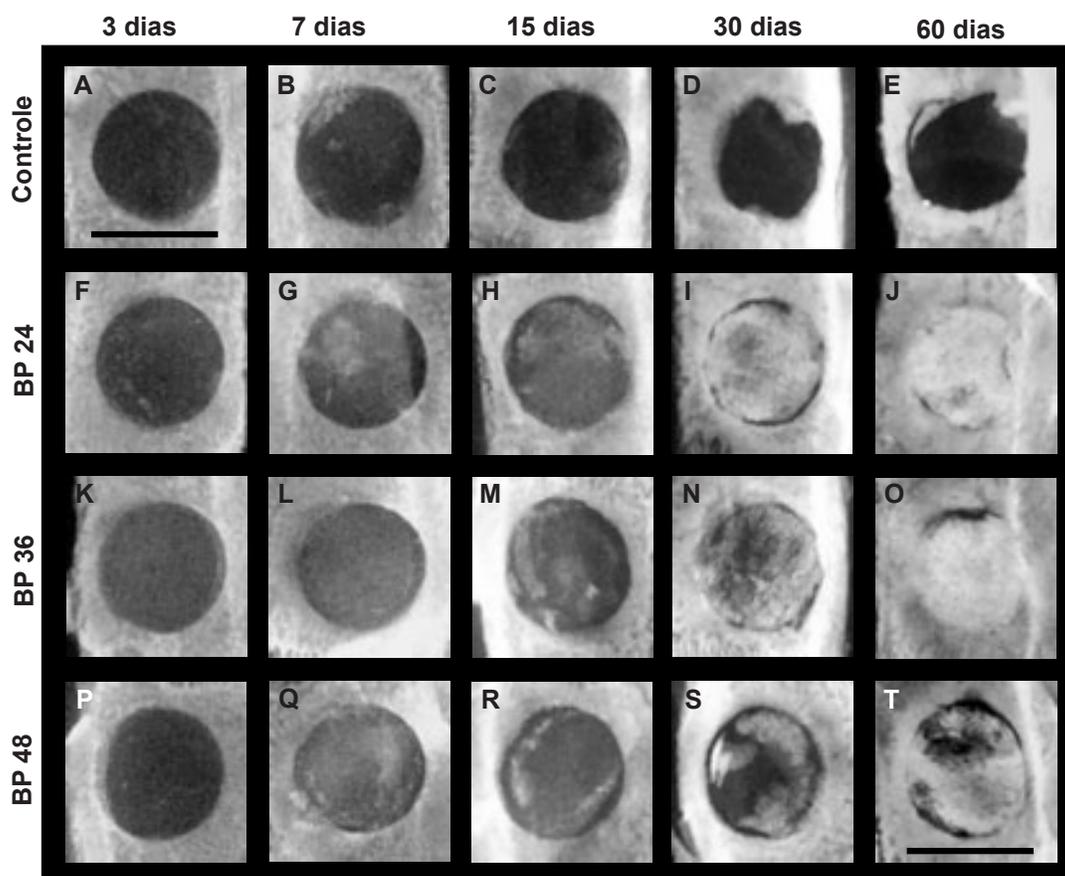


Figura 1 Fotografias representativas de radiografias mostrando a dinâmica de preenchimento dos defeitos ósseos em calota craniana na presença e ausência das matrizes de colágeno aniônico. Notar a extensiva área radiopaca no interior dos defeitos que receberam as matrizes BP24, BP36 e BP48 após 30 e 60 dias após implantação. Barra=4mm.

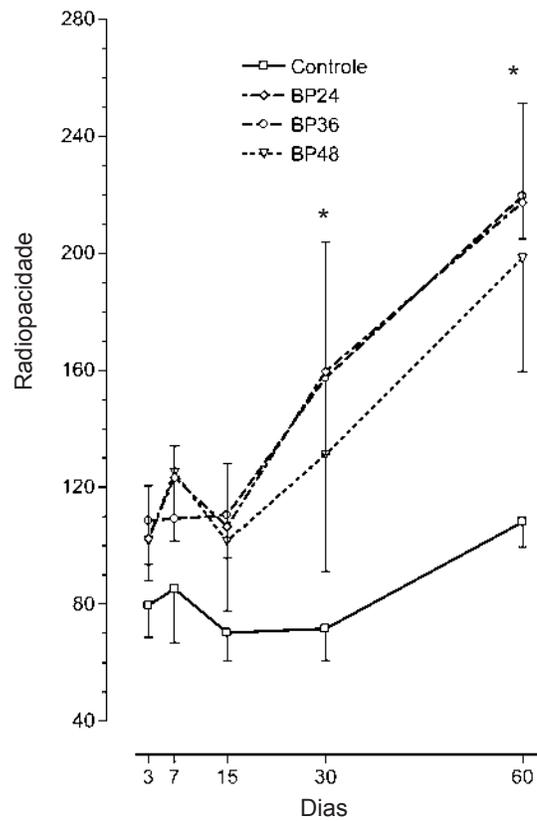


Figura 2 Variação da densidade óssea no interior dos defeitos ósseos controle e defeitos ósseos que receberam uma das três matrizes de colágeno aniônico ao longo de dois meses. Valores apresentados como média±desvio padrão (* indica $p < 0,05$ na comparação dos experimentais com o controle).

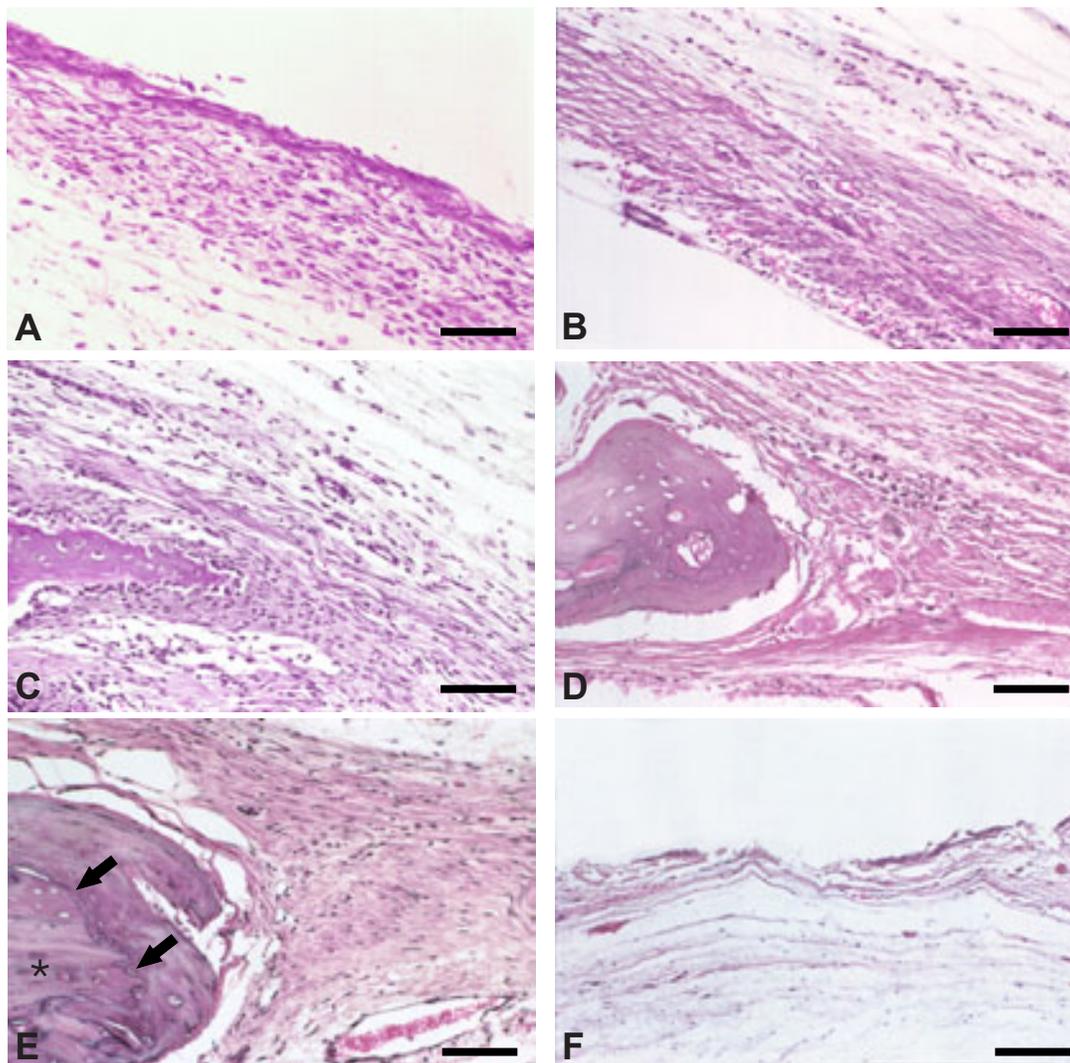


Figura 3 - Fotomicrografia dos defeitos ósseos controle (sem implante) 3(A), 7(B), 15(C), 30(D), 60(E) e 365(F) dias após cirurgia. Os defeitos foram preenchidos predominantemente por tecido conjuntivo fibroso. Áreas de neoformação óssea limitavam-se às proximidades da borda dos defeitos. Setas indicam a interface estrutura óssea original e (*) indicam tecido ósseo neoformado. Barra=25 μ m.

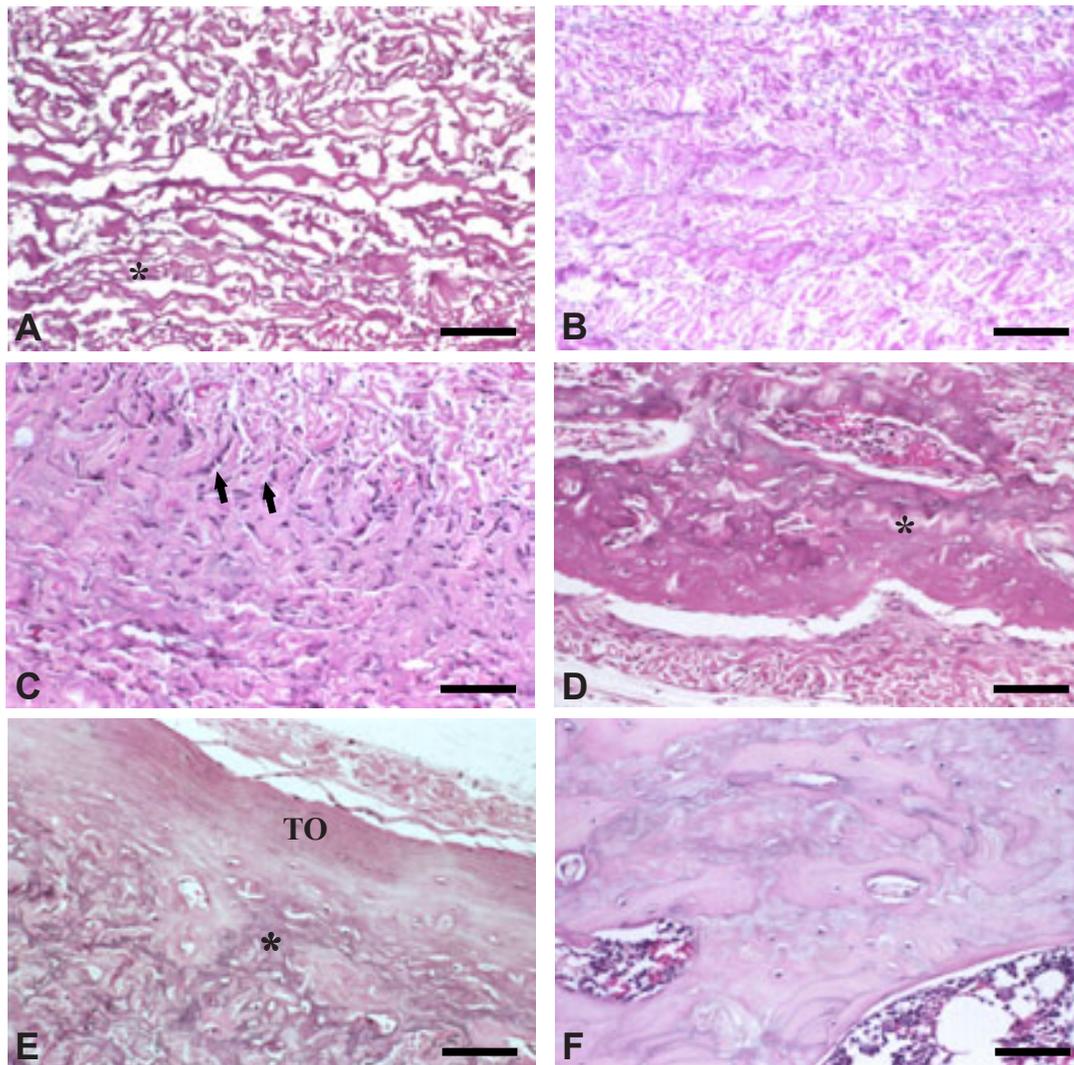


Figura 4 Fotomicrografias representativas de defeitos ósseos que receberam a matriz de colágeno aniônico BP24 e foram analisadas 3(A), 7(B), 15(C), 30(D), 60(E) e 365(F) dias após cirurgia de implantação da matriz. No dia 15 nota-se população diversa de células, inclusive osteoblastos (setas), e vasos sangüíneos no interior da matriz. Nos dias 30 e 60 há extensiva neoformação óssea no interior da matriz. Notar a semelhança da matriz extracelular do tecido ósseo em algumas áreas com a estrutura original da matriz implantada (compare * na figura A com a marcação nas figuras D e E). Tecido ósseo lamelar (TO) podia ser visto na superfície do tecido neoformado 60 dias após implantação. Barra=25µm.

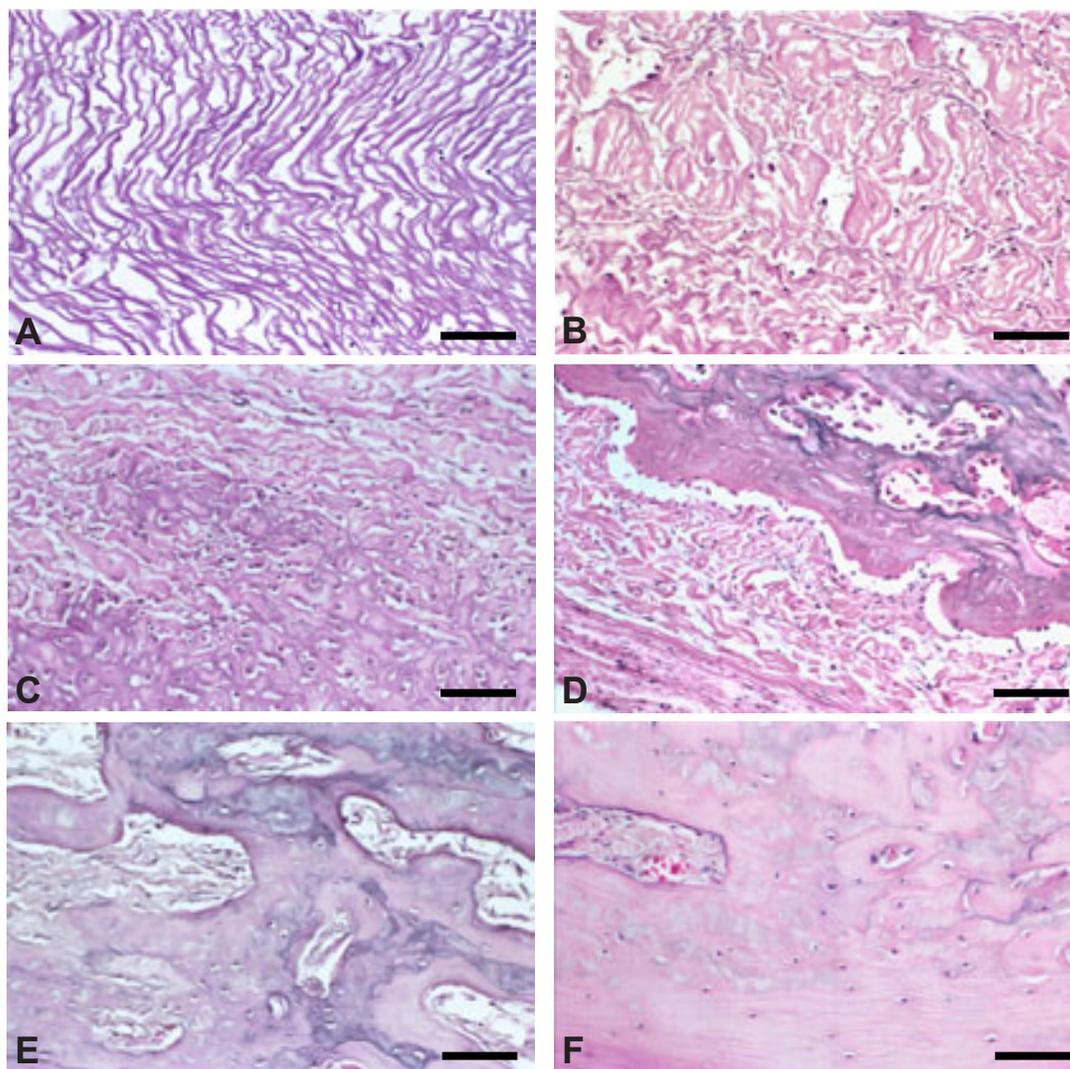


Figura 5 - Fotomicrografias representativas de defeitos ósseos que receberam a matriz de colágeno aniônico BP36 e foram analisadas 3(A), 7(B), 15(C), 30(D), 60(E) e 365(F) dias após cirurgia de implantação da matriz. Em geral o aspecto histológico é o mesmo observado na matriz BP24. Barra=25 μ m.

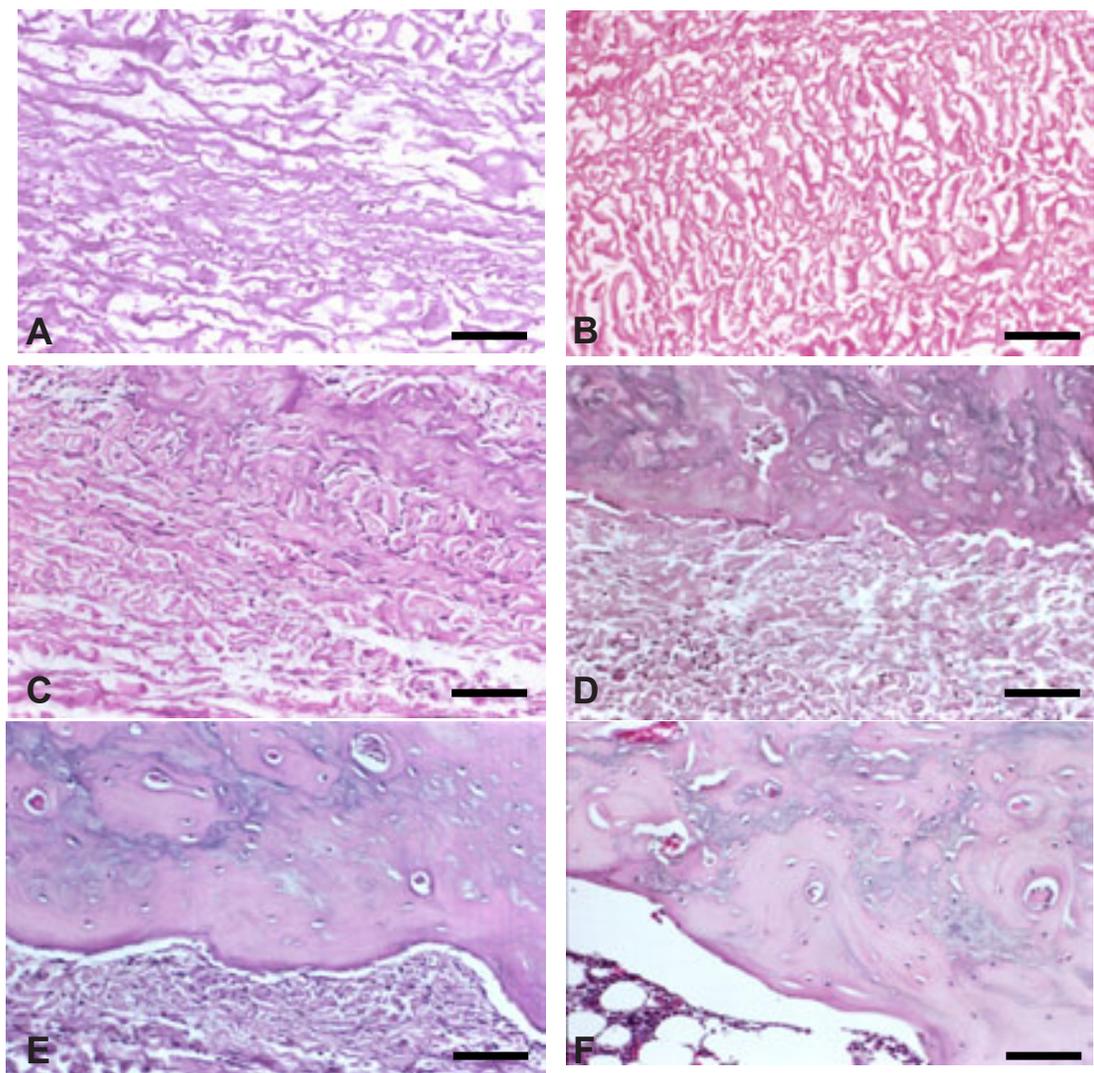


Figura 6 Fotomicrografias representativas de defeitos ósseos que receberam a matriz de colágeno aniônico BP48 e foram analisadas 3(A), 7(B), 15(C), 30(D), 60(E) e 365(F) dias após cirurgia de implantação da matriz. Em geral o aspecto histológico é o mesmo observado na matriz. Note a presença de remanescentes da matriz envolvendo tecido ósso neoformado aos 60 dias. Barra=25 μ m.

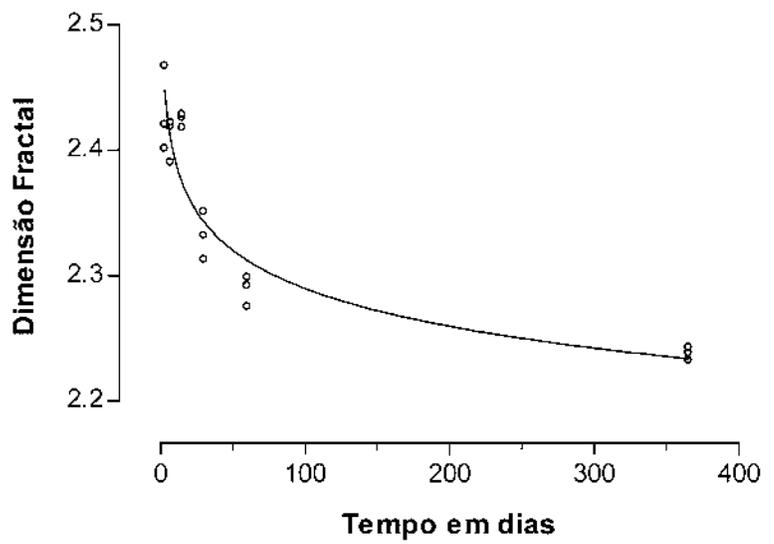
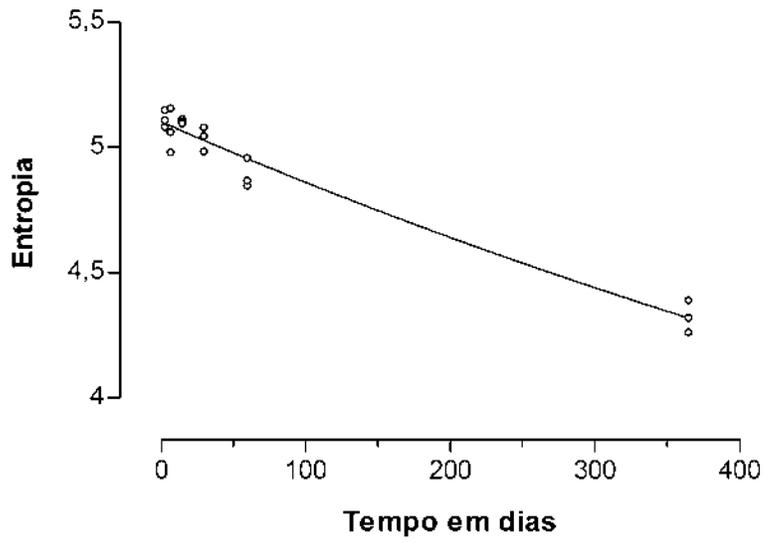
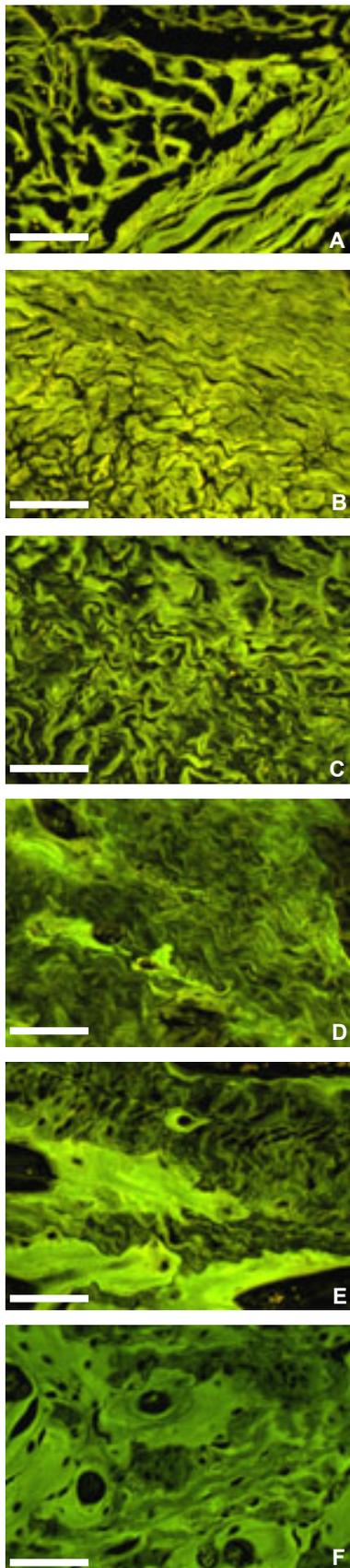


Figura 7 - Autofluorescência e gráficos de entropia e dimensão fractal da matriz BP24. As figuras correspondem a 3 (A), 7 (B), 15 (C), 30(D), 60(E) e 365(F) dias pós-implantação. Barra=40 μ m

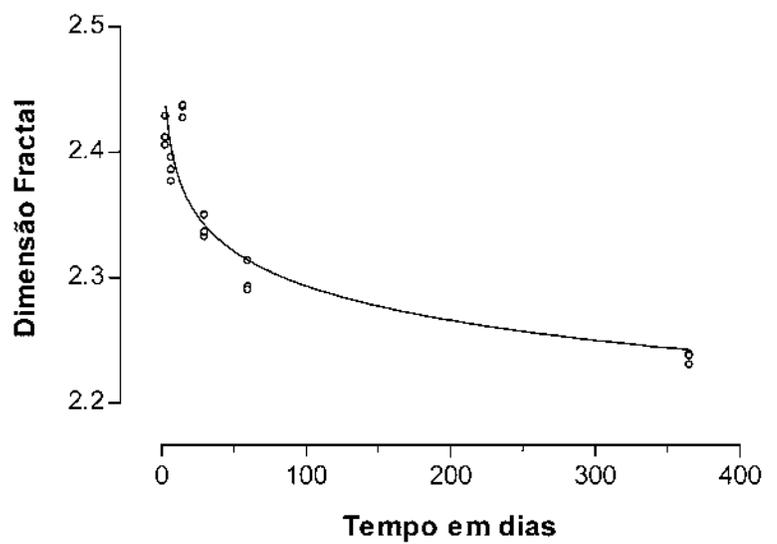
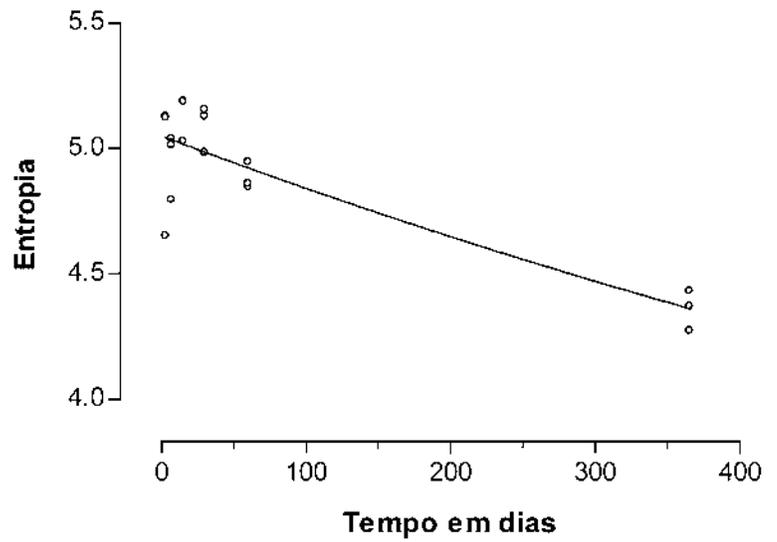
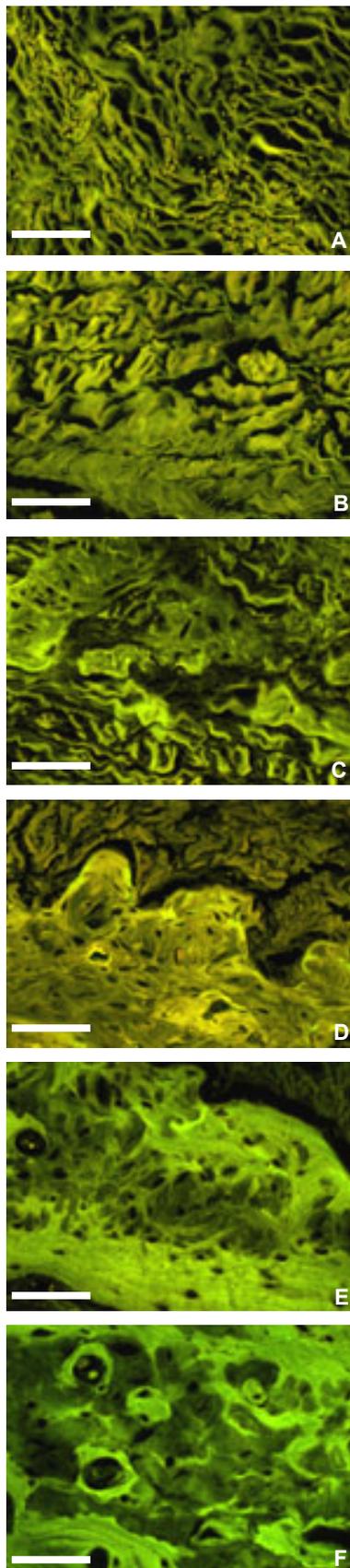


Figura 8 - Autofluorescência e gráficos de entropia e dimensão fractal da matriz BP36 As figuras correspondem a 3 (A), 7 (B), 15 (C), 30(D), 60(E) e 365(F) dias pós-implantação. Barra=40 μ m.

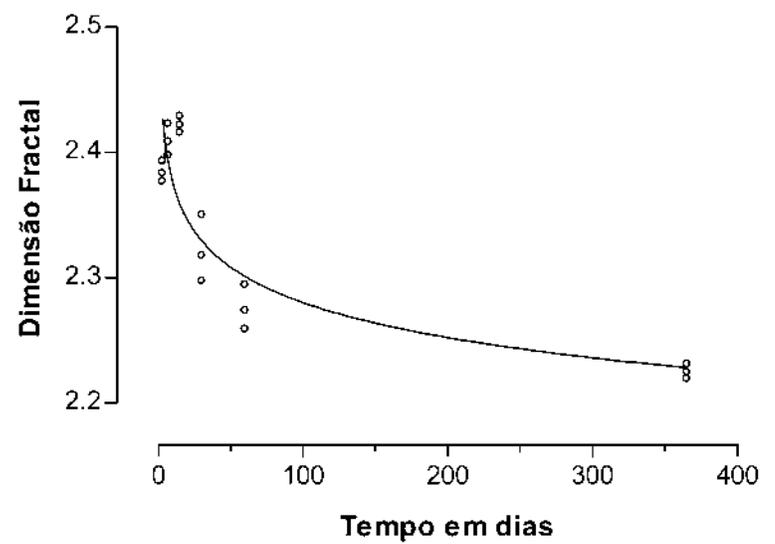
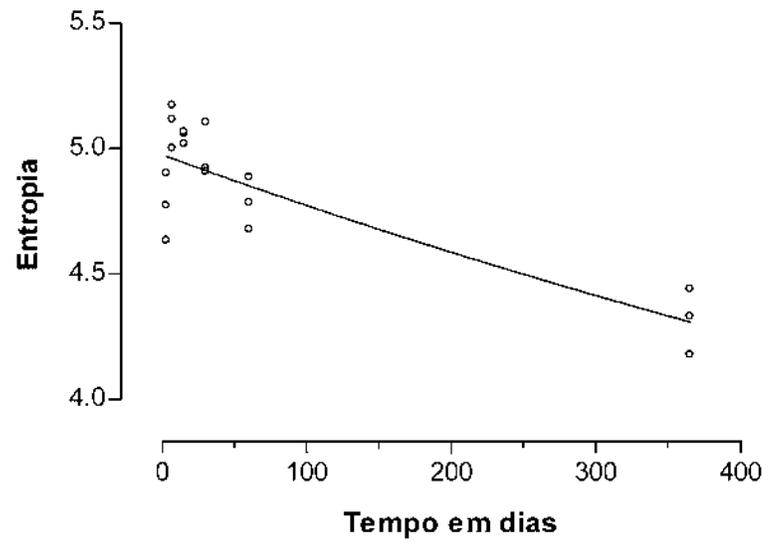
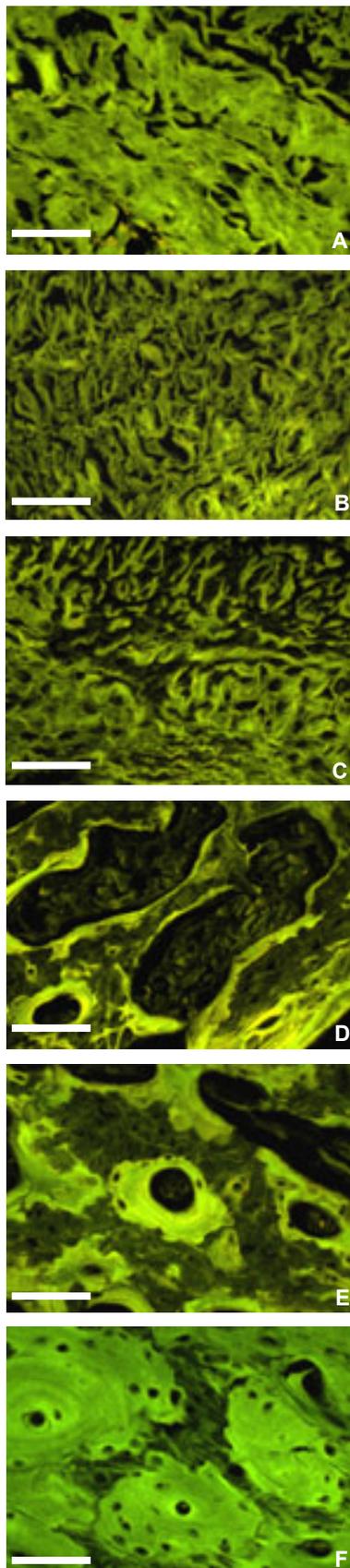


Figura 9 Autofluorescência e gráficos de entropia e dimensão fractal da matriz BP48. As figuras correspondem a 3 (A), 7 (B), 15 (C), 30(D), 60(E) e 365(F) dias pós-implantação. Barra=40 μ m.

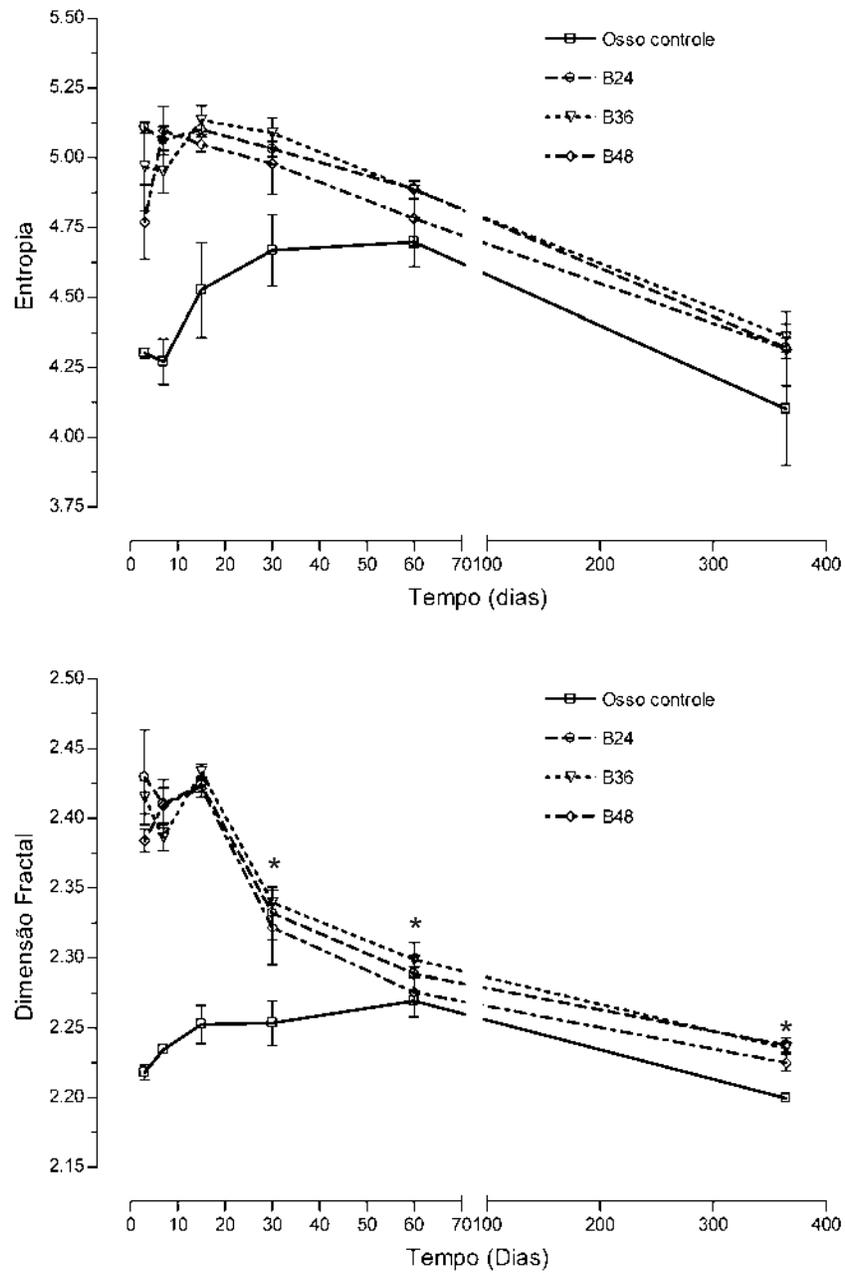


Figura 10 Gráficos comparativos da entropia e dimensão fractal dos defeitos que receberam uma das matrizes de colágeno aniônico e o osso controle. * $p < 0,005$ na comparação dos grupos experimentais com o controle.

4.2. Incorporação de matrizes de colágeno aniônico à matriz extracelular do tecido ósseo

Inicialmente foi feita avaliação do aspecto ultra-estrutural das matrizes de colágeno aniônico, comparando-as com o colágeno nativo de ratos presente em área de reparo ósseo na calota craniana.

O colágeno nativo de rato é composto por fibras bem definidas com periodicidade bem aparente, inclusive as sub-bandas dentro do período D. As matrizes de colágeno aniônico possuem uma perda da organização das fibras colágenas de acordo com o tempo de hidrólise sofrido pelo colágeno. As fibras do colágeno aniônico eram mais grossas que as do colágeno nativo, além de se notar a perda progressiva da organização do período D, especialmente nas matrizes BP36 e BP48 (Figura 11).

A seguir analisamos o aspecto ultra-estrutural do tecido ósseo imaturo formado no interior matriz BP36 após 15 dias de implantada (Figura 12). Utilizamos preparações não descalcificadas para esse fim. Foram observadas fibras colágenas compostas por fibras com aspecto ultra-estrutural semelhante ao da matriz BP36 com extensas áreas elétron-densas sobre elas. A organização dessas regiões eram compatíveis com depósitos de hidroxiapatita. Além do aspecto diferente do colágeno encontramos fibras elásticas totalmente envolvidas por áreas mineralizadas; próximo às fibras elásticas podiam ser vistas prolongamentos de osteócitos.

Como a microscopia eletrônica de transmissão só permite o estudo de áreas pequenas, realizamos a microscopia óptica de alta resolução desse mesmo material (Figura 12). O uso de secções finas de material incluído em plástico permitiram resolução adequada de detalhes estruturais. Nessa preparação verificamos a presença de tecido ósseo na forma de focos

coalescentes. Esses focos formavam-se em áreas profundas da matriz. A interface osso-matriz era composta por osteoblastos e vasos sanguíneos de pequeno calibre. Alguns dos osteoblastos encontravam-se em processo de diferenciação para osteócitos, estando mergulhados parcialmente em matriz mineralizada. Havia continuidade entre a matriz extracelular mineralizada e o colágeno implantado.

Para termos certeza que o processo de mineralização observado estaria associado à atividade osteoblástica, realizamos o ensaio de atividade de fosfatase alcalina no interior da matriz e sua relação com a matriz BP36 e a presença de células osteogênicas no interior da matriz (Figura 12). Observamos que a atividade enzimática estava associada a áreas de colonização por células osteogênicas e regiões de tecido ósseo neoformado. Em períodos curtos, como 3 e 7 dias, nos quais não encontramos células senão as do sangue, a atividade da fosfatase alcalina era limitada a áreas externas da matriz, mais precisamente no periósteo.

O passo seguinte foi verificar a participação de células fagocitárias (macrófagos, células gigantes) no processo de remodelamento e reorganização tecidual nas áreas de neoformação óssea no interior da matriz BP36 (Figura 12). A marcação para ED-1 demonstrou de pequeno número de macrófagos no interior da matriz BP36. Depois analisamos a atividade da fosfatase resistente ao tartarato. As células positivas nesse ensaio tinham forma e localização compatíveis com osteoclastos.

Finalmente rastreamos a matriz BP36 no sítio de reparo ósseo utilizando a elastina como marcador da presença do implante ao longo do processo de reparo da calota craniana (Figura 13). Nos dias 3 e 7, nos quais a estrutura da matriz estava essencialmente íntegra, pudemos observar fibras elásticas, com distribuição aleatória, distribuídas por todo interior da matriz BP36. A partir do dia 15 e nos dias 30 e 60 e após 1 ano pós-implante houve uma diminuição na quantidade de

fibras observadas embora muitas estavam mergulhadas no interior do tecido ósseo neoformado. Parte dessas fibras estavam parcialmente inseridas no tecido ósseo enquanto o restante delas estava no interior da matriz implantada.

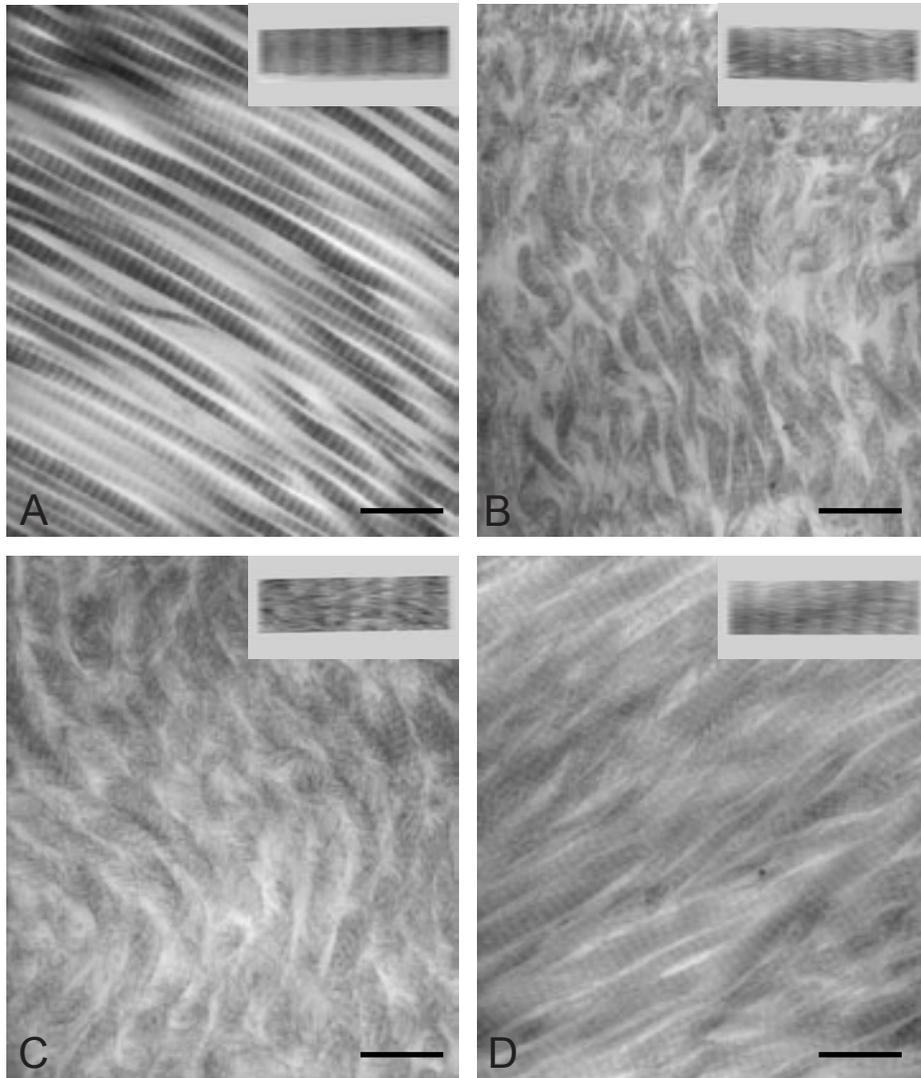


Figura 11 - Diferença no aspecto ultra-estrutural das matrizes de colágeno aniônico em relação ao colágeno nativo do tecido ósseo de rato. Colágeno nativo de rato (A), matriz BP24 (B), matriz BP36 (C) e matriz BP48 (D). Note no detalhe a perda progressiva da organização das fibras e da periodicidade do colágeno. Ácido Fosfotúngstico. Barra= 600nm.

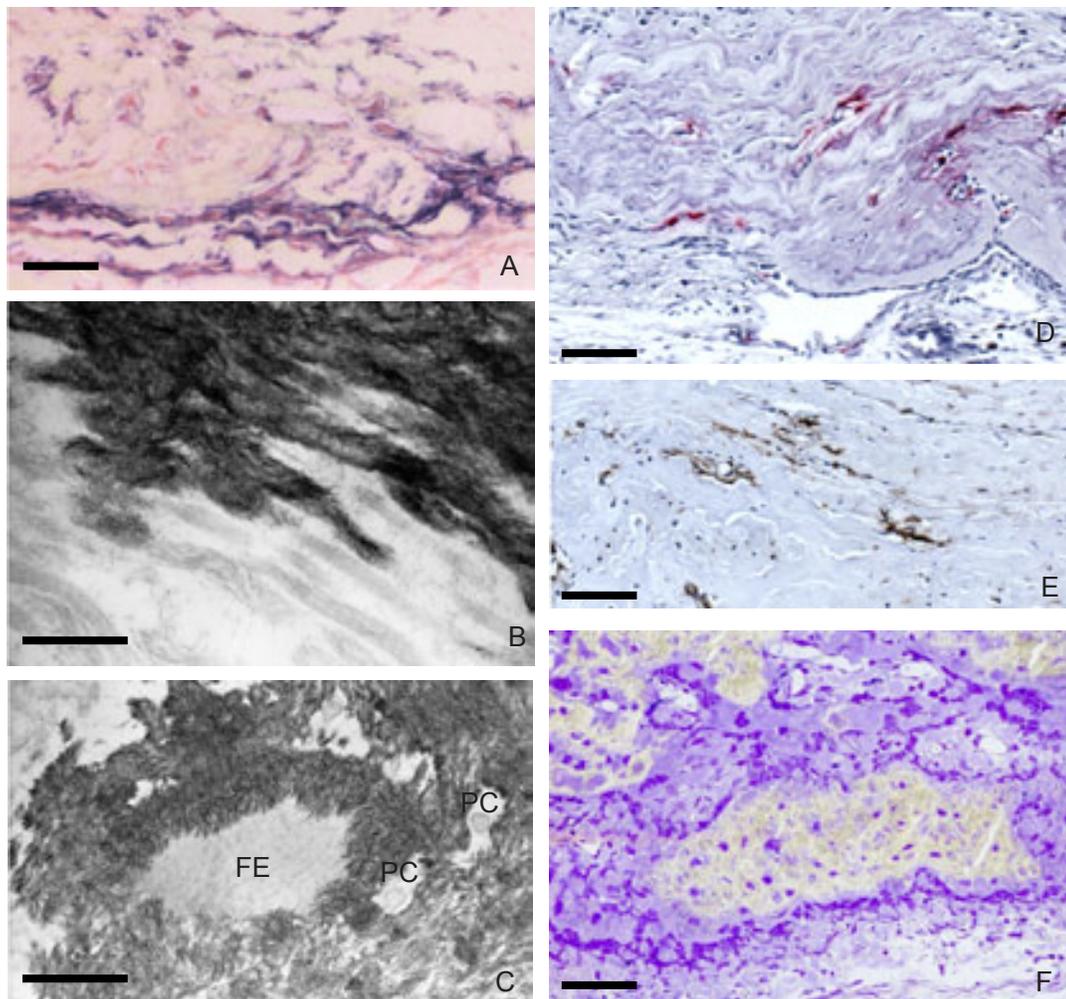


Figura 12 Incorporação da matriz de colágeno aniônico na matriz extracelular do tecido ósseo demonstrando a atividade da fosfatase alcalina (figura A, áreas em azul) no interior da matriz. As figuras B e C mostram o aspecto ultra-estrutural das áreas de mineralização da matriz BP36, note o arranjo das fibras colágenas e a presença de fibra elástica (FE) envolta por área mineralizada. Prolongamentos celulares (PC) podem ser vistas na matriz mineralizada proxima a fibras elásticas. As figuras D e E mostram, respectivamente áreas de atividade de fosfatase ácida e células marcadas positivamente para ED-1 (macrófagos). A figura F mostra um núcleo de ossificação em um corte não descalcificado; note a localização dos osteoblastos em relação à matriz e tecido ósseo. Coloração azul de toluidina. Barra em A, D, E, e F igual a 25 μ m e em B e C igual a 250nm.

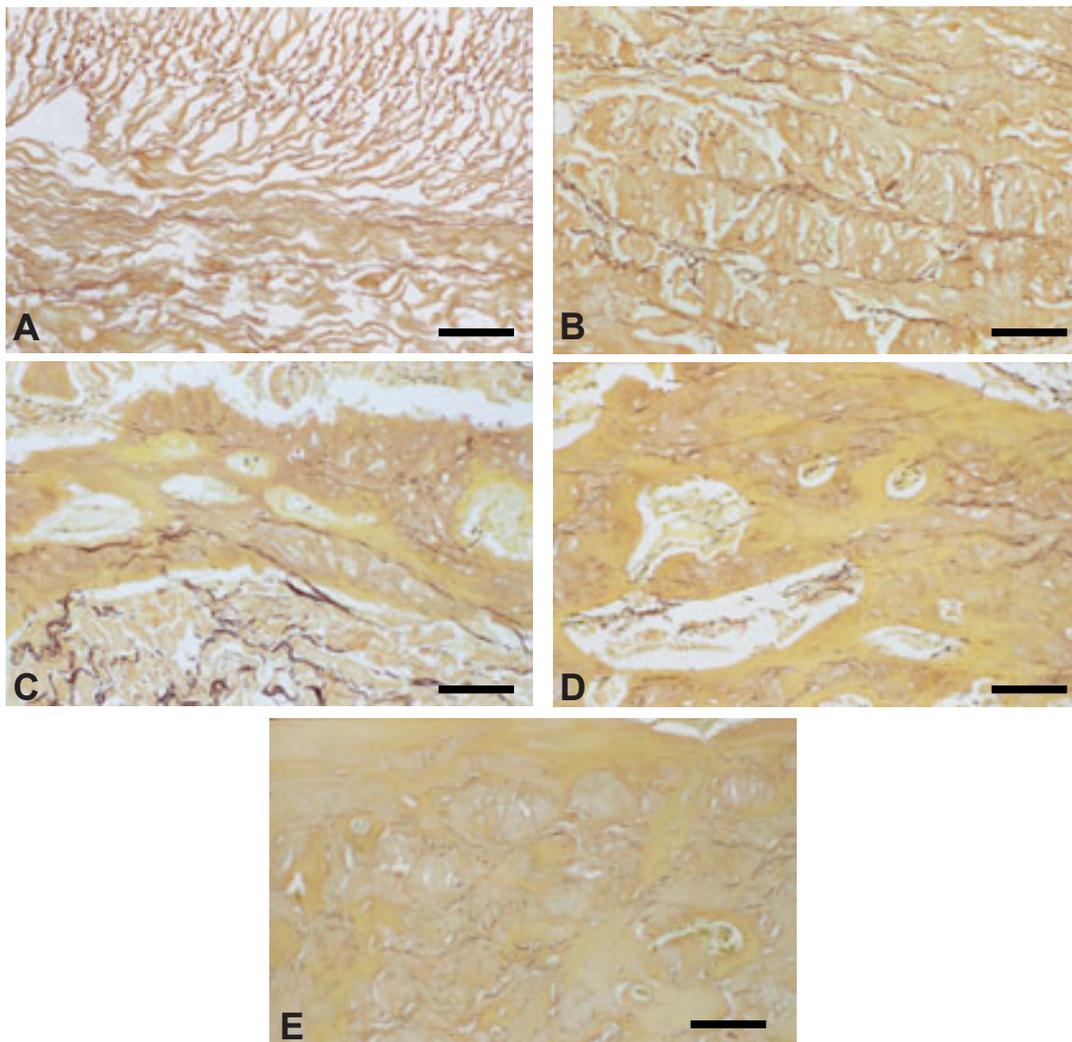


Figura 13 Rastreamento de fibra elásticas (marron escuro) presentes na matriz de colágeno aniônico BP36 na área de reparo ósseo nos dias 7(A), 15(B), 30(C), 60(D) e 365 (E) dias pós-implantação. Note que apesar da diminuição do número de fibras coradas ao longo do tempo, um grande número delas pôde ser detectada até 1 ano após a cirurgia, inclusive no interior da matriz óssea. Barra=25 μ m

4.3. Matrizes de colágeno aniônico propiciam um ambiente favorável para células osteogênicas

Os últimos experimentos feitos foram para detectar a presença dos fatores de crescimento BMP2, BMP4 e IGF-I no interior da matriz BP24 e avaliar a relação desses fatores com a estrutura de colágeno. Essas reações imunoistoquímicas foram feitas no material fixado com PLP e descalcificado com EDTA-G.

Conseguimos localizar o fator de crescimento BMP 2 e 4 nos dias 7 e 15 pós-operatório (Figura 14). As proteínas não estavam presentes ubiquamente no interior das matrizes e sim limitadas a algumas áreas. Essas áreas eram mais extensas no dia 7 do que no dia 15. A marcação obtida estava distribuída ao longo da superfície do colágeno implantado. Não foram observadas células com marcação positiva para BMP 2/4.

O fator de crescimento IGF-I foi encontrado nos dias 3, 7, 15 e 30 dias pós-operatório (Figura 15). No dia 3 a localização foi essencialmente extracelular, progredindo no dia 7 para uma marcação combinada na matriz extracelular e também intracelular. Nos dias 15 e 30 a marcação estava limitada à células osteogênicas.

Os demais fatores de crescimento analisados (PDGF-A, PDGF-B, TGF- β e o VEGF) tiveram reação negativa.

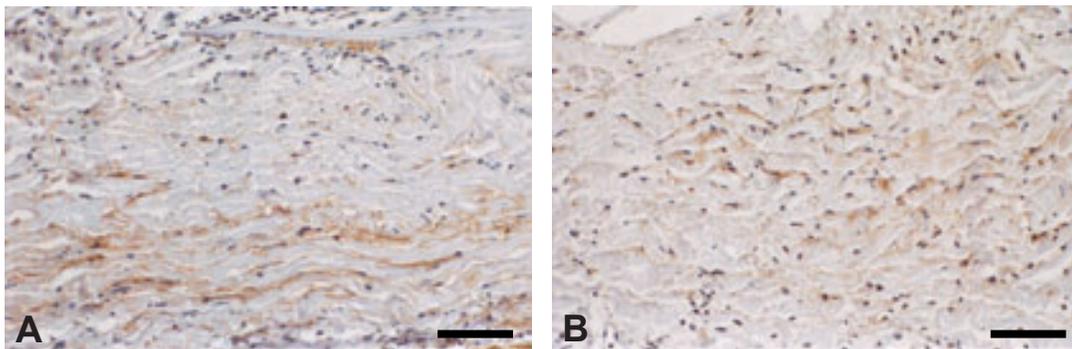


Figura 14 - Fotomicrografias representativas da reação imunohistoquímica para BMP2/4 (em marrom) 7(A) e 15(B) dias após a implantação. Note que a marcação é essencialmente extracelular. Barra=25 μ m.

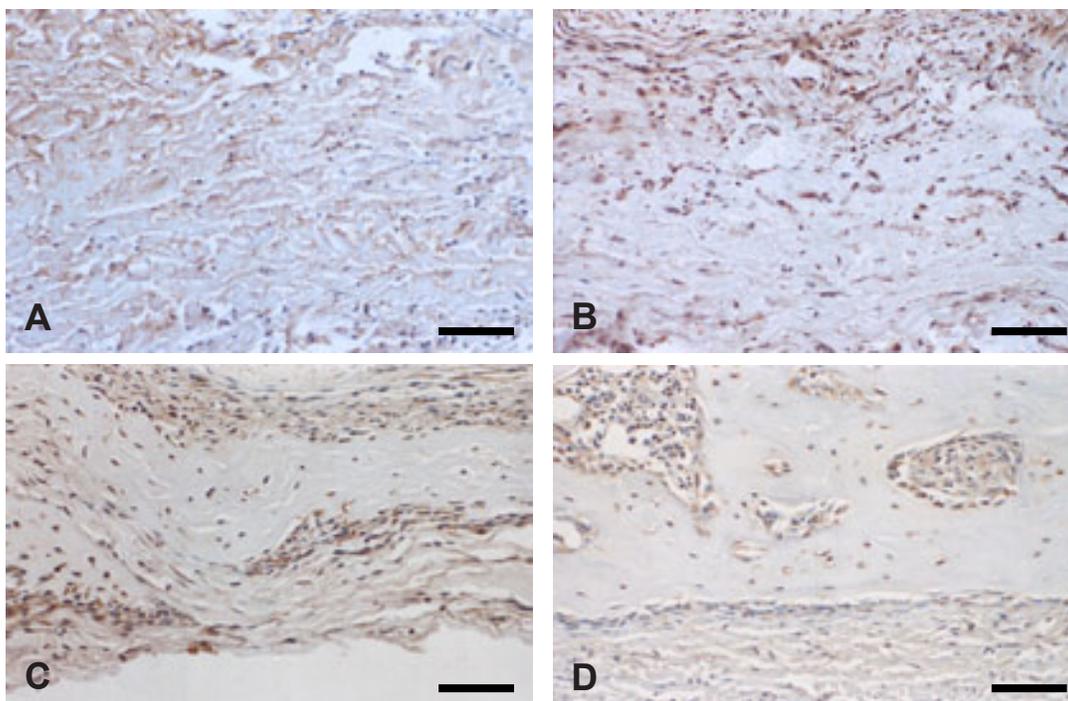


Figura 15 - Fotomicrografias representativas da reação imunoistoquímica para IGF-I (em marrom) 3(A), 7(B), 15(C) e 30(D) dias após a implantação. Note que a marcação é essencialmente extracelular na primeira semana, nos períodos seguintes a marcação era intra-celular. Barra=25 μ m.

5. Discussão

A presente Tese de Doutorado constitui continuação de Dissertação de Mestrado na qual foi avaliada a biocompatibilidade de três matrizes de colágeno aniônico, aqui identificadas como BP24, BP36 e BP48, para o uso como material osteocondutor para o tratamento de defeitos ósseos. O modelo experimental então utilizado foi um defeito de cerca de 1,5x1 mm criado na porção distal da diáfise da tibia de ratos. Nesse modelo experimental o tecido ósseo regenera-se de maneira espontânea, sendo, portanto, adequado para se avaliar a biocompatibilidade de um biomaterial com o processo de regeneração óssea. Os resultados obtidos demonstraram que as matrizes de colágeno aniônico permitiam a recuperação da estrutura da tibia em tempo semelhante ao observado nos defeitos controle, que se regeneraram espontaneamente. Dessa maneira foi possível determinar que, em condições nas quais os mecanismos de regeneração óssea atuam efetivamente, as matrizes não têm nenhum efeito negativo sobre esse processo. Desse modo concluímos que as matrizes de colágeno aniônico são biocompatíveis com o processo de regeneração óssea.

A partir desses resultados iniciais nova questão emergiu: Seriam as matrizes de colágeno aniônico capazes de atuar de maneira eficaz como materiais osteocondutores na regeneração de defeitos ósseos de tamanha crítico?

O modelo experimental escolhido para que essa pergunta fosse respondida foi a indução de defeito ósseo em calota craniana, realizado com trefina, considerado o padrão para esse tipo de avaliação [110-112]. Na calota craniana de animais adultos a regeneração óssea ocorre de forma incompleta e/ou lenta, possivelmente devido a menor irrigação sanguínea e o pouco desenvolvimento da medula óssea nessa região [112,113]. Um detalhe acerca desse modelo que

pode aventar alguma discussão concerne o tamanho do defeito a ser utilizado. Há na literatura descrição de defeitos entre 4 e 8 milímetros [114-117]. Optamos pelo defeito de 4 mm visto que poderíamos desse modo otimizar o uso de animais, criando 2 defeitos por rato. Acrescida da vantagem de comparação em um mesmo animal Um cuidado tomado nas cirurgias foi evitar a inclusão das suturas cranianas nos defeitos: essas estruturas, com exceção da sutura interfrontal posterior, permanecem ativas por toda vida do rato [118], com células osteogênicas ativas presentes, o que poderia criar um viés favorável para o reparo do defeito.

A capacidade osteocondutora das matrizes de colágeno aniônico ficou evidente desde a primeira análise feita, a radiográfica. De fato, antes mesmo do estudo radiográfico, observamos, ao colher os parietais quando do sacrifício dos animais, que os defeitos controles estavam preenchidos por tecido mole e os defeitos que receberam os implantes possuíam tecido duro a partir do dia 30 pós-implante. A escolha do uso da mamografia e não da técnica convencional de raios-X foi devida a maior sensibilidade. Em experimento piloto testamos o raio-X convencional, sendo a qualidade das radiografias considerada insatisfatória. A maior sensibilidade da mamografia, contudo, pode criar uma tendência de aumentar a radiopacidade dos implantes. Isso poderia explicar o pequeno aumento na densidade óssea observada nos grupos BP24 e BP48 no dia 7.

A análise morfológica complementou a radiográfica e confirmou algumas observações prévias acerca da resposta biológica às matrizes de colágeno aniônico [81,105]. Uma dessas observações foi a baixa resposta inflamatória causada pela presença das matrizes. Até a primeira semana de pós-operatório um número muito pequeno de células estava no interior da matriz. A partir do décimo-quinto dia, com o início da neoformação óssea, o esperado seria o achado de focos de reabsorção das matrizes por células fagocitárias, mecanismo observado na reabsorção do

colágeno nativo [68,119-121]. Contudo, observamos que os limites entre as áreas de ossificação e as matrizes de colágeno aniônico eram, em muitos locais, indistinguíveis. Algumas áreas da matriz extracelular do osso novo mantinham o aspecto da estrutura do colágeno implantado adjacente. Esse aspecto ficou mais evidente observando-se a autofluorescência desses cortes, o que destacou a organização da matriz extracelular.

Técnicas histomorfométricas convencionais dependem da capacidade do observador distinguir as diferentes estruturas teciduais para então medi-las. Os três parâmetros normalmente analisados são: área total do defeito, área de tecido ósseo neoformado e área ocupada pelo biomaterial [122-125]. Devido à dificuldade de se diferenciar neste estudo o tecido osteóide da estrutura das matrizes implantadas, buscamos empregar uma metodologia que utilizasse como parâmetro a organização da matriz extracelular do tecido ósseo, mas que não exigisse que o observador fizesse a distinção entre as diferentes estruturas pelo observador. Para isso utilizamos técnicas de análise de textura de imagens, especificamente a análise de entropia e a análise da dimensão fractal, que permitem a avaliação global das imagens do processo de reparo. Essa abordagem permitiu comparar os diferentes grupos experimentais e períodos analisados com a estrutura óssea normal, o qual constituía, em termos de organização, a estrutura óssea a ser alcançada com a implantação das matrizes de colágeno aniônico nos defeitos criados. As imagens capturadas podem ser consideradas um mapa com 1.339.000 pontos (ou pixels na linguagem da informática), distribuídos em uma área determinada contendo duas informações importantes: a distribuição e o padrão de organização do objeto observado e o grau de luminosidade que o ponto possui.

A entropia mede o grau de informação contida no histograma da frequência de distribuição dos graus de cinza em uma imagem. O conceito da entropia de informação introduzido por Shannon [126] utilizado por nós é descrito pela seguinte fórmula:

$$E = \sum p \log p \quad (3)$$

Onde p é valor da frequência com que cada valor de cinza está presente na imagem analisada.

Com isso, a entropia mínima seria obtida com uma imagem contendo apenas um tom de cinza e a entropia máxima seria obtida do caso de a imagem ter uma distribuição homogênea de todos os valores da escala cinza, não importando o número de cinzas da escala utilizada. No caso das imagens avaliadas, verificamos que há uma diminuição na entropia das imagens, ou seja, à medida que ocorre substituição da matriz por tecido ósseo o número de tons de cinza nas imagens se torna mais homogênea. Interpretamos essa homogeneização das imagens como decorrente da estrutura porosa das matrizes, com muitos valores baixos na escala de cinza utilizada, pelo tecido ósseo, com seu aspecto compacto e com maior variação de tons de cinza. Esse fenômeno ocorre de maneira rápida já nas primeiras semanas e continua até o último período analisado.

A dimensão fractal aplica a lei da potência nas imagens, analisando a presença de determinadas estruturas independentemente das escalas usadas para a análise. A partir dos valores obtidos em diferentes escalas faz-se uma representação gráfica entre o logaritmo do tamanho da escala usada e o logaritmo da varável examinada. A dimensão fractal corresponde ao valor da inclinação da reta obtida na regressão linear dos valores. No método utilizado foi gerada uma imagem tridimensional “virtual” (pseudo-3D) na qual analisamos a presença de padrões de auto-similaridade nos quais partes do objeto são semelhantes ao todo.

Comparando a entropia e a dimensão fractal da estrutura óssea controle com os valores obtidos nos grupos experimentais, observamos que ao do longo do tempo os valores medidos nos grupos experimentais eram inicialmente altos e com o passar do tempo os valores diminuíram, aproximando-se dos valores do osso controle, especialmente o grupo que recebeu a matriz BP48. Dessa forma, verificamos que a matriz BP48 permitiu uma maior reorganização da estrutura óssea a longo prazo.

Aplicando a análise matemática foi possível somar a linguagem subjetiva da análise histológica à linguagem objetiva da matemática; com isso as observações histológicas são reforçadas por valores absolutos que conferem uma maior precisão à descrição histológica. Acreditamos que essa metodologia, em adição à morfometria convencional, poderá vir a ser de grande utilidade na avaliação do processo regenerativo de defeitos ósseos e na determinação da eficácia de biomateriais. O tecido ósseo por ter uma organização hierarquizada e com padrões repetitivos, como as lamelas circunferenciais, lamelas intersticiais e os ósteons, é favorável para o uso de análises baseadas na detecção de padrões repetitivos no arranjo de *pixels* de imagens. Ademais, a complexidade da organização muda conforme o amadurecimento do tecido ósseo, permitindo assim uma documentação exata do processo de reparo ósseo. Este trabalho é o primeiro a aplicar esse tipo de metodologia de análise imagens na avaliação de biomateriais para regeneração de defeitos ósseos. Estudos anteriores que utilizaram métodos de análise de texturas de imagens no tecido ósseo limitaram-se a avaliar a estrutura trabecular de ossos esponjosos na osteoporose [127-130] e a organização do tecido ósseo em radiografias [131-133].

No processo de avaliação da eficácia das matrizes de colágeno aniônico, observamos um outro aspecto muito incomum na dinâmica da neoformação óssea: o processo de osteogênese iniciava no interior das matrizes, progredindo, então, para as porções externas até, eventualmente,

formar uma estrutura óssea preenchendo toda a área das matrizes e consolidando a interface matriz-osso parietal, de tal modo que no dia 60 pós-operatório não havia, radiograficamente, uma separação facilmente distinguível entre o osso neoformado e o osso parietal. A progressão esperada do reparo ósseo seria a partir das bordas do defeito, invadindo progressivamente as matrizes de colágeno aniônico até ocorrer o fechamento do defeito em algum ponto próximo ao centro. Isso era esperado visto que nos defeitos controles havia neoformação óssea na periferia com progressão centrípeta. Todavia, como nesse caso, o ambiente era desfavorável para a osteogênese, o processo limitou-se às regiões próximas à borda. Nos grupos experimentais o previsto seria a continuidade do processo até o fechamento dos defeitos. Aliás, essa é a dinâmica observada com diversos outros tipos de enxertos e substitutos implantados em calota craniana: neoformação óssea da periferia para o centro [122-125,134,135] e não do centro para a periferia, como observamos nas matrizes de colágeno aniônico.

Ainda do ponto de vista da eficácia das matrizes de colágeno aniônico, as matrizes de colágeno aniônico permitem o reparo mais rápido de defeitos ósseos do que diversos outros biomateriais avaliados em defeitos de calota craniana de ratos com 4 mm de diâmetro [136-138]. Nesses estudos foram avaliados materiais ainda em fase de avaliação como o fosfato de octacálcio [137,138] e materiais disponíveis comercialmente como o Bio-Oss[®], Bioplant[®] HTR, Orthomatrix[®] HA, Pro-Osteon[®] 500R, Interpore[®] 200, e o Biogran[®] [136]. Nesse estudos, o aspecto do tecido ósseo neoformado 8 semanas (\approx 60 dias) após implantação mostra a presença de fragmentos inteiros dos materiais implantados presos no interior do tecido ósseo neoformado. Mesmo o fosfato de octacálcio e o β -fosfato de cálcio, que são considerados materiais de rápida reabsorção, ainda podiam ser facilmente detectados no interior do osso neoformado [137]. Por outro lado, em período semelhante observamos que os defeitos que receberam as matrizes BP24 e

BP36 estavam completamente preenchidos com tecido ósseo. Apenas a matriz BP48 ainda apresentava, no período de 60 dias, remanescentes envolvendo o tecido ósseo neoformado.

O segundo objetivo do presente estudo teve como ponto de partida o aspecto incomum da organização da matriz extracelular, especialmente a continuidade entre esta e as matrizes de colágeno aniônico. Esse mesmo aspecto já havia sido observado nos estudos que precederam este trabalho [81,105]. Estudos que avaliam a incorporação de biomateriais e enxertos ósseos têm como abordagem verificar a permanência no interior da estrutura óssea neoformada [135,139-141]. Por outro lado, espera-se que a permanência dos biomateriais implantados seja transitória e que sejam reabsorvidos à medida que ocorra a progressão da neoformação óssea deixando espaço para a deposição da matriz óssea [142-145]. Neste estudo procuramos determinar se as matrizes de colágeno aniônico estariam sendo incorporadas na matriz extracelular do tecido ósseo como elemento funcional da estrutura óssea, o que nos daria um biomaterial com conceito funcional diferente dos existentes até hoje. Utilizamos, para isso, uma combinação de métodos, com o objetivo de localizar diretamente o colágeno aniônico no interior da matriz óssea e verificar se o mecanismo envolvido de incorporação seria devido à atividade osteoblástica ou um fenômeno inespecífico. A ultraestrutura revelou áreas de mineralização de colágeno aniônico, inclusive com fibras elásticas presas no seu interior. Esse processo não foi considerado inespecífico visto que as áreas de mineralização estavam associadas à presença de células osteogênicas, inclusive ativas, como demonstrado pela atividade de fosfatase alcalina. Acreditamos que as matrizes de colágeno aniônico estavam sendo usadas como substrato para o início do processo de mineralização.

Lembramos que as características morfológicas e a cronologia da evolução observadas nesse processo são distintas daquelas observadas na calcificação distrófica de amostras de pericárdio bovino implantadas em tecido subcutâneo de ratos [146]. Ademais, o fator iniciador da

calcificação distrófica, os fosfolipídios de membrana das células do pericárdio, foi removido com o tratamento químico da hidrólise. Também foi descrito processo de calcificação distrófica mediado pela presença de fibras elásticas em sítios ectópicos [147]. Não consideramos, todavia, este o caso presente, visto que as fibras elásticas das matrizes embora envolvidas por áreas de mineralização e não apresentavam sinais de mineralização.

Um aspecto de grande interesse observado neste processo foi a presença de células fagocitárias ativas somente em regiões de tecido ósseo. Esse aspecto histológico é compatível com ausência de remoção das matrizes por células inflamatórias. Portanto, a remoção das matrizes estaria ocorrendo em conjunto com o processo de remodelação óssea. Os osteoblastos também poderiam participar desse processo produzindo e secretando colagenases e/ou enzimas proteolíticas. O processo lento de remoção das matrizes de colágeno aniônico, acompanhado a regeneração e remodelação óssea, semelhante ao observado com o atelocolágeno [148-150], indica que as matrizes de colágeno são excelentes arcabouços para a ossificação. Contudo, o atelocolágeno é diretamente mineralizado apenas ao ser usado com carreador do fator de crescimento BMP [148,150], por outro lado o colágeno aniônico sofre o processo de mineralização mesmo sendo utilizado isoladamente, sem a adição de nenhuma molécula bioativa.

O mecanismo envolvido na biomineralização do colágeno aniônico está possivelmente ligado à presença de grupos carboxílicos adicionais na junção *gap:overlap* na estrutura do colágeno aniônico favorecendo a deposição de íons cálcio nessa região [151]. O colágeno nativo é considerado um dos reguladores do processo de mineralização óssea [152]. Contudo em condições fisiológicas e sem a presença de co-fatores, a mineralização não progride devido à uma barreira hidrofóbica presente na junção *gap-overlap* [153], que impediria a progressão da deposição de íons cálcio além do *gap*. No colágeno aniônico essa barreira não existiria.

Além do envolvimento direto com o processo de biomineralização, acreditamos que as matrizes de colágeno aniônico imobilizam um conjunto de moléculas bioativas no sítio de reparo criando um ambiente favorável para células osteogênicas. A imobilização e apresentação dessas moléculas ocorreria pela presença dos grupos carboxílicos adicionais que serviriam de local de ligação para fatores de crescimento, de maneira semelhante ao que ocorre na formação do gradiente haptotático de quimiocinas, regulado por grupos sulfatos e carboxílicos presentes em glicosaminoglicanos [154-158]. Além disso, a adsorção de proteínas do soro a substratos carregados eletricamente foi avaliada em um estudo [159]. Apesar de não ter sido feita uma caracterização detalhada das proteínas adsorvidas, verificou-se que os substratos carregados negativamente adsorveram uma variedade maior de proteínas do os carregados positivamente. Transpondo para um modelo *in vivo* podemos inferir que substratos carregados negativamente poderiam apresentar uma variedade maior de moléculas bioativas para estimular a migração e a diferenciação celular.

Partindo dessa hipótese, tentamos determinar se alguns fatores de crescimento importantes para o reparo do defeito estariam em contato com a estrutura das matrizes de colágeno aniônico, indicando a possível formação de um gradiente haptotático no interior delas.

Verificamos que, entre os fatores de crescimento estudados, o IGF-I, a BMP-2 e a BMP-4 estavam presentes em contato direto com as matrizes de colágeno aniônico em períodos iniciais de reparo. Os fatores de crescimento IGF-I e o BMP2/4 possuem papel importante na regulação do reparo ósseo: o IGF-I estimula a proliferação de células osteogênicas [160,161] e o BMP2/4 atua estimulando a diferenciação de células mesenquimais imaturas em células da linhagem osteogênica [162,163]. A presença desses fatores de crescimento ligados à matriz de colágeno aniônico nos períodos iniciais coincide com a necessidade de estimular a migração e a

diferenciação de células osteogênicas no interior dos implantes. A ausência em períodos posteriores permite levantar a hipótese de que poderiam representar o gatilho deflagrador do processo. Ademais, o fato de estarem presentes em algumas áreas limitadas no interior das matrizes e não por toda estrutura pode explicar o porquê da neoformação óssea ter iniciado a partir de focos de regeneração que coalesceram com o tempo.

A ausência de marcação dos demais fatores de crescimento no interior das matrizes não é indicativa de que não participem desse processo. As explicações possíveis são que encontravam-se presentes em quantidades indetectáveis pela técnica utilizada ou os determinantes antigênicos reconhecidos pelos anticorpos utilizados foram modificados pelo processamento histológico. Essa explicação é aplicável também, à ausência de marcação dos fatores IGF e BMP em períodos posteriores aos detectados. E nesse caso, seria de se esperar uma positividade ainda maior dos fatores de crescimento no início.

Neste estudo não avaliamos diretamente os efeitos do fenômeno piezelétrico sobre o reparo da calota craniana. Porém acreditamos que a movimentação do animal seja capaz de criar pequenas deformações, ainda que não controladas, mas que seriam capazes de gerar um estímulo piezelétrico e, conseqüentemente, estimular a regeneração óssea. Esse aspecto e detalhes acerca do comportamento biológico das matrizes de colágeno aniônico requerem estudos com protocolos experimentais específicos.

Outro detalhe quanto à avaliação de mecanismos biológicos seria o uso de controles ativos, especialmente o colágeno nativo, para que os possíveis benefícios da presença das cargas elétricas negativas na estrutura do colágeno sejam avaliados através de uma comparação direta com o comportamento biológico do colágeno nativo. Contudo, essa necessidade advém de um interesse científico sobre o material. Sob ponto de vista de aplicação clínica, a eficácia e

biocompatibilidade apresentadas pelas matrizes de colágeno aniônico, somadas ao baixo custo de produção, sugerem que constituem um material altamente atrativo para o tratamento de defeitos ósseos. Ao expandirmos o conhecimento acerca de suas interações biológicas e mecanismos de atuação poderemos ampliar o rol de aplicações das matrizes para área de engenharia de tecidos *ex-vivo*, campo de pesquisa que tem como objetivo a produção de órgãos fora do organismo para posterior implantação.

6. Conclusões

Com base nos resultados obtidos podemos concluir que as matrizes de colágeno aniônico são materiais osteocondutores eficazes para uso em defeitos ósseos de tamanho crítico. O processo de reparo com essas matrizes ocorreria de maneira rápida em razão de dois fatores: a participação direta no processo de biomineralização e a imobilização de fatores de crescimento importantes para a osteogênese na sua estrutura.

Por esses motivos acreditamos que o mecanismo de ação dessas matrizes seja inicialmente estimular a migração de células osteogênicas em diferentes estágios de diferenciação para o interior mediada pelo IGF-I. A seguir, sob o efeito da BMP2/4, essas células completariam o seu processo de diferenciação formando os focos de ossificação observados. O colágeno aniônico não seria reconhecido como material estranho, e dada as alterações de sua estrutura pela adição de grupos carboxílicos, seriam favoráveis à deposição de íons cálcio diretamente na sua estrutura.

Acreditamos que as matrizes de colágeno aniônico serão, em curto prazo, uma opção altamente recomendável para o tratamento de defeitos ósseos em locais de baixa demanda mecânica. Essa característica limitaria os sítios anatômicos beneficiados: a região cranio-orofacial seria a região anatômica alvo para uso. A odontologia seria particularmente beneficiada, não só pela eficácia de promover a regeneração óssea, mas também pela diminuição da cronologia de reparo, normalmente longa com o uso de outros materiais, acelerando a reabilitação do paciente.

7. Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia de três matrizes de colágeno aniônico no reparo de defeitos ósseos de tamanho crítico. As matrizes avaliadas tinham como diferencial entre si a densidade de cargas elétricas. Dois aspectos da resposta biológica às matrizes de colágeno aniônico também foram avaliadas: a possível incorporação de parte das matrizes implantadas na matriz mineralizada do tecido ósseo e a imobilização de fatores de crescimento envolvidos no processo de reparo ósseo. Amostras das três matrizes foram implantadas em defeitos ósseos de 4 mm de diâmetro criados em calotas cranianas de ratos; defeitos vazios foram usados como controles. As calotas foram colhidas 3, 7, 15, 30, e 60 dias e 1 ano para análise radiográfica, histológica, incluindo análise de textura de imagens, e ultra-estrutural. Observamos que duas das matrizes permitem uma rápida recuperação da estrutura óssea, no sexagésimo dia duas matrizes induziram a total recuperação do defeitos criados. A matriz mais eletronegativa ainda apresentava remanescentes de sua estrutura na periferia do osso neoformado. Porém, 1 ano após a implantação todos os defeitos que receberam qualquer uma das matrizes estavam totalmente recuperados. O sítio de reparo ósseo sofreu rápido remodelamento com uma tendência a apresentar organização semelhante ao tecido original da calota craniana. Observamos que as matrizes de colágeno aniônico são incorporadas ativamente na matriz óssea mineralizada, sem sinais de reabsorção das matrizes antes do processo de mineralização iniciar. Dois fatores de crescimento analisados o IGF-I (*Insulin-like Growth Factor-I*) e as BMPs (*Bone Morphogenetic Protein*) 2 e 4 foram encontrados em contato direto com as matrizes de colágeno aniônico em períodos iniciais da regeneração dos defeitos. Esses resultados indicam que as matrizes de colágeno aniônico são biomateriais osteocondutores eficazes com potencial de aplicação clínica a

curto prazo. Defeitos ósseos localizados em estruturas ósseas de baixa de manda mecânica seriam os locais mais beneficiados com o uso dessas matrizes.

Palavras-chave: colágeno tipo I, biomaterial, estímulo elétrico, osteogênese e osteocondução.

8. Abstract

The objective of this study was to evaluate the efficacy of three anionic collagen matrices in the repair of critical-size bone defects. The matrices differed in their electric charge density. Two aspects of the biological response were also evaluated: the possible incorporation of part of the matrices into mineralized bone matrix and the immobilization of growth factors involved in the bone repair process. Samples of the matrices were implanted in 4-mm cranial bone defects made in rats; empty defects were used as controls. The cranial bone were retrieved 3, 7, 15, 30, 60 days and 1 year and submitted to radiographical, histological, including image texture analysis, and ultrastructural analysis. It was observed that two of the matrices allowed a quick recovery of the bone structure, on the day 60, the matrices had stimulated the full recovery of the bone defects. The most electronegative of the matrices still had remnants at the periphery of the new formed bone. However, one year after implantation all defects that received one of the matrices were fully recovered. The new formed bone quickly remodelled tending to show the same organization as the original bone structure. It was observed that the anionic collagen matrices were actively incorporated into the mineralized bone matrix, without signs of resorption prior to the mineralization process. Two growth factors, the IGF-I (Insulin-like growth factor-I) and the BMP (Bone morphogenetic protein) 2 and 4, were found in direct contact with the structure of the anionic collagen matrices at the beginning of the bone regeneration process. These results show that the anionic collagen matrices are effective osteoconductive biomaterials, showing potential to be used clinically in a short term. Bone defects located at structures with low mechanical demand would be the sites that would take most benefit from the use of these matrices.

Keywords: type I collagen, biomaterial, electrical stimulus, osteogenesis and osteoconduction

9. Bibliografia

1. Hall B; Miyake T. The membranous skeleton: the role of cell condensation in vertebrate skeletogenesis. *Anat Embryol (Berl)* 1992; 186(2): 107-124.
2. Hall B; Miyake T. Divide, accumulate, differentiate: cell condensation in skeletal development revisited. *Int J Dev Biol* 1995; 39(6): 881-893.
3. Hiltunen A; Vuorio E; Aro H. A standardized experimental fracture in the mouse tibia. *J Orthop Res* 1993; 11(2): 305-312.
4. Ferguson C; Alpern E; Miclau T; Helms J. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mech Dev* 1999; 87(1-2): 57-66.
5. Vortkamp A; Lee K; Lanske B; Segre G; Kronenberg H; Tabin C. Recapitulation of signals regulating embryonic bone formation during postnatal growth and in fracture repair. *Mech Dev* 1996; 71: 65-76.
6. Cornell C; Lane J. Current understanding of osteoconduction in bone regeneration. *Clin Orthop* 1998; 355S(1): S267-S273.
7. Finkemeier C. Bone-grafting and bone graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am* 2002; 84(3): 454-464.
8. Lind M. Growth factors stimulation of bone healing: Effects on osteoblasts, osteotomies, and implants fixation. *Acta Orthop Scand* 1998; 69-Supplement(283): 2-37.
9. Bruder S; Kraus K; Goldberg V; Kadiyala S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am* 1998; 80(7): 985-996.
10. Kadiyala S; Jaiswal N; Bruder S. Culture-expanded, bone marrow-derived mesenchymal stem cells can regenerate a critical-sized segmental bone defect. *Tissue Eng* 1997; 3(2): 173-185.

11. Komiya K; Nasuno S; Uchiyama K; Takahira N; Kobayashi N; Minehara H; Watanabe S; Itoman M. Status of bone grafting in Japan - Nation-wide survey of bone grafting performed from 1995 through 1999. *Cell Tissue Bank* 2003; 4(2-4): 217-220.
12. Russel J; Block J. Surgical harvesting of bone graft from the ilium: Point of view. *Med Hypotheses* 2000; 55(6): 474-479.
13. Gould S; Rhee J; Tay B; Otsuka N; Bradford D. Cellular contribution of bone graft to fusion. *J Orthop Res* 2000; 18(6): 920-927.
14. Kakinoki R; Bishop A; Tu Y; Matsui N. Detection of the proliferated donor cells in bone grafts in rats, using a PCR for Y-chromosome-specific gene. *J Orthop Sci* 2002; 7(2): 252-257.
15. Axhausen W. The osteogenetic phases of regeneration of bone; a historical and experimental study. *J Bone Joint Surg Am* 1956; 38-A(3): 593-600.
16. Einhorn T; Majeska R; Rush E; Levine P; Horowitz M. The expression of cytokine activity by fracture callus. *J Bone Miner Res* 1995; 10(8): 1272-1281.
17. Goldberg V; Lance E. Revascularization and accretion in transplantation - Quantitative studies of the role of the allograft barrier. *J Bone Joint Surg Am* 1972; 54(4): 807.
18. Albrektsson T. *In vivo* studies of bone grafts - The possibility of vascular anastomoses in healing bone. *Acta Orthop Scand* 1980; 51(1): 9-17.
19. Gray J; Elves M. Early osteogenesis in compact bone isografts: A quantitative study of contributions of the different graft cells. *Calcif Tissue Int* 1979; 29(3): 225-237.
20. Heslop B; Zeiss I; Nisbet N. Studies on the transference of bone I. A comparison of autologous and homologous bone implants with reference to osteocyte survival, osteogenesis and host reaction. *Br J Exp Pathol* 1960; 41: 269-287.
21. Dell P; Burchardt H; Glowczewskie Fj. A roentgenographic, biomechanical, and histological evaluation of vascularized and non-vascularized segmental fibular canine autografts. *J Bone Joint Surg Am* 1985; 67(1): 105-112.

22. Zidjerveld S; Bruggenkate C; Van Den Bergh J; Schulten E. Fractures of the iliac crest after split-thickness bone grafting for preprosthetic surgery: Report of 3 cases and a review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg* 2004; 62: 781-786.
23. Hughes C; Revington P. The proximal tibia donor site in cleft alveolar bone grafting: Experience of 75 consecutive cases. *J Craniomaxillofac Surg* 2002; 30(1): 12-16.
24. Mazock J; Schow S; Triplett R. Proximal tibia bone harvest: review of technique, complications, and use in maxillofacial surgery. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004; 19(4): 586-593.
25. Urist M. Bone: Formation by autoinduction. *Science* 1965; 150: 893-899.
26. Pajamäki K; Viljaen V. Demineralized bone matrix inductive grafts. In: Lindholm T, editor. *Bone morphogenetic proteins: Biology, biochemistry and reconstructive surgery*. Austin: Academic Press; 1996. p. 201-205.
27. Tomford W; Mankin H. Massive bone allografts. In: Urist M, O'Connor B, Burwell R, editors. *Bone grafts, derivatives & substitutes*. Cambridge: Butterworth Heinemann Ltd; 1994. p. 196-209.
28. Phillips G. Scientific and economic aspects of tissue banking. In: Urist M, O'Connor B, Burwell R, editors. *Bone grafts, derivatives & substitutes*. Cambridge: Butterworth Heinemann Ltd; 1994. p. 196-209.
29. Burwell R. History of bone grafting and bone substitutes with special reference to osteogenic induction. In: Urist M, O'Connor B, Burwell R, editors. *Bone grafts, derivatives & substitutes*. Cambridge: Butterworth Heinemann Ltd; 1994. p. 3-102.
30. Hench L; Polak J. Third-generation biomedical materials. *Science* 2002; 295(5557): 1014-1017.
31. Hench L. Biomaterials. *Science* 1980; 208(4446): 826-831.
32. Gunatillake P; Adhikari R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur Cell Mat* 2003; 5: 1-16.

33. Constantino P; Hiltzik D; Govindaraj S; Moche J. Bone healing and bone substitutes. *Facial Plast Surg* 2002; 18(1): 13-26.
34. Wang M. Developing bioactive composite materials for tissue replacement. *Biomaterials* 2003; 24: 2133-2151.
35. Hollinger J; Brekke J; Gruskin E; Lee D. Role of bone substitutes. *Clin Orthop* 1996; 324: 55-65.
36. Froum S; Cho S; Rosenberg E; Rohner M; Tarnow D. Histological comparison of healing extraction sockets implanted with bioactive glass or demineralized freeze-dried bone allograft: A pilot study. *J Periodontol* 2002; 73(1): 94-102.
37. Liao H; Mutvei H; Hammarström L; Wurtz T; Li J. Tissue response to nacreous implants in rat femur: an in situ hybridization and histochemical study. *Biomaterials* 2002; 23(13): 2693-2701.
38. Dong J; Kojima H; Uemura T; Kikuchi M; Tateishi T; Tanaka J. In vivo evaluation of a novel porous hydroxyapatite to sustain osteogenesis of transplanted bone marrow-derived osteoblastic cells. *J Biomed Mater Res* 2001; 57(2): 208-216.
39. Byrd H; Hobar P; Shewmake K. Augmentation of the cranifacial skeleton with porous hydroxyapatite granules. *Plast Reconstr Surg* 1993; 91(1): 15-22.
40. Verheyen C; Dewijn J; Vanblitterswijk C; Rozing P; De Groot K. Examination of efferent lymph nodes after 2 years of transcortical implantation of poly(L-lactide) containing plugs: A case report. *J Biomed Mater Res* 1993; 27: 1115-1118.
41. Schakenraad J; Hardonk M; Feijen J; Molenaar I; Nieuwenhuis P. Enzymatic activity toward poly(L-lactic acid) implants. *J Biomed Mater Res* 1990; 24(5): 529-545.
42. Laitinen O; Pihlajamäki H; Sukura A; Böstman O. Transmission electron microscopic visualization of the degradation and phagocytosis of a poly-L-lactide screw in cancellous bone: Along term experimental study. *J Biomed Mater Res* 2002; 61(1): 33-39.
43. Jarcho M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin Orthop* 1981; 157: 259-278.

44. Schwartz Z; Lohmann C; Oefinger J; Bonewald L; Dean D; Boyan B. Implant surface characteristics modulate differentiation behavior of cells in the osteoblastic lineage. *Adv Dent Res* 1999; 13: 38-48.
45. Lee C; Singla A; Lee Y. Biomedical applications of collagen. *Int J Pharm* 2001; 221(1-2): 1-22.
46. Rossert J; De Crombrughe B. Type I collagen: Structure, synthesis, and regulation. In: Bilezikian J, Raisz L, Rodan G, editors. *Principles of bone biology*. San Diego: Academic Press; 1996. p. 127-142.
47. Tzaphlidou M. Measurement of the axial periodicity of collagen fibrils using an image processing method. *Micron* 2001; 32: 337-339.
48. Rho J; Kuhn-Spearing L; Zioupos P. Mechanical properties and hierarchical structure of bone. *Med Eng Phys* 1998; 20(2): 92-102.
49. Chaudry Z; Rocha J; Plepis A; Rossi M; Goissis G. Preparação e caracterização de colágeno aniônico por hidrólise seletiva de grupos carboxiamida internos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* 1997; Abr/Jun: 40-46.
50. Ottani V; Raspanti M; Ruggeri A. Collagen structure and functional implications. *Micron* 2001; 32(3): 251-260.
51. Jikko A; Harris S; Chen D; Mendrick D; Damsky C. Collagen integrin receptors regulate early osteoblast differentiation induced by BMP-2. *J Bone Miner Res* 1999; 14(7): 1075-1083.
52. Franceschi R; Iyer B; Cui Y. Effects of ascorbic acid on collagen matrix formation and osteoblast differentiation in murine MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res* 1994; 9(6): 843-854.
53. Quarles L; Yohay D; Lever L; Caton R; Wenstrup R. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 ceels in culture: An *in vitro* model of osteoblast development. *J Bone Miner Res* 1992; 7(6): 683-692.

54. Ikeda K; Michelangeli V; Martin T; Findlay D. Type I collagen substrate increases calcitonin and parathyroid hormone receptor-mediated signal transduction in UMR 106-06 osteoblast-like cells. *J Cell Physiol* 1993; 156(1): 130-137.
55. Andre-Frei V; Chevally B; Orly I; Boudeulle M; Huc A; Herbage D. Acellular mineral deposition in collagen-based biomaterials incubated in cell culture media. *Calcif Tissue Int* 2001; 66(3): 204-211.
56. Anderson H. Mechanism of mineral formation in bone. *Lab Invest* 1989; 60(3): 320-330.
57. Wassen M; Lammens J; Tekoppele J; Sakkers R; Liu Z; Verbout A; Bank R. Collagen structure regulates fibril mineralization in osteogenesis as revealed by cross-link patterns in calcifying callus. *J Bone Miner Res* 2000; 15(9): 1776-1785.
58. Pohunková H; Adam M. Reactivity and the fate of some composite bioimplants based on collagen in connective tissue. *Biomaterials* 1995; 17(16): 67-71.
59. Joos U; Ochs G; Ries P. Influence of Collagen fleece on bone regeneration. *Biomaterials* 1980; 1(1): 23-26.
60. Delustro F; Smith S; Sundsmo J; Salem G; Kincaid S; Ellingsworth L. Reaction to injectable collagen: Results in animal models and clinical use. *Plast Reconstr Surg* 1987; 79(4): 581-592.
61. Kamer F; Churukian M. Clinical use of injectable collagen - A three-year retrospective review. *Arch Otolaryngol* 1984; 110(2): 93-98.
62. Itoh H; Aso Y; Furuse M; Noishiki Y; Miyata T. A honeycomb collagen carrier for cell culture as a tissue engineering scaffold. *Artif Organs* 2001; 25(3): 213-217.
63. Lindsey W; Ogle R; Morgan R; Cantrell R; Sweeney T. Nasal reconstruction using a osteoconductive collagen gel matrix. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1996; 122(1): 37-40.
64. Güngörmüş M; Kaya Ö. Evaluation of the effect of heterologous type I collagen on healing of bone defects. *J Oral Maxillofac Surg* 2002; 60(5): 541-545.

65. Mitchell R. An evaluation of bone healing in cavities in the jaws implanted with a collagen matrix. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1992; 30(3): 180-182.
66. Du C; Cui F; Zhang W; Feng Q; Zhu X; De Groot K. Formation of calcium phosphate/collagen composites through mineralization of collagen matrix. *J Biomed Mater Res* 2000; 50(4): 518-527.
67. Itoh S; Kikuchi M; Koyama Y; Takakuda K; Shinomiya K; Tanaka J. Development of an artificial vertebral body using a novel biomaterial, hydroxyapatite/collagen composite. *Biomaterials* 2002; 23(9): 3919-3926.
68. Pieper J; Van Wachem P; Van Luyn M; Brouwer L; Hafmans T; Veerkamp J; Van Kuppevelt T. Attachment of glycosaminoglycans to collagenous matrices modulates the tissue response in rats. *Biomaterials* 2000; 21(16): 1689-1699.
69. Doillon C; Silver F; Berg R. Fibroblast growth on a porous collagen sponge containing hyaluronic acid and fibronectin. *Biomaterials* 1987; 8(3): 195-200.
70. Liu L; Thompson A; Heidarani M; Poser J; Spiro R. An osteoconductive collagen/hyaluronate matrix for bone regeneration. *Biomaterials* 1999; 20(12): 1097-1108.
71. Nimmi M; Cheung D; Strates B; Kodama M; Sheik K. Chemically modified collagen: A natural biomaterial for tissue replacement. *J Biomed Mater Res* 1987; 21(6): 741-771.
72. Ma L; Gao C; Mao Z; Zhou J; Shen J. Enhanced biological stability of collagen porous scaffolds by using amino acids as novel cross-linking bridges. *Biomaterials* 2004; 25(15): 2997-3004.
73. Reid G; Gorham S; Lackie J. The attachment, spreading and growth of baby hamster kidney cells on collagen, chemically modified collagen-modified composite substrata. *J Mater Sci: Mater Med* 1993; 4(2): 201-209.
74. Shenoy V; Roseblatt J. Diffusion of macromolecules in collagen and in hyaluronic acid, rigid-rod-flexible polymers, composite matrices. *Macromolecules* 1995; 29: 8751-8758.

75. Hu X; Knight D; Grant R. The effect of deamination and/or blocking of arginine residues on the molecular assembly of acid extract rat tail tendon collagen. *Tissue Cell Res* 1996; 28(2): 215-222.
76. Radhika M; Sehgal P. Studies on the desamidation of bovine collagen. *J Biomed Mater Res* 1997; 35(4): 497-503.
77. Radhika M; Babu M; Sehgal P. Cellular proliferation on desamidated collagen matrices. *Comp Biochem Physiol* 1999; 124 Part C(2): 131-139.
78. Bet M; Goissis G; Lacerda C. Characterization of polyanionic collagen prepared by selective hydrolysis of asparagine and glutamine carboxamide side chains. *Biomacromolecules* 2001; 2(4): 1074-1079.
79. Lacerda C; Plepis A; Goissis G. Hidrólise seletiva de carboxiamidas de resíduos de asparagina e glutamina em colágeno: preparação e caracterização de matrizes aniônicas para uso como biomateriais. *Quimica Nova* 1998; 21(3): 267-271.
80. Goissis G; Suzigan S; Parreira D; Maniglia J; Braile D; Raymundo S. Preparation and characterization of collagen-elastin matrices from blood vessels intended as small diameter vascular grafts. *Artif Organs* 2000; 24(3): 217-223.
81. Rocha L; Goissis G; Rossi M. Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. *Biomaterials* 2002; 23(2): 449-456.
82. Góes J; Figueiró S; Paiva J; De Vasconcelos I; Sombra A. On the piezoelectricity of anionic collagen films. *J Phys Chem Solids* 2002; 63(3): 465-470.
83. Plepis A; Goissis G; Das Gupta D. Dielectric and pyroelectric characterization of anionic and native collagen. *Polym Eng Sci* 1996; 36: 2932-2938.
84. Goissis G; Piccirili L; Góes J; Plepis A; Das Gupta D. Anionic collagen: Polymer composites with improved dielectric and rheological properties. *Artif Organs* 1998; 22(3): 203-209.
85. Bet M; Goissis G; Vargas S; Selistre-De-Araújo H. Cell adhesion and cytotoxicity studies over polyanionic collagen surfaces with variable negative charge and wettability. *Biomaterials* 2003; 24(1): 131-137.

86. Williams W. Piezoelectric effects in biological materials. *Ferroelectrics* 1982; 41: 225-246.
87. Lee J; Lee J; Khang G; Lee H. Interaction of cells on chargeable functional group gradient surface. *Biomaterials* 1997; 18(4): 351-358.
88. Shelton R; Davies J. Osteoblast reactions to charged polymers. In: Davies J, editor. *The bone-biomaterial interface*. Toronto: University of Toronto Press; 1991. p. 181-198.
89. Kobayashi T; Nakamura S; Yamashita K. Enhanced osteobonding by negative surface charges of electrically polarized hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res* 2001; 57(4): 477-484.
90. Ohgaki M; Kizuki T; Katsura M; Yamashita K. Manipulation of selective cell adhesion and growth by surface charges of electrically polarized hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res* 2001; 57(3): 366-373.
91. Nakamura S; Kobayashi T; Yamashita K. Extended bioactivity in the proximity of hydroxyapatite ceramic surfaces induced by polarization charges. *J Biomed Mater Res* 2002; 61(4): 593-599.
92. Qiu Q; Sayer M; Kawaja M; Shen X; Davies J. Attachment, morphology, and protein expression of rat marrow stromal cells cultured on charged substrate surfaces. *J Biomed Mater Res* 1998; 42(1): 117-127.
93. Yasuda I; Noguchi K; Sata T. Dynamic callus and electric callus. *Journal of Bone and Joint Surgery AM* 1955; 37: 1292-1293.
94. Spadaro J. Mechanical and electrical interactions on bone remodeling. *Bioelectromagnetics* 1997; 18: 193-202.
95. Lavine L; Shamos M; Liboff A; Lustrin I; Rinaldi R. Electric enhancement of bone healing. *Science* 1972; 175(4026): 1118-1121.
96. Friedenber Z; Harlow M; Brighton C. Healing of non-union of the medial malleolus by means of direct current: case report. *J Trauma* 1971; 11(10): 883-885.

97. Yonemori K; Masunaga S; Ishidou Y; Maeda S; Yoshida H. Early effects of electrical stimulation on osteogenesis. *Bone* 1996; 19(2): 173-180.
98. Otter M; Mcleod K; Rubin C. Effects of electromagnetic fields in experimental fracture repair. *Clin Orthop* 1998; 355(1): S90-S104.
99. Ikada Y; Shikinami Y; Hara Y; Tagawa M; Fukada E. Enhancement of bone formation by drawn poly(L-lactide). *J Biomed Mater Res* 1996; 30(4): 553-558.
100. Hausler E; Stein L; Harbaur G. Implantable physiological power supply with PVDF film. *Ferroelectrics* 1984; 60: 277-282.
101. Cochran G; Kadaba M; Palmieri V. External ultrasound can generate microampere direct current *in vivo* from implanted piezoelectric materials. *J Orthop Res* 1988; 6(1): 145-147.
102. Knowles J; Mahmud F; Hastings G. Piezoelectric characteristics of a polyhydroxybutyrate-based composite. *Clin Mater* 1991; 8: 155.
103. Cochran G; Johnson M; Kadaba M. Piezoelectric internal fixation devices: A new approach to electrical augmentation of osteogenesis. *Orthop Clin North Am* 1984; 15: 33-59.
104. Cirelli J; Marcantonio Jr E; Marcantonio R; Lia R; Goissis G; Rossa Jr. C. Evaluation of anionic collagen membranes in the treatment of class II furcation lesions: an histometric analysis in dogs. *Biomaterials* 1997; 18(8): 1227-1234.
105. Rosa F; Lia R; De Souza K; Goissis G; Marcantonio Jr E. Tissue response to polyanionic collagen:elastin matrices implanted in rat calvaria. *Biomaterials* 2003; 24(2): 289-296.
106. Moreira P; An Y; Santos Jr. A; Genari S. *In vitro* analysis of anionic collagen scaffolds for bone repair. *J Biomed Mater Res* 2004; 71B(2): 229-237.
107. Mclean I; Nakane P. Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative- a new fixative for immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem* 1974; 22(12): 1077-1083.

108. Adam R; Corsini T; Silva P; Cintra M; Leite N; Metze K. Fractal dimensions applied to thick contour detection and residues - Comparison of keloids and hypertrophic scars. *Cytometry* 2004; 59A(1): 63-64.
109. Miao D; Scutt A. Histochemical localization of alkaline phosphatase activity in decalcified bone and cartilage. *J Histochem Cytochem* 2002; 50(3): 333-340.
110. Barth A. Histologische untersuchungen uber knochenimplantationen. *Beitr Pathol Anat Allg Pathol* 1895; 17: 65-142.
111. Frame J. A convenient animal model for testing bone substitute materials. *J Oral Surg* 1980; 38(3): 176-180.
112. Lindholm T; Viljaen V; Lindholm T. Bone morphogenetic proteins regenerating skull and maxillo-mandibular defects. In: Lindholm T, editor. *Bone morphogenetic proteins: biology, biochemistry and reconstructive surgery*. Austin: R.G. Landes Company; 1996. p. 149-155.
113. Schimitz J; Hollinger J. The critical size defect as a experimental model for craniomandibular nonunions. *Clin Orthop* 1986; 205: 299-308.
114. Pang E; Im S; Kim C; Choi S; Chai J; Kim C; Han S; Cho K. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-4 dose on bone formation in a rat calvarial defect model. *J Periodontol* 2004; 75(10): 1364-1370.
115. Verna C; Dalstra M; Wikesjo U; Trombelli L; Bosch C. Healing patterns in calvarial bone defects following guided bone regeneration in rats. Amicro-CT scan analysis. *J Clin Periodontol* 2002; 29(9): 865-870.
116. Blom E; Klein-Nulend J; Yin L; Van Waas M; Burger E. Transforming growth factor-beta1 incorporated in calcium phosphate cement stimulates osteotransductivity in rat calvarial bone defects. *Clin Oral Implants Res* 2001; 12(6): 609-616.
117. Aalami O; Nacamuli R; Lenton K; Cowan C; Fang T; Fong K; Shi Y; Song H; Sahar D; Longaker M. Applications of a mouse model of calvarial healing: differences in regenerative abilities of juveniles and adults. *Plast Reconstr Surg* 2004; 114(3): 713-720.

118. Opperman L. Cranial sutures as intramembranous bone growth sites. *Dev Dyn* 2000; 219(4): 472-485.
119. Van Luyn M; Van Wachem P; Leta R; Blaauw E; Nieuwenhuis P. Modulation of the tissue reaction to biomaterials. Part I. Biocompatibility of crosslinked dermal sheep collagens after macrophage depletion. *J Mater Sci: Mater Med* 1994; 5(9-10): 671-678.
120. Van Luyn M; Khouw M; Van Wachem P; Blaauw E; Werkmeister J. Modulation of the tissue reaction to biomaterials II. The function of T cells in the inflammatory reaction to crosslinked collagen implanted in T-cell-deficient rats. *J Biomed Mater Res* 1998; 39: 398-406.
121. Ophof R; Maltha J; Von Den Hoff J; Kuijpers-Jagtman A. Histologic evaluation of skin-derived and collagen-based substrates implanted in palatal wounds. *Wound Repair Regen* 2004; 12(5): 528-38.
122. Moghadam H; Sándor G; Holmes H; Clokie C. Histomorphometric evaluation of bone regeneration using allogeneic and alloplastic bone substitutes. *J Oral Maxillofac Surg* 2004; 62(2): 202-213.
123. Arnaud E; De Pollak C; Meunier A; Sedel L; Damien C; Petite H. Osteogenesis with coral is increased by BMP and BMC in rat cranioplasty. *Biomaterials* 2000; 20(20): 1909-1918.
124. Lim S; Lee M; Yeo H. Effects of various implant materials on regeneration of calvarial defects in rats. *Pathol Int* 2000; 50(8): 594-602.
125. Wong R; Rabie A. A quantitative assessment of the healing of intramembranous and endochondral autogenous bone grafts. *Eur J Orthod* 1999; 21: 119-126.
126. Shannon C. A mathematical theory of communication. *Bell System Technical J* 1948; 27(3): 379-423.
127. Chappard D; Legrand E; Pascaretti C; Baslé M; Audran M. Comparison of eight histomorphometric methods for measuring trabecular bone architecture by image analysis on histological sections. *Microsc Res Tech* 1999; 45(4-5): 303-312.

128. Chappard D; Legrand E; Baslé M; Fromont P; Racineux J; Rebel A; Audran M. Altered trabecular architecture induced by corticosteroids: A bone histomorphometric study. *J Bone Miner Res* 1996; 11(5): 676-685.
129. Fazzalari N; Parkinson I. Fractal dimension and architecture of trabecular bone. *J Pathol* 1996; 178(1): 100-105.
130. Weinstein R; Majundar S. Fractal geometry and compression fracture. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 1797-1802.
131. Geraets W; Van Der Stelt P. Fractal properties of bone. *Dentomaxillofac Radiol* 2000; 29(3): 144-153.
132. Chung H. On the fractal nature of trabecular bone. *Med Phys* 1994; 21(10): 1535-1540.
133. Yu J; Wright R; Williamson M; Braselton Iii J; Abell M. A fractal analysis of human cranial sutures. *Cleft Palate Craniofac J* 2003; 40(4): 409-415.
134. Sweeney T; Opperman L; Persing J; Oggle R. Repair of critical size rat calvarial defects using extracellular matrix protein gels. *J Neurosurg* 1995; 83: 710-715.
135. Merckx M; Maltha J; Freihofer H; Kuijpers-Jagtman A. Incorporation of particulated bone implants in the facial skeleton. *Biomaterials* 1999; 20(11): 2029-2035.
136. Mah J; Hung J; Wang J; Salih E. The efficacy of various alloplastic bone grafts on the healing of rat calvarial defects. *Eur J Orthod* 2004; 26(5): 475-482.
137. Kamakura S; Sasano Y; Shimizu T; Suzuki O; Kagayama M; Motegi K. Implanted octacalcium phosphate is more resorbable than beta-tricalcium phosphate and hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res* 2002; 59(1): 29-34.
138. Kamakura S; Sasano Y; Nakajo S; Shimizu T; Suzuki O; Fatou F; Kagayama M; Motegi K. Implantation of octacalcium phosphate combined with transforming growth factor-beta1 enhances bone repair as well as resorption of the implant in rat skull defects. *J Biomed Mater Res* 2001; 57: 175-182.

139. Merkx M; Maltha J; Freihofer H; Kuijpers-Jagtman A. Incorporation of three typer of bone block implants in the facial skeleton. *Biomaterials* 1999; 20(7): 639-645.
140. Sarkar M; Watcher N; Patka P; Kinzl L. First histological observations on the incorporation of a novel calcium phosphate bone substitute material in the human cancellous bone. *J Biomed Mater Res* 2001; 58(3): 329-334.
141. Merkx M; Maltha J; Freihofer H. Incorporation of composite bone implants in the facial skeleton. *Clin Oral Implants Res* 2000; 11(5): 422-429.
142. Alsberg E; Kong H; Hirano Y; Smith M; Albeiruti A; Mooney D. Regulating bone formation *via* controlled scaffold degradation. *J Dent Res* 2003; 82(11): 903-908.
143. Nerem R; Sambanis A. Tissue engineering: from biology to biological substitutes. *Tissue Eng* 1995; 1(1): 3-13.
144. Pollok J; Vacanti J. Tissue engineering. *Semin Pediatr Surg* 1996; 5(3): 191-196.
145. Lu J; Descamps M; Dejou J; Koubi G; Hardouin P; Lemaitre J; Proust J. The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone. *J Biomed Mater Res* 2002; 63B(4): 408-412.
146. Rossi M; Braile D; Teixeira M; Carillo S. Calcific degeneration of pericardial valvular xenografts implanted subcutaneously in rats. *Int J Cardiol* 1986; 12(3): 331-339.
147. Daamen W; Nillesen S; Hafmans T; Veerkamp J; Van Luyn M; Van Kuppevelt T. Tissue response of defined collagen-elastin scaffolds in young and adult rats with special attention to calcification. *Biomaterials* 2005; 26(1): 81-92.
148. Nakagawa T; Tagawa T. Ultrastructural study of direct bone formation induced by BMPs-collagen complex implanted into an ectopic site. *Oral Dis* 2000; 6(3): 172-179.
149. Sasano Y; Ohtani E; Narita K; Kagayama M; Murata M; Saito T; Shigenobu K; Takita H; Mizuni M; Kuboki Y. BMPs induce direct bone formation in ectopic sites independent of the endochondral ossification *in vivo*. *Anat Rec* 1993; 236(2): 373-380.

150. Murata M; Huang B; Shibata T; Imai N; Arisue M. Bone augmentation by recombinant human BMP-2 and collagen on adult rat parietal bone. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1999; 28(3): 232-237.
151. Goissis G; Maginador S; Martins V. Biomimetic mineralization of charged collagen matrices: *in vitro* and *in vivo* study. *Artif Organs* 2003; 27(5): 437-443.
152. Glimcher M. Mechanism of calcification: Role of collagen fibrils and collagen-phosphoprotein complexes *in vitro* and *in vivo*. *Anat Rec* 1989; 224(2): 139-153.
153. Chapman J; Tzaphlidou M; Meek K. The collagen fibril - a model system for studying the staining and fixation of a protein. *Electron Microsc Rev* 1990; 3(1): 143-182.
154. Kuschert G; Coulin F; Power C; Proudfoot A; Hubbard R; Hoogewerf A; Wells T. Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses. *Biochemistry (Mosc)* 1999; 38(39): 12959-12968.
155. Lortat-Jacob H; Grimaud J. Binding of interferen-gamma to heparan sulfate is restricted to the heparin-like domains and involves carboxylic but not sulfated groups. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1117(2): 126-130.
156. Patel D; Koopmann W; Imai T; Whichard L; Yoshie O; Krangel M. Chemokines have diverse abilities to form solid phase gradients. *Clin Immunol* 2001; 99(1): 43-52.
157. Witt D; Lander A. Differential binding of chemokines to glycosaminoglycans subpopulations. *Curr Biol* 1994; 4(5): 394-400.
158. Chintala S; Miller R; Mcdevitt C. Basic fibroblast growth factor binds to heparan sulfate in the extracellular matrix of rat growth plate chondrocytes. *Arch Biochem Biophys* 1994; 310(1): 180-186.
159. Shelton R; Rasmussen A; Davies J. Protein adsorption at the interface between charged polymer substrata and migrating osteoblasts. *Biomaterials* 1988; 9: 24-29.
160. Birnbaum R; Bowsher R; Wiren K. Changes in IGF-I and IGF-II expression and secretion during the proliferation and differentiation of normal rat osteoblasts. *J Endocrinol* 1995; 144(2): 251-259.

-
161. McCarthy T; Centrella M. Local IGF-I expression and bone formation. *Growth Horm IGF Res* 2001; 11(4): 213-219.
 162. Ahrens M; Ankenbauer T; Schroder D; Hollnagel A; Mayer H; Gross G. Expression of human bone morphogenetic proteins-2 and -4 in murine mesenchymal progenitor C3H10T1/2 cells induces differentiation into distinct mesenchymal lineages. *DNA Cell Biol* 1993; 12(10): 871-880.
 163. Rosen V; Cox K; Hattersley G. Bone morphogenetic proteins. In: Bilezikian J, Raisz L, Rodan G, editors. *Principles of bone biology*. San Diego: Academic Press; 1996. p. 661-671.

10. Anexo

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)