

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**RUY ROCHA GUSMAN**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL OSTEOINTEGRATIVO DE BIOMATERIAL ÓSSEO**

VITÓRIA

2019

RUY ROCHA GUSMAN

## **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL OSTEOINTEGRATIVO DE BIOMATERIAL ÓSSEO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof.Dr. Breno Valentim Nogueira

VITÓRIA  
2019

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

Gusman, Ruy Rocha, 1612-  
G982a Avaliação do potencial osteointegrativo de biomaterial  
ósseo / Ruy Rocha Gusman. - 2019  
51f.: il.

Orientador: Breno Valentim Nogueira.  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade  
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1.Osso fetal. 2.Enxerto ósseo. 3.Xenoenxerto.  
4. Biomaterial. 5. Osteointegração  
I. Nogueira, Breno Valentim, 1979-. II. Universidade  
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde  
III. Título

---

**RUY ROCHA GUSMAN**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL OSTEOINTEGRATIVO DE BIOMATERIAL ÓSSEO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 23 de Setembro de 2019

**COMISSÃO AVALIADORA:**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia de Paula  
Examinador interno

---

Prof. Dr. Jones Bernardes Graceli  
Examinador interno

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Camille de Moura Balarini  
Examinador externo

---

Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira  
Orientador

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda minha família, pelo apoio baseado sobretudo no principal valor da nossa convivência: a união. Especialmente a minha esposa Ana Marcia e as minhas filhas Isabel e Vitória.

Agradeço também ao professor, amigo e incentivador, Breno Valentim Nogueira, pela oportunidade, orientação, ensinamentos científicos e pessoais.

Ao amigo e parceiro da ortopedia, o Dr. Gilberto Malta Leite, que havia planejado iniciar o seu mestrado junto comigo, e contribuiu com material de estudo na elaboração das hipóteses desta dissertação, mas problemas de saúde o impediram de seguir na nossa jornada.

A Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC), aos Laboratórios de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR) e Multiusuário de Análises Biomoleculares (LABIOM), e ao Laboratório de Biotecnologia do IFES de Vila Velha - ES, com todos os seus pesquisadores.

A bióloga, Priscilla Spadeto Altoé, do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Experimental, sem a qual não seria possível parte das avaliações desta dissertação.

Ao pesquisador e mestre Rodolpho José da Silva Barros; e ao doutorando Gabriel Henrique Taufner, meu maior parceiro, sem os quais não seria possível a conclusão deste trabalho. Também aos pesquisadores do LUCCAR por toda a atenção e incentivo

Aos demais membros da banca, Professora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia de Paula, Prof. Dr. Jones Bernardes Graceli e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Camille de Moura Balarini, muito obrigado.

## RESUMO

GUSMAN. R.R. Avaliação do potencial osteointegrativo de biomaterial ósseo. 2019. 57f. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

A necessidade crescente de utilização de enxertos ósseos, principalmente relacionados com as cirurgias ortopédicas e odontológicas, está gerando a necessidade da produção de novos biomateriais. Diante desta necessidade o emprego de xenoenxerto tem sido uma alternativa como biomaterial. A utilização de enxerto ósseo mais jovens, que forneçam fatores primitivos envolvidos no desenvolvimento ósseo, poderiam induzir uma regeneração óssea mais eficiente, o que pode ser encontrado utilizando-se enxerto ósseo de origem fetal. Objetivou-se testar a osteointegração de um biomaterial ósseo descelularizado produzido a partir de osso fetal bovino tratado com SDS 0,5% para utilização em biogênese tecidual. Para testar a osteointegração foi realizada a aplicação de enxertos em orifícios craniais em ratos. Posteriormente foram utilizadas técnicas de coloração histoquímica e de microscopia óptica, bem como a avaliação quantitativa do colágeno pelo programa ImageJ. Não houve diferenças estatísticas entre os diferentes grupos avaliados, independentemente do tipo de enxerto utilizado (FC : Fetal controle ou celularizado, FD : Fetal descelularizado, AC : Adulto controle ou celularizado, AD : Adulto descelularizado), e do tempo de eutanásia dos animais (2 ou 4 semanas). Mesmo para os animais que não receberam enxerto (Vazio : VZ), não houve significância estatística para os mesmos períodos de eutanásia citados. Porém a avaliação qualitativa pela microscopia óptica demonstrou uma disposição das fibras colágenas no sentido longitudinal e paralelas fazendo a união entre os ossos remanescentes (no local onde foi realizado o orifício no crânio dos animais), e também a formação de cartilagem nos orifícios craniais dos grupos descelularizados. Isso parece demonstrar um potencial dos xenoenxertos tratados com SDS 0,5% para funcionarem como biomateriais no futuro. Novas avaliações serão necessárias para a confirmação deste potencial.

Palavras-chave: Osso fetal. Enxerto ósseo. Xenoenxerto. Biomaterial.  
Osteointegração.

## ABSTRACT

GUSMAN. R.R. Evaluation of osteointegrative potential of bone biomaterial. 2019. 57f. Dissertation of Master in Biotechnology – Postgraduation Biotechnological Programme, UFES, Espírito Santo. Brazil.

The growing need for the use of bone grafts, mainly related to orthopedic and dental surgery, is generating the need for production of new biomaterials. Given this need, the use of xenograft as been an alternative as biomaterial. The use of younger bone grafts, which provide primitive factors involved in bone development, could induce more efficient bone regeneration, which can be found using fetal bone grafts. The objective of this study was to test the osteointegration of a decellularized bone biomaterial produced from 0,5% SDS treated bovine fetal bone for use in tissuebio-engineering. To test osteointegration, grafts were applied to cranial holes in rats. Subsequently histochemical stain in gand optical microscopy techniques were used, as well as quantitative collagene valuation by Image J softwere. There was no statistical differences between the different groups evaluated, regardless of the type of graft used (FC: Celularized Fetal - Control, FD: Decellularized Fetal, AC: Celularized Adult – Control, AD: Decellularized Adult) and the animals eutanásia time (2 or 4 weeks). Even for animals that did not recived graft (VZ: Void), there was no statistical significance for the same euthanasia periods mentioned. However, the qualitative evaluation by optical microscopy showed an arrangement to collagen fibers in the longitudinal and parallel direction, joining there main bones (where the holes were made in the skull of the animals), and also the formation of cartilage in the cranial holes in the decellularized groups. It seems to show a potencial of SDS 0,5% treated xenograft to function as biomaterial in the future. New evaluations will be required to confirm this potencial.

Keywords: Fetal bone. Bonegraft. Xenograft. Biomaterial. Osteointegration.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Imagens de fotografias da broca trefina de 2 mm com “stop” ósseo e mandril, e orifícios realizados nos ossos parietais dos animais.....26

**Figura 2:** Imagens de microscopia óptica das amostras de enxerto coradas com tricrômio de Masson- Goldner. Vazio - VZ, Adulto Controle (celularizado) – AC, Adulto Descelularizado – AD, Fetal Controle (celularizado) – FC e Fetal Descelularizado – FD; com eutanásia em 2 e em 4 semanas. Observar a formação de tecido cartilaginoso representadas em azul claro e rosa (setas brancas). Coloração por tricrômio de Masson – Goldner. Barra de escala: 50µm .....34

**Figura 3:** Imagens de microscopia óptica das amostras de enxerto coradas com picrossirius e tricrômio de Masson- Goldner. Vazio - VZ, Adulto Controle (celularizado) – AC, Adulto Descelularizado – AD, Fetal Controle (celularizado) – FC e Fetal Descelularizado – FD; com eutanásia em 2 semanas. Observar a disposição longitudinal e o paralelismo das fibras colágenas (setas brancas), representadas em vermelho na coloração por picrossirius e em verde azulado na coloração por tricrômio de Masson – Goldner. Barra de escala: 200µm.....37

**Figura 4:** Imagens de microscopia óptica das amostras de enxerto coradas com picrossirius e tricrômio de Masson- Goldner. Vazio - VZ, Adulto Controle (celularizado) – AC, Adulto Descelularizado – AD, Fetal Controle (celularizado) – FC e Fetal Descelularizado – FD; com eutanásia em 4 semanas. Observar a disposição longitudinal e o paralelismo das fibras colágenas (setas brancas), representadas em vermelho na coloração por picrossirius e em verde azulado na coloração por tricrômio de Masson – Goldner. Barra de escala: 200µm.....38

**Figura 5.** Imagens de microscopia óptica das amostras de enxerto coradas com picrosirius para animais que não receberam enxerto com eutanásia em 2 e em 4 semanas VZ2 e VZ4.....40

**Figura 6.** Gráfico apresentando concentração de colágeno em  $\text{mm}^2$  nos animais que não receberam enxerto (VZ) com eutanásia em 2 e em 4 semanas.....39

**Figura 7.** Imagens de microscopia óptica das amostras de enxerto coradas com picrosirius para animais que receberam enxerto adulto controle (celularizado) com eutanásia em 2 e em 4 semanas AC2 e AC4.....41

**Figura 8.** Gráfico apresentando concentração de colágeno em  $\text{mm}^2$  nos animais que receberam enxerto adulto controle (celularizado) (AC) com eutanásia em 2 e em 4 semanas.....41

**Figura 9.** Imagens de microscopia óptica das amostras de enxerto coradas com picrosirius para animais que receberam enxerto adulto descclularizado com eutanásia em 2 e em 4 semanas AD2 e AD4.....42

**Figura 10.** Gráfico apresentando concentração de colágeno em  $\text{mm}^2$  nos animais que receberam enxerto adulto descclularizado (AD) com eutanásia em 2 e em 4 semanas.....42

**Figura 11.** Imagens de microscopia óptica das amostras de enxerto coradas com picrosirius para animais que receberam enxerto fetal controle (celularizado) com eutanásia em 2 e em 4 semanas FC2 e FC4.....43

**Figura 12.** Gráfico apresentando concentração de colágeno em  $\text{mm}^2$  nos animais que receberam enxerto fetal controle (celularizado) (FC) com eutanásia em 2 e em 4 semanas.....43

**Figura 13:** Imagens de microscopia óptica das amostras de enxerto coradas com picrosirius para animais que receberam enxerto fetal descelularizado com eutanásia em 2 e em 4 semanas FD2 e FD4.....44

**Figura 14:** Gráfico apresentando concentração de colágeno em  $\text{mm}^2$  nos animais que receberam enxerto fetal descelularizado (FD) com eutanásia em 2 e em 4 semanas.....44

**Figura 15:** Gráfico apresentando concentração de colágeno em  $\text{mm}^2$  nos orifícios que receberam diferentes tipos de enxerto e orifícios que não receberam enxerto. Animais sofreram eutanásia em 2 semanas.....45

**Figura 16:** Gráfico apresentando concentração de colágeno em  $\text{mm}^2$  nos orifícios que receberam diferentes tipos de enxerto e orifícios que não receberam enxerto. Animais sofreram eutanásia em 4semanas.....45

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Tabela apresentando o número de animais sobreviventes após a cirurgia para implantação dos enxerto, tipo de enxerto empregado e o tempo para a eutanásia.....28

**Tabela 2:** Tabela apresentando os valores médios das densidades ósseas nos orifícios que receberam diferentes tipos de enxertos (AC2, AD2, FC2, FD2, AC4, AD4, FC4 e FD4), e em orifícios que não receberam enxerto (VZ2 e VZ4). Também apresenta a densidade óssea controle realizada no osso frontal dos crânios avaliados. Avaliação das calotas cranianas.....29

## LISTA DE SIGLAS

AC	Adulto Controle ou celulerizado
AD	Adulto Descelularizado
DCS	Deocil Sulfato de Sódio
FC	Fetal Controle ou celulerizado
FD	Fetal Descelularizado
HCl	Ácido Clorídrico
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
NaClO	Hipoclorito de sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
VZ	Vazio
DCS	Deocil Sulfato de Sódio

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>24</b>
3.1 Osso bovino.....	24
3.2 Preparo do enxerto.....	24
3.3 Seleção dos animais.....	26
3.4 Cirurgia.....	26
3.5 Aplicação do enxerto.....	27
3.6 Eutanásia.....	27
3.7 Avaliação da densidade óssea.....	28
3.8 Fixação e processamento histológico.....	30
3.9 Avaliação histológica das lâminas.....	31
3.10 Análise estatística.....	32
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>33</b>
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>47</b>

## 1 Introdução:

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo constituído por cristais de fosfato de cálcio, sob a forma de hidroxiapatita, associado com uma matriz de colágeno. Esta combinação mineral e orgânica confere ao tecido ósseo propriedades únicas, que o tornam muito resistente às solicitações mecânicas. Quando lesados têm capacidade regenerativa, isto é, o processo de reparação óssea é efetuado através da formação de osso novo e não pela formação de tecido fibroso. As células do tecido ósseo podem ser agrupadas em duas séries diferentes: células da linha osteoblástica, responsáveis pelo processo de formação e mineralização da matriz óssea e células da linha osteoclástica, relacionadas com a sua reabsorção (JUDAS, F et al, 2012).

O tecido ósseo é constituído por uma matriz extracelular formada por células, colágeno tipo I, proteoglicanos, proteínas não colágenas e lipídios, que correspondem aproximadamente, a 25% do seu peso. Uma fração mineral inorgânica de hidroxiapatita, correspondente a 65% do seu peso, e outros 10% de água (GALIA, 2004; CASTRO-CESEÑA *et al.*, 2013.).

Muitos procedimentos ortopédicos e odontológicos estão associados com falhas ósseas, que necessitam reconstruções da estrutura do osso afetado. Essas reconstruções podem ser reparadas, utilizando-se substitutos ósseos (SMITH, C.A. et al, 2015.).

Os traumas ortopédicos correspondem a 33 milhões de atendimentos por ano nos Estados Unidos, sendo a causa mais comum para afastamento laboral. Problemas ortopédicos são os mais frequentes nos serviços de emergência. Dentre estes, mais de 1,5 milhão de fraturas de ossos longos são socorridas a cada ano (CHENG; SOLORIO; ALSBERG, 2014.).

### **1.1 Enxerto ósseo:**

A história do enxerto ósseo começa em 1913, quando o Dr. D.E. Robertson testou um pedaço de osso de gato e um pedaço de osso humano pra enxertar cães (FICAI, Anton et al., 2009).

Na ortopedia, as falhas ósseas continuam sendo um desafio para a cirurgia ortopédica. Os grandes defeitos, não se regeneram espontaneamente ao longo do tempo de vida do paciente, o que pode levar a dor, imobilidade, incapacidade funcional e deformidade severa (FERNANDEZ-YAGUE *et al.*, 2015.).

Os biomateriais materiais mais utilizados como substitutos ósseos, são de origem humana ou animal. São destinados a reconstituição óssea ou para o preenchimento de uma perda óssea. O autoenxerto é aquele osso colhido do próprio indivíduo. O aloenxerto (ou enxerto homólogo) é proveniente de indivíduos diferentes da mesma espécie (estão disponíveis em bancos de ossos). Os xenoenxertos são enxertos provenientes de outras espécies animais, por exemplo bovinos (GUTIERRES, 2005).

Como substitutos ósseos encontramos enxerto ósseo homólogo, autólogo ou xenólogo. O enxerto autólogo é considerado o “goldstandart” por ser o enxerto biologicamente mais biocompatível, entretanto as grandes perdas ósseas, devido a quantidade insuficiente deste enxerto, tornam necessárias novas alternativas para obtenção de enxerto. (SMITH, C.A. et al, 2015.).

O enxerto ósseo autólogo utilizado em cirurgias bucomaxilofaciais se mostrou superior aos demais materiais de preenchimento ósseo (maior atividade osteogênica). Todos os substitutos ósseos demonstraram capacidade osteocondutora, porém, com qualidade superior do tecido ósseo neoformado quando utilizando-se enxerto autólogo. (SILVA, R.B.P. et al, 2017).

Os tratamentos atualmente encontrados para grandes defeitos ósseos são desafiadores na medicina. A utilização de enxertos autólogos e homólogos configuram entre as mais utilizados, porém são procedimentos custosos e invasivos, possuem desvantagens que devem sempre ser levadas em consideração. (HUTMACHER, 2006; FERNANDEZ-YAGUE *et al.*, 2015.)

Ratos foram submetidos à confecção de defeitos ósseos de 5mm no osso parietal e distribuídos em 4 grupos utilizando-se enxerto ósseo autógeno particulado, vitrocerâmica bioativa, fosfato de cálcio bifásico e osso bovino desproteínizado. Após eutanásia e análise por microscopia a maior atividade osteogênica foi observada no grupo que utilizou enxerto ósseo autógeno. A superioridade do enxerto ósseo autógeno. A vitrocerâmica resultou em menor volume ósseo. O fosfato de cálcio e o enxerto bovino desproteínizado apresentaram resultados bastante semelhantes, com formação de menor quantidade de trabéculas em comparação com o grupo enxerto autógeno. Todos os substitutos ósseos demonstraram capacidade osteocondutora, porém, influenciando a qualidade do tecido ósseo neoformado (SILVA, R. B. P. *et al.*, 2017).

Muitos estudos buscam por biomateriais que possibilitem a formação de tecido ósseo satisfatório nas reconstruções das perdas ósseas. Alguns destes materiais utilizados comercialmente são: vitrocerâmica bioativa (Biosilicato®); fosfato de cálcio bifásico (BoneCeramic®) e osso bovino desproteínizado (Bioosso®) (SILVA, R.B.P. *et al.*, 2017).

A necessidade de enxerto ósseo para substituir defeitos esqueléticos tornou-se mais prevalente recentemente principalmente para correção de grandes perdas ósseas. Existem muitas opções de enxerto ósseo disponíveis, seja de estrutura cortical ou esponjosa, cada uma com propriedades biológicas e mecânicas específicas. A compreensão dos eventos biológicos e aspectos biomecânicos dos enxertos é importante na compreensão dos processos que influenciam a incorporação do enxerto ósseo no esqueleto do hospedeiro (BURCHARDT, H.A.N.S, 1987).

O substituto ósseo deve possuir características que o tornem biologicamente compatíveis. A osteocondução é a capacidade de um substituto ósseo fornecer uma arquitetura tridimensional adequada que permita o crescimento de capilares, tecido perivascular e células osteoprogenitoras no local de implante. A osteoindução se refere a capacidade do substituto ósseo estimular o recrutamento de células ósseas imaturas para o local de utilização, e a partir de alguma substância (fator) presente, promover a diferenciação dessas células em osteoblastos. Conseqüentemente, a osteogênese é a capacidade que o dispositivo apresenta para permitir que células osteoprogenitoras se diferenciam em osteoblastos maduros que produzem de fato o tecido ósseo mineralizado. Por fim, a osteointegração, que pode ser compreendida como a capacidade de um biomaterial ser fixado de maneira definitiva, rígida, clinicamente assintomática e funcional ao osso (MOORE *et al.*, 2011.).

Em odontologia a principal aplicação da enxertia óssea está relacionada com os implantes dentários (ELIAS; VASCONCELLOS; RESENDE, 2012.).

Enquanto que na ortopedia, o número crescente de revisões em artroplastias, perdas ósseas relacionadas ao trauma e as cirurgias de ressecção de tumores ósseos, são as que mais necessitam de enxerto ósseo. (FERNANDEZ-YAGUE *et al.*, 2015.)

O xenoenxerto apresenta vantagens em relação ao autoenxerto e ao aloenxerto. Além da possibilidade de fornecer um grande volume de enxerto, evita o procedimento cirúrgico para retirada de osso de um doador, o que evita os riscos de infecções e as alterações da estrutura óssea doadora, que ocorreriam com a cirurgia para a retirada do enxerto (CHAPPARD *et al.*, 1993.).

Avanços na engenharia de tecidos e a integração das ciências biológicas, físicas e de engenharia, criarão novas possibilidades de substitutos ósseos que se desenvolverão associados com a utilização de células-tronco mesenquimais. O futuro parece indicar a capacidade de fabricar ossos com as

características biomecânicas apropriadas através da engenharia de tecidos para utilização direta no sistema esquelético. (PARIKH, S. N. et al., 2002).

## **1.2 Xenoenxerto:**

Pesquisadores, através da bioengenharia de tecidos, realizam investigações de terapias eficazes para o tratamento de insuficiências ósseas com foco no desenvolvimento de substitutos para o tecido ósseo, desde os anos 1990. (ACCORSI-MENDONÇA *et al.*; RUSSELL *et al.*, 2012).

Apesar dos avanços nas pesquisas, poucos são os biometariais que apresentam características biológicas que resultam em soluções efetivas.(HUTMACHER, 2006; FERNANDEZ-YAGUE *et al.*, 2015.).

Os critérios que um substituto ósseo ideal deve possuir, deverá atender a princípios fundamentais de segurança para utilização, bem como previsibilidade, reprodutibilidade e claro efetivar a regeneração do tecido ósseo. Deve ainda, apresentar qualidades específicas para o tecido ósseo como propriedades de osteocondução, osteoindução, osteogênese e osteointegração (GHANAATI *et al.* 2014.).

O xenoenxerto ósseo bovino liofilizado tem sido utilizado como opção para correção dos defeitos ósseos (BI et al, 2013; BIGHAM-SADEGH et al, 2013.).

Na área da ortopedia, destaca-se o crescente número de cirurgias de revisão acetabular em artroplastia total do quadril que utiliza enxerto ósseo bovino liofilizado (DIESEL et al, 2017.).

Os enxertos xenógenos são obtidos a partir de ossos animais, e devidamente tratados, para não haver risco de imunogenicidade, podem apresentar propriedades potenciais de osteoindução e osteocondução que são características desejáveis para um substituto ósseo (BI *et al.*, 2013.).

Estudos buscam um osso bovino, que mantenha a sua arquitetura trabecular e porosa. Isso irá permitir um alto potencial osteocondutivo, promovendo a invasão de vasos sanguíneos e células ósseas que conseqüentemente induzem a ossificação(CASTRO-CESEÑA *et al.*, 2013.)

A descelularização dos enxertos ósseos permitem o desenvolvimento de um biomaterial de implante que apresenta maior especificidade tecidual. Isso favorece a atividade celular e potencializa a regeneração óssea no local de enxerto (BENDERS *et al.*, 2013; BROWN; BADYLAK, 2014 CHENG; SOLORIO; ALSBERG, 2014.).

### **1.3 Tratamento do xenoenxerto:**

O métodos de tratamento para enxertos ósseos recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) utiliza o hidróxido de sódio (NaOH), hipoclorito de sódio (NaClO) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)(SCHALLER *et al.*, 1999; BI *et al.*, 2013).

Verificou-se que o uso de NaOH e NaClO induzem mudanças na arquitetura e conteúdo mineral dos biomateriais tratados, levando a perdas nas propriedades estruturais, mecânicas e até biocompatíveis de ossos esponjosos tratados.(BROZ *et al.*, 1997; BI *et al.*, 2013.).

Os tratamentos convencionais de desproteinização óssea são realizados com lavagens em soluções alcalinas e em altas temperaturas, que de maneira agressiva, promove a remoção dos componentes orgânicos do osso. Neste processo, são perdidas substâncias que participam da matriz óssea orgânica e atuam como fatores estimulantes para a regeneração tecidual, restando como biomaterial de implante os componentes da matriz óssea inorgânica (GRUSKIN *et al.*, 2012; GHANAATI *et al.*, 2014.).

Alguns xenoenxertos comerciais são enxertos de origem bovina desmineralizados com ácido clorídrico (em 0,6mol/l HCl a 4°C / 8 dias). A desmineralização com HCl diminui a estimulação antigênica e não se mostrou histologicamente superior ao xenoenxerto bovino adulto com matriz óssea desmineralizada comercial, apesar de demonstrar superioridade radiológica no modelo com cães (BIGHAM-SADEGH, A. *et al.*, 2013).

Caso a arquitetura óssea presente nos materiais resultantes desses tratamentos seja alterada, haverá uma redução na resistência mecânica do enxerto que comprometem as atividades de adesão osteoblástica e de diferenciação *in vitro* e *in vivo* nos biomateriais (BROZ *et al.*, 1997; RUSSELL *et al.*, 2012; BI *et al.*, 2013; GHANAATI *et al.*, 2014; MESQUITA *et al.*, 2015.)

A descelularização de tecido ósseo fetal bovino e tecido ósseo adulto bovino tratado com Deocil Sulfato de Sódio (SDS) 0,5%, manteve características morfoestruturais semelhantes as observadas no tecido anterior ao tratamento. Houve a manutenção de componentes da matriz extracelular óssea como colágeno, glucosaminoglicanos e glicoproteínas. Comparando-se com o enxerto ósseo comercial, a matriz descelularizada de tecido ósseo produzida demonstrou possuir características morfológicas que lhe candidatam como um possível biomaterial para substituição óssea. (BARROS, 2018.)

#### 1.4 Xenoenxerto fetal:

A utilização de enxerto ósseo mais jovens, que forneçam fatores primitivos envolvidos no desenvolvimento ósseo, poderiam induzir uma regeneração óssea mais eficiente (PAPADIMITROPOULOS *et al.*, 2015.).

A matriz óssea fetal possui diferenças de substâncias, sinalização ou estrutura, que modulam a atividade celular de maneira diferente da matriz adulta (CHIM *et al.*, 2013; KUSUMBE; RAMASAMY; ADAMS, 2014; WILLIAMS *et al.*, 2014.).

Existem diferenças entre a matrix óssea fetal e adulta. Proteínas não colágenas como a sialoproteína e a osteopontina, são proteínas que apresentam diferentes expressões nos ossos adultos e fetais. Estas proteínas, produzidas pelos osteoblastos, são necessárias para iniciar a mineralização óssea (BIANCO *et al.*,1991; FISHER *et al.*, 1983; ROACH *et al.*,1994).

Alguns marcadores de formação óssea são utilizados para avaliação do metabolismo ósseo. Marcadores de formação de colágeno, como o propeptídeo procolágeno I carboxiterminal (PICP) funciona como indicador de formação óssea na criança, porém não é utilizado para adultos devido a menor formação óssea (SZULC, P. S. E. *et al.*,2000).

A utilização de células tronco de cordão umbilical estimularam a regeneração óssea em defeitos craniais (realizados com trefina de 8,0mm na calvária) em ratos machos com 8 semanas de idade e com peso entre 250-250g, e que sofreram eutanásia com 12 semanas após a cirurgia (WAMG, P. *et al.*, 2015).

Células ósseas primárias fetais humanas podem ser de grande interesse para a pesquisa óssea, devido à sua taxa de crescimento rápido e sua capacidade de se diferenciar em osteoblastos maduros. Eles representam um potencial interessante e promissor para uso terapêutico na engenharia de tecido ósseo. (MONTJOVENT, M.; *et al.*,2004).

Células tronco mesenquimais retiradas da medula óssea fetal apresentaram um maior potencial osteogênico, quando comparadas com células tronco mesenquimais retiradas de cordão umbilical e de tecido adiposo(ZHANG,Z. et al., 2009).

Em coelhos, a reparação de um defeito esternal da parede torácica com um enxerto ósseo autólogo manipulado com células-tronco mesenquimais amnióticas, levou a resultados melhores e mais consistentes quando comparado com um reparo acelular. A engenharia óssea derivada do líquido amniótico pode se tornar uma alternativa prática para a reconstrução óssea. (KLEIN, J. D. et al.,2010).

Os enxertos ósseos sintéticos enriquecidos com células tronco mesenquimais, aplicados em defeitos femorais (7 mm) em ratos, demonstraram uma maior neovascularização com formação óssea de melhor qualidade, quando comparado com enxerto ósseo não enriquecido (ZHANG,Z. et al., 2010).

O xenoenxerto bovino fetal com matriz óssea desmineralizada, não se mostrou histologicamente superior ao xenoenxerto bovino adulto com matriz óssea desmineralizada comercial, apesar de demonstrar superioridade radiológica no modelo com cães (BIGHAM-SADEGH, A. et al., 2013).

A matriz óssea fetal apresenta características próprias que se diferenciam da matriz óssea adulta. A necessidade de encontrar-se biomateriais para serem utilizados como enxerto ósseo motivaram o presente estudo a desenvolver um enxerto ósseo utilizando-se tecido ósseo fetal bovino. Este biomaterial poderá servir, futuramente, para utilização em cirurgias ortopédicas e odontológicas.

## **2 Objetivos:**

### Objetivo geral

1-Desenvolver um biomaterial a partir de osso fetal bovino descelularizado que funcione como substituto ósseo para ser utilizado como enxerto ósseo em cirurgias de reconstrução óssea.

### Objetivos específicos

1-Testar a osteointegração do enxerto bovino fetal e adulto descelularizados com Deocil Sulfato de Sódio 0,5%

2- Testar a osteointegração do enxerto bovino fetal e adulto não descelularizados.

### **3 Metodologia:**

O presente estudo foi desenvolvido junto ao grupo de pesquisa em bioengenharia tecidual do Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR), com sede no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (CCS-UFES), com autorização prévia para experimentação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES – 48/2018)

#### **3.1 Osso bovino:**

Foram utilizados ossos de fetos bovinos (com sete e oito meses de desenvolvimento) e de bovinos adultos coletados no frigorífico Mafrical em Cariacica-ES, certificado e inspecionado pelo SIF – Serviço de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura e Abastecimento. Dos ossos fetais foram selecionados os centros de ossificação da região metafisária distal do fêmur e proximal da tíbia. Dos ossos adultos foram selecionados o osso esponjoso da mesma região. Os fragmentos ósseos foram serrados com serra circular com diâmetros de aproximadamente 2,0 - 3,0 cm e com espessura aproximada de 0,5 cm e lavados em água corrente. Foram então conservados em freezer ( - 80°C).

#### **3.2 Preparo do enxerto:**

Um grupo de enxerto ósseo fetal e adulto foi submetido ao processo de descélularização. Enquanto outro grupo de enxerto ósseo fetal e adulto, não sofreu processo de descélularização.

Para o processo de descélularização os fragmentos foram tratados por imersão em 400 mL de solução tampão Tris-HCl (10 mM, pH 7,8) contendo SDS (Docecil Sulfato de Sódio) 0,5% e Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA) 0,1%, sob agitação contínua em plataforma orbital (300 rpm), à temperatura ambiente, durante 72 horas. As soluções foram trocadas a cada 24 horas.

Após finalizado o tempo de tratamento proposto para a descélularização, as amostras foram lavadas em solução tampão PBS para remoção de resíduos, duas vezes, por 30 minutos, e em seguida, foram secas em estufa a 37°C durante 48 horas. Após secagem, utilizando-se um micromotor elétrico (LB100, Beltec) acoplado com broca trefina (6,2 mm), foram removidas amostras ósseas cilíndricas de 0,6 cm diâmetro e 0,5 cm de espessura.

Para os enxertos ósseos celularizados utilizando-se um micromotor elétrico (LB100, Beltec) acoplado com broca trefina (6,2 mm), também foram removidas amostras ósseas cilíndricas de 0,6 cm diâmetro e 0,5 cm de espessura.

As amostras cilíndricas foram então separados em 4 grupos : Adulto controle ou celularizado (AC), Adulto descélularizado (AD), Fetal controle ou celularizado (FC) e Fetal descélularizado (FD);

Todos as amostras cilíndricas foram levadas para serem transformadas em pó no laboratório de Biotecnologia do IFES de Vila Velha-ES, As amostras foram colocadas em tubos de polipropileno de 2mL com tampa rosqueável (FastPrep®, Qbiogene), contendo 1 mL de solução PBS(pH 7,4) e uma esfera cerâmica (FastPrep®, Qbiogene). Os tubos preparados foram processados em homogeneizador de amostras (Modelo FASTPREP-24™ 5G, MP BIOMEDICALS), sob velocidade calibrada (6 m/s), em quatro ciclos de 30 segundos de duração. Entre cada ciclo, os tubos contendo as amostras foram refrigerados em gelo durante cinco minutos (SARAH BECK-CORMIER, [S.d.]). Após a homogeneização, as amostras foram secas em equipamento liofilizador (Modelo L101, Liotop®) durante 24 horas, no Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares (LABIOM) do Centro de Ciências da Saúde – CCS/UFES.

Após a transformação dos cilindros em pó obteve-se os enxertos dos 4 grupos citados. Todos foram pesados e divididos em amostras para obter-se 0,04g de cada um dos tipos de enxertos.

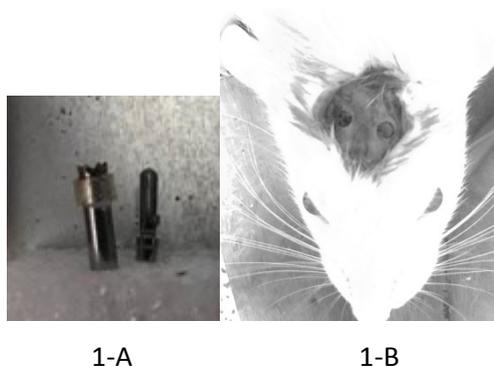
### 3.3 Seleção dos animais:

Foram selecionados 50 ratos machos com idade de 8 semanas (adulto jovem) e com peso aproximado de 250-300 g.

Durante o pós-operatório imediato, houve morte de alguns dos animais operados, o que levou a formação de grupos heterogêneos quanto ao número de indivíduos. O número total de animais avaliados foi de 43 indivíduos.

### 3.4 Cirurgia:

Os ratos para serem submetidos ao procedimento cirúrgico foram submetidos a anestesia geral com o uso de Ketamina (75mg/Kg de peso) e com Xylazina (10mg/Kg de peso). Foi realizado uma incisão central longitudinal com aproximadamente 2,5cm no crânio dos animais. O periósteo foi afastado e realizado um orifício utilizando-se micromotor elétrico (LB100, Beltec) acoplado com broca com trefina de 2,0mm em cada um dos ossos parietais dos animais. Durante a confecção do orifício foi utilizado solução salina para resfriamento do osso (Figura 1-A e 1-B).



**Figura 1:** A- Broca trefina de 2 mm com “stop” ósseo e mandril, e B- orifícios realizados nos ossos parietais dos animais.

### **3.5 Aplicação do enxerto:**

Nos orifícios do crânio dos animais foram colocados 0,04 g de enxerto da seguinte forma : Nos grupos 1 e 6o orifício esquerdo não recebeu enxerto, e o orifício direito recebeu enxerto adulto descelularizado (AD). Nos grupos 2 e 7 o orifício esquerdo não recebeu enxerto, e o orifício direito recebeu enxerto fetal descelularizado (FD). Nos grupos 3 e 8 o orifício esquerdo recebeu enxerto adulto descelularizado (AD), e o orifício direito recebeu enxerto fetal descelularizado (FD). Nos grupos 4 e 9 o orifício esquerdo recebeu enxerto adulto controle ou celularizado (AC), e o orifício direito recebeu enxerto adulto descelularizado (AD). Nos grupos 5 e 10 o orifício esquerdo recebeu enxerto fetal controle ou celularizado (FC), e o orifício direito recebeu enxerto fetal descelularizado (FD). (Tabela 1)

### **3.6 Eutanásia:**

O tempo para a eutanásia foi decidido para ser realizado em 2 e 4 semanas, pois no período de 2 semanas é quando se forma o calo ósseo e em 4 semanas é o período para consolidação das fraturas em ratos adultos (PERIC, M. et al, 2015).

Os animais dos grupos 1, 2, 3, 4 e 5 sofreram eutanásia após 4 semanas da cirurgia para implantação dos enxertos. As calotas cranianas dos animais do foram conservados em PBL-Formaldeido 2%e posteriormente enviadas para confecção de lâminas para estudo histológico. Osanimais dos grupos 6, 7, 8, 9 e 10 sofreram eutanásia após 2 semanas da cirurgia para implantação dos enxertos. (Tabela 1)

Os crânios dos animais foram conservados em PBL-Formaldeido 2% e enviados para avaliação da densidade mineral óssea. Posteriormente aforam retiradas ascalotas cranianas dos animais que também foram foram conservados em PBL-Formaldeido 2%. Essas calotas cranianas foram em seguida enviadas também para análise da densidade mineral óssea e para confecção de lâminas para estudo histológico.

**Tabela 1:** Tabela apresentando o número de animais sobreviventes após a cirurgia para implantação dos enxertos. Apresenta também o tipo de enxerto empregado em cada um dos orifícios confeccionados no crânio dos animais e o tempo para a eutanásia dos mesmos.

Grupos (n=43)	Orifício esquerdo	Orifício direito	Tempo para eutanásia (Semanas)
1 (n=5)	Vazio	AD	4
2 (n=5)	Vazio	FD	4
3 (n=5)	AD	FD	4
4 (n=3)	AC	AD	4
5 (n=4)	FC	FD	4
6 (n=5)	Vazio	AD	2
7 (n=4)	Vazio	FD	2
8 (n=4)	AD	FD	2
9 (n=4)	AC	AD	2
10 (n=4)	FC	FD	2

### 3.7 Avaliação da densidade óssea:

Os crânios dos animais foram levados para o Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Experimental (NUPEM), no Centro de Educação Física e Desportos da UFES. Os crânios foram preparados para serem avaliados quanto a densidade óssea (*BoneDensity* –  $g/cm^3$ ) na região dos orifícios que receberam os diferentes tipos de enxerto (AD2, AC2, FD2, FC2, AD4, AC4, FD4, FC4), e também os orifícios que não receberam enxertos (VZ2 e VZ4). Além destas áreas foi selecionada uma área no osso frontal do crânio, que não havia sido submetida confecção do orifício cranial, para servir de área de controle. Dos crânios dos 43 animais que sofreram eutanásia, foi possível realizar a avaliação de densidade óssea em 35 crânios. Em 8 crânios não foi possível a localização dos orifícios com precisão no aparelho, e não foram considerados na amostra.

A avaliação da densidade óssea foi realizada pelo aparelho da marca Buker, modelo InVivoFx Pro. O tempo de exposição adotado foi de 3 segundos, com Kvp de 30 e Filtro de RaioX de 0,2mm. Os dados de densidade estão expressos em  $g/cm^3$ .

Para a avaliação da densidade mineral utilizando-se a cabeça dos animais, houve muita dificuldade na sua realização. Havia muita dificuldade em se

posicionar a cabeça dos animais de forma a se conseguir uma boa visualização dos orifícios. Foi optado então pela retirada das calotas cranianas para realização das medidas de densidade óssea.

Na Tabela 2 podemos observar os valores médios da densidade óssea dos orifícios que receberam os diferentes tipos de enxertos, como também dos orifícios que não receberam enxerto, com a quantidade de orifícios avaliados (n). Na mesma tabela observa-se a densidade óssea da área do osso frontal onde não havia orifício (área com osso normal que foi escolhida como região controle).

**Tabela 2:** Tabela apresentando os valores médios das densidades ósseas nos orifícios que receberam diferentes tipos de enxertos (AC2, AD2, FC2, FD2, AC4, AD4, FC4 e FD4), e em orifícios que não receberam enxerto (VZ2 e VZ4). Também apresenta a densidade óssea controle realizada no osso frontal dos crânios avaliados. Avaliação das calotas cranianas.

Orifícios / Enxerto	Número de orifícios (n)	Média das Densidades ósseas (g/cm <sup>3</sup> )
AC2	3	1,323
AD2	12	1,862
FC2	4	1,828
FD2	12	1,490
AC4	3	2,085
AD4	9	2,007
FC4	4	1,494
FD4	10	1,699
VZ2	9	1,640
VZ4	4	2,135
Controle	35	1,624

Os valores de densidade óssea obtidos se mostraram conflitantes. A densidade óssea média do osso frontal (controle) no crânio foi de 1,624g/cm<sup>3</sup> enquanto a densidade do orifício que não recebeu enxerto (com eutanásia do animal em 4 semanas), VZ4, apresentou densidade óssea de 2,135g/cm<sup>3</sup>, ou seja, muito superior ao controle. Este grupo, VZ4, apresentou densidade óssea superior a todos os tipos de enxertos avaliados.

Após consulta ao manual do aparelho e também consulta ao representante da Buker no Brasil, compreendemos que o soft do aparelho está calibrado para ossos longos (*cylindrical long bone analysis*), e portanto a aferição em ossos do

crânio não seria confiável. Os dados obtidos foram então desconsiderados da pesquisa.

### **3.8 Fixação e Processamento Histológico:**

Cortes histológicos em 5 µm de espessura para colorações histoquímicas foram realizados em micrótomo manual (Leica Biosystems, Germany). Os cortes das amostras (AC, AD, FC, FD e VZ) foram capturados em lâminas de vidro comuns para os procedimentos de histoquímica.

Ao fim de todos os protocolos histológicos a montagem das lâminas assim como a análise do material e captura das imagens foi realizada utilizando fotomicroscópio (Olympus® AX70) acoplado com câmera digital (Axiocam Erc5s, Zeiss®).

#### Picrosirius

Foram realizados cortes de 5 µm para preparação das lâminas que foram submersas em solução de ácido pícrico saturada com DirectRed 80 (Sigma Aldrich, USA) por 24 horas à 37 °C. Ao fim da coloração, as lâminas foram submetidas lavagem abundante em água corrente para remoção do excesso de corantes. Em seguida foram levadas para estufa a 37 °C para secagem.

O método de coloração histoquímica de picrosirius, é uma ferramenta eficaz para demonstrar a presença de estruturas colágenas nos tecidos biológicos. As lâminas com coloração de picrosirius evidenciam em vermelho o conteúdo de colágeno em amarelo o conteúdo celular. (TOLOSA *et al.*, 2003.).

Conforme desenvolvido por Junqueira e colaboradores em 1979, a coloração de picrosirius é uma das mais importantes para estudar as redes de colágeno em diferentes tecidos (LATTOUF, 2014).

### Tricrômio de Masson – Goldner

Para coloração de tricrômio de Masson - Goldner, lâminas confeccionadas com cortes de 5 µm foram submetidas a banhos subsequentes em hematoxilina de Weigert (10 minutos), água destilada (10 minutos), tricrômio de Masson(6 minutos).Ao fim da coloração, as lâminas foram submetidas lavagem abundante em água corrente para remoção do excesso de corantes. Em seguida foram levadas para estufa a 37 °C para secagem.

O método de coloração histoquímica de tricrômio de Masson - Goldner pode identificar em verde claro o conteúdo de fibras colágenas, em verde azulado, laranja e azul escuro o osso, e em azul claro a cartilagem hialina (DOS SANTOS, 2015).

Após as colorações, foram avaliadas e separadas as lâminas que encontraram-se de boa qualidade para avaliação histológica para as colorações de picrossirius e tricrômio de Masson-Goldner. Estas lâminas estavam distribuídas nos diversos grupos com os seguintes números : VZ2 : 9 lâminas, VZ4 : 5 lâminas, AD2 : 7 lâminas, AD4 : 10 lâminas, AC2 : 8 lâminas, AC4 : 6 lâminas, FD2 12 lâminas, FD4 : 6 lâminas, FC2 : 8 lâminas e FC4 : 7 lâminas. Cada lâmina possuía 3 ou mais cortes histológicos.

### **3.9 Avaliação histológica das lâminas:**

As lâminas foram avaliadas qualitativamente pela coloração de tricrômio de Masson-Golder para identificação da formação de tecido cartilaginoso. Também foi avaliada qualitativamente a formação de colágeno pela coloração de picrossirius e de tricrômio de Masson-Goldner.

Os dados quantitativos de colágeno foram obtidos pela avaliação de fotografias das lâminas com coloração picrossirius, através do programa AxioVision e quantificadas pelo programa ImageJ.

### 3.10 Análise Estatística:

Foram avaliados estatisticamente os dados quantitativos de colágeno (% de colágeno) obtidos pela avaliação de fotografias das lâminas com coloração picrosírius, quantificadas pelo programa ImageJ.

A análise estatística foi realizada no programa GraphPadPrism Versão 7.0.1 (GraphPad Software; San Diego, Califórnia, EUA, Versão Completa). Os dados foram analisados quanto à normalidade utilizando os teste Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov e D'Agostino-Pearson. Para os dados que apresentaram distribuição normal, foi aplicado o teste *t* de Student não pareado para comparação entre dois grupos. Para os dados que não apresentavam distribuição normal foi aplicado o teste de *Mann Whitney* não pareado para comparação entre dois grupos. Para múltiplas comparações foi utilizado o teste ANOVA de uma via seguido do *post hoc* de Tukey. Os resultados das análises foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), e foram consideradas significativas quando o valor de  $p < 0,05$ .

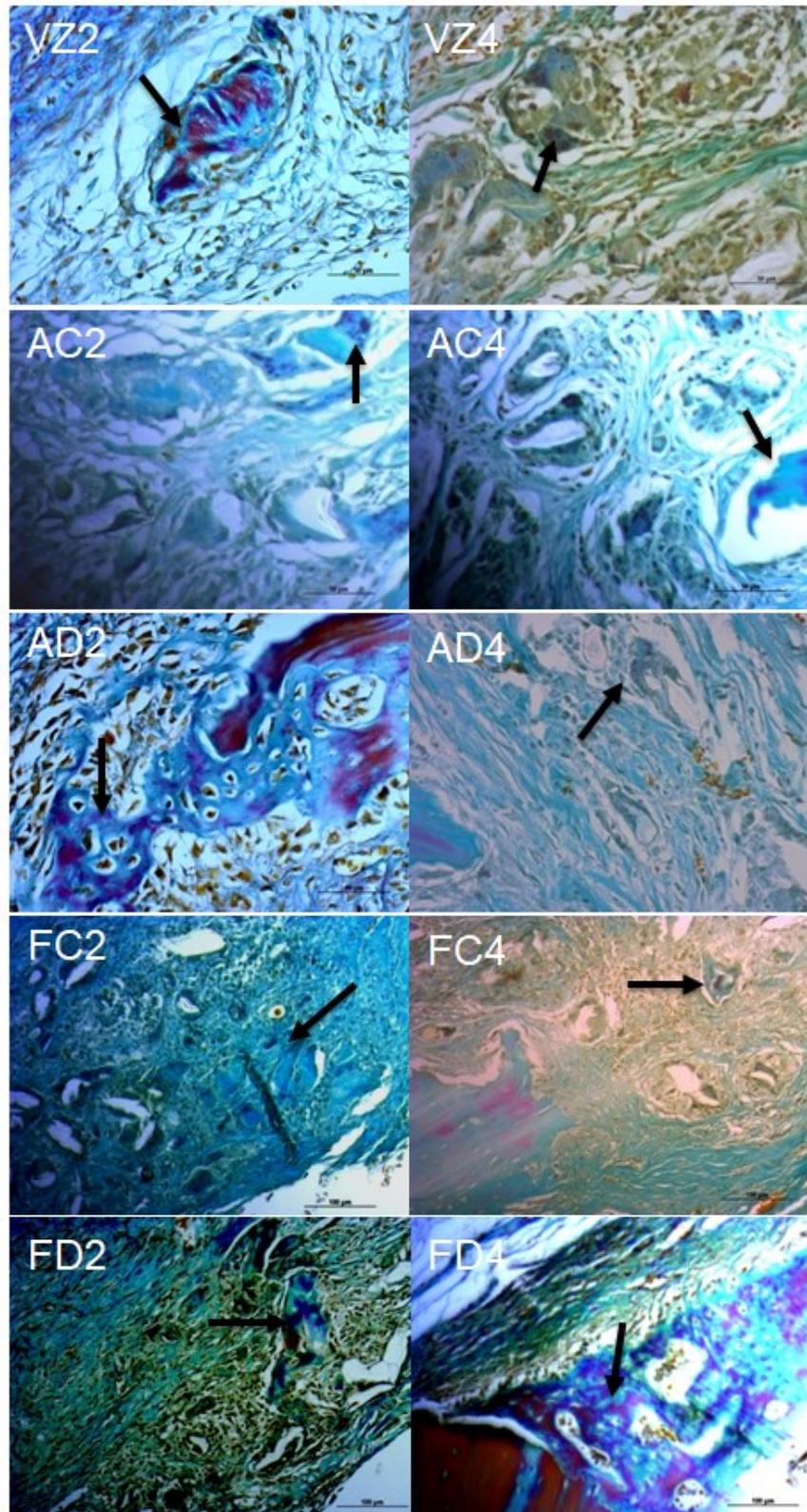
## **4 Resultados e Discussão:**

### **4.1 Avaliação qualitativa de formação de tecido cartilaginoso:**

Nas lâminas com coloração por tricrômio de Masson - Goldner, em todos os grupos avaliados, foi possível a identificação da formação de tecido cartilaginoso, em azul claro e rosa, com a presença de células mesenquimais circundando a cartilagem formada. A ocorrência da formação de cartilagem foi possível de ser observada em todos os grupos estudados (AD2, AD4, FD2, FD4, AC2, AC4, FC2 e FC4), inclusive nos grupos que não receberam enxerto ósseo (VZ2 e VZ4). (Figuras 2, 3 e 4)

A avaliação qualitativa permitiu observar que houve uma melhor formação de cartilagem nos enxertos Adulto Descelularizado com 2 semanas de eutanásia (AD2) e Fetal Descelularizado com 4 semanas de eutanásia (FD4), seguidos pelo Fetal Descelularizado com 2 semanas de eutanásia (FD2). (Figura 2)

Ao contrário dos tecidos moles, que são reparados pela formação de tecido cicatricial, osso fraturado é substituído por novo osso, com características fisiológicas e mecânicas iguais às do tecido original. A diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos, é diretamente dependente da resposta local ao estímulo gerado pelos fatores de crescimento e diferenciação óssea. Esses fatores são: fatores de transformação de crescimento beta, fatores de crescimento derivado das plaquetas, fator de crescimento fibroblástico e fatores de crescimento insulínico. Os fatores de crescimento são polipeptídeos produzidos por osteoblastos. A ocorrência de uma fratura provoca a liberação destas proteínas não colágenas do osso. Uma vez ativadas, ligam-se a receptores específicos da membrana celular de osteoblastos e outras células envolvidas no reparo ósseo e estimulam a proliferação e diferenciação celular e síntese de nova matriz proteica. Portanto os fatores de crescimento e diferenciação óssea estão diretamente relacionados com a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em condrócitos, com posterior desencadeamento do processo de ossificação endocondral e formação de osso novo (GIORDANO, V. et al., 2000).



**Figura 2:** Imagens de microscopia óptica das amostras de enxerto coradas com tricrômio de Masson- Goldner. Vazio - VZ, Adulto Controlado (celularizado) – AC, Adulto Descelularizado – AD, Fetal Controlado (celularizado) – FC e Fetal Descelularizado – FD; com eutanásia em 2 e em 4 semanas. Observar a formação de tecido cartilaginoso representadas em azul claro e rosa (setas pretas). Coloração por tricrômio de Masson – Goldner. Barra de escala: 50µm

## 4.2 Avaliação qualitativa da formação de colágeno:

Nas lâminas com coloração de picrosírius, em todos os grupos avaliados, foi possível a identificação de fibras colágenas longitudinais e paralelas fazendo a união entre os ossos remanescentes (local onde foi realizado o orifício no crânio dos animais). (Figuras 5, 6 e 7)

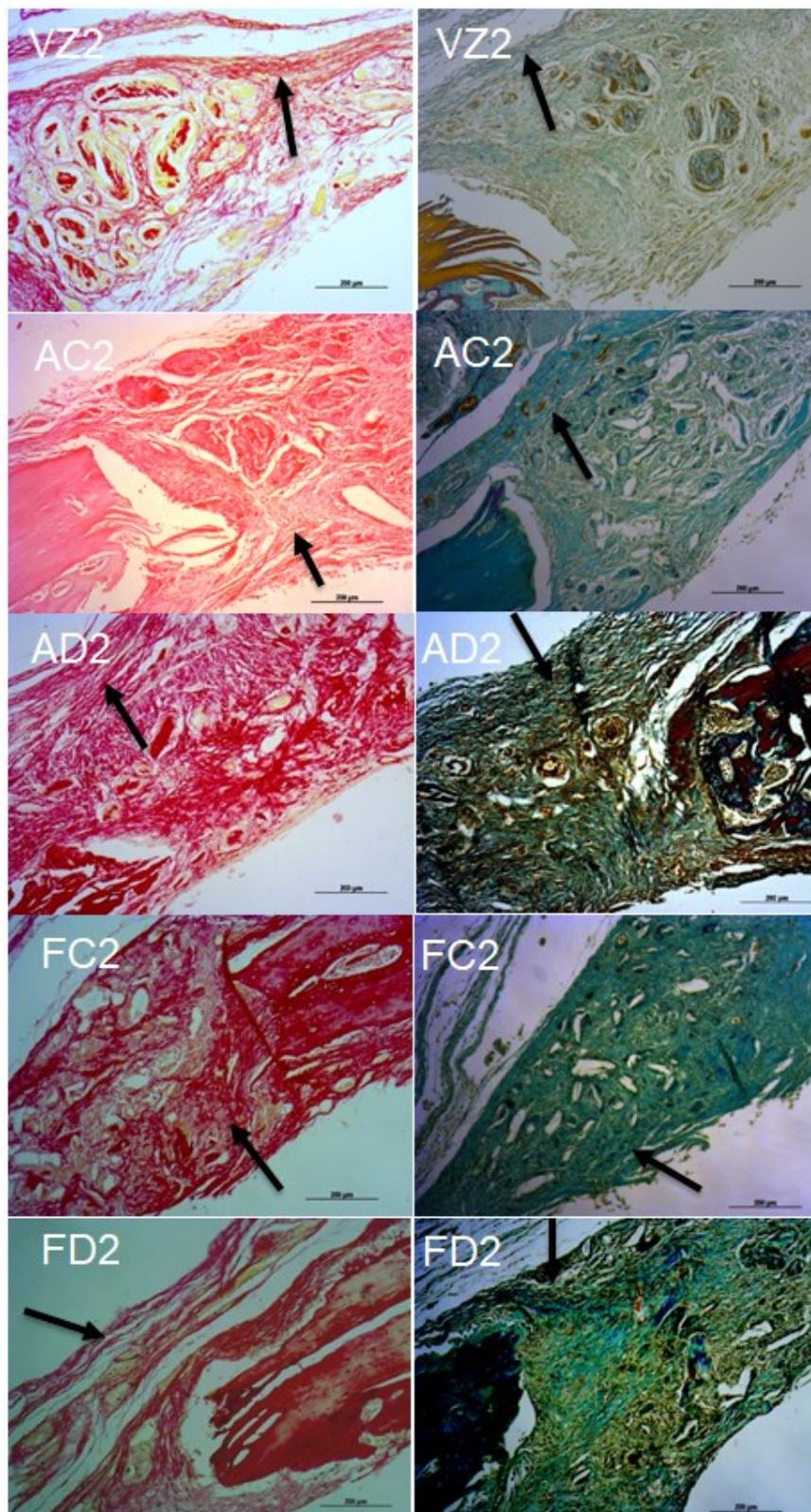
A avaliação qualitativa permitiu observar que houve uma melhor formação de fibras colágenas com disposição longitudinal e paralelas no grupo Adulto Descelularizado com 2 semanas de eutanásia (AD2). (Figura 3 e 4)

A disposição das fibras colágenas observadas tanto na coloração por tricrômio de Masson – Goldner como na coloração por Picrosírius, parece demonstrar que há uma tentativa de formação de um tecido para preenchimento do defeito ósseo no crânio.

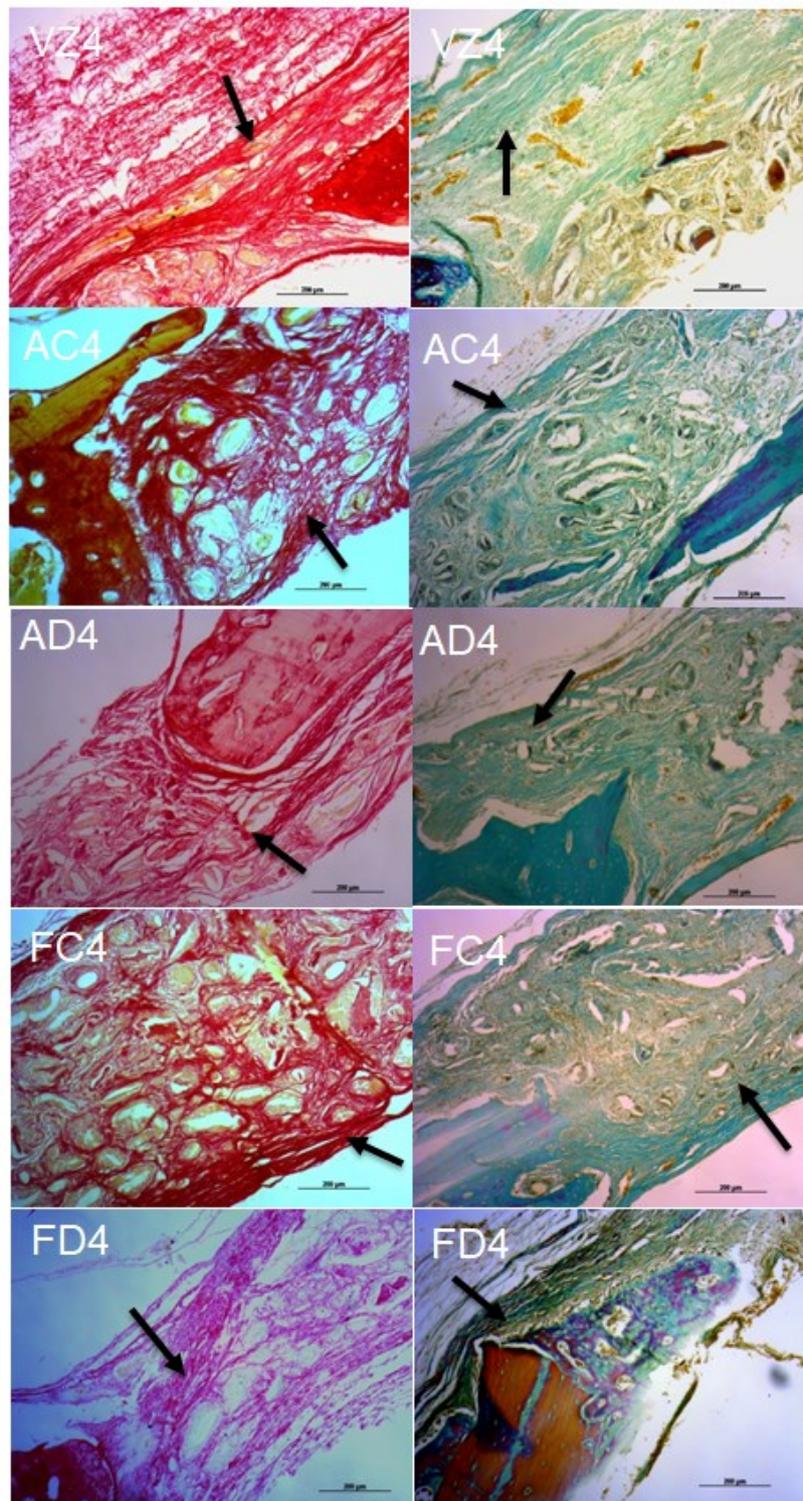
O colágeno tipo I é o principal constituinte da matriz orgânica extracelular do tecido ósseo e desempenha efeito osteoindutivo e papel estrutural importante ao orientar a deposição de matriz mineral de hidroxiapatita, conferindo rigidez ao tecido (ALFORD; KOZLOFF; HANKENSON, 2015; LEI *et al.*, 2015.).

A reparação das lesões teciduais passa por 3 fases : inflamatória, proliferativa e de maturação. Inicia-se no exato momento da lesão. Na fase inflamatória o sangramento traz consigo plaquetas hemácias e fibrina, o coágulo formado estabelece uma barreira. A fase proliferativa caracteriza-se pela formação do tecido de granulação, que é constituído pela formação de novos capilares, fibroblastos, macrófagos, colágeno, fibronectina e ácido hialurônico. Esta fase inicia-se por volta do 3º dias após a lesão. A síntese do colágeno é dependente da hidroxilação da prolina e lisina, reação essa mediada por uma enzima produzida pelo fibroblasto, em presença de vitaminas A, C e E, ferro, zinco e tiroxina. O colágeno é o material responsável pela sustentação e pela força tensil do tecido cicatricial. Na fase de maturação há um equilíbrio entre a produção e a destruição do colágeno (por ação da collagenase). Não há

aumento na quantidade de colágeno. Ocorre um aumento da resistência devido ao aumento de ligações transversas e melhor alinhamento do colágeno (TAZIMA, M.F. G.S. et al.,2008).



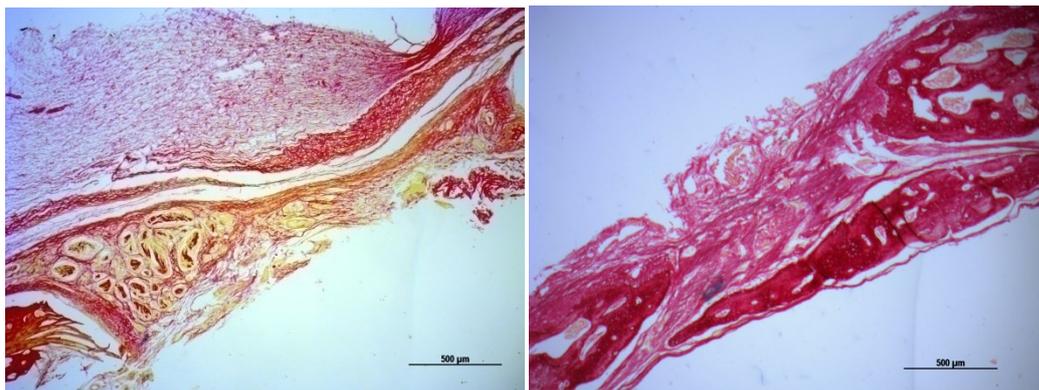
**Figura 3:** Imagens de microscopia óptica das amostras de enxerto coradas compicrosiriusetricrômio de Masson- Goldner.Vazio - VZ, Adulto Controle (celularizado) – AC, Adulto Descelularizado – AD, Fetal Controle (celularizado) – FC e Fetal Descelularizado – FD; com eutanásia em 2 semanas. Observar a disposição longitudinal e o paralelismo das fibras colágenas (setas pretas), representadas em vermelho na coloração por picrosirius e em verde azulado na coloração por tricrômio de Masson – Goldner. Barra de escala: 200µm



**Figura 4:** Imagens de microscopia óptica das amostras de enxerto coradas compicrosiriusetrícromo de Masson- Goldner.Vazio - VZ, Adulto Controle (celularizado) – AC, Adulto Descelularizado – AD, Fetal Controle (celularizado) – FC e Fetal Descelularizado – FD; com eutanásia em 4 semanas. Observar a disposição longitudinal e o paralelismo das fibras colágenas (setas pretas), representadas em vermelho na coloração por picrosirius e em verde azulado na coloração por tricrômio de Masson – Goldner. Barra de escala: 200µm

### **4.3 Avaliação quantitativa de formação de colágeno:**

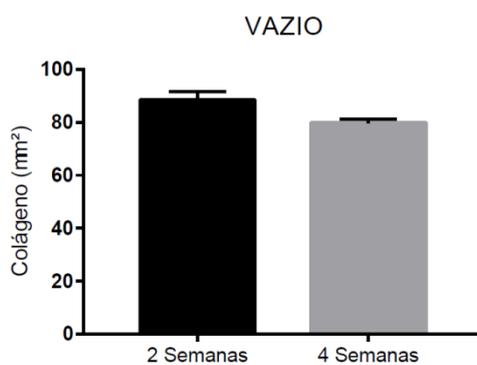
Não houve diferenças estatísticas entre os diferentes grupos avaliados, independentemente do tipo de enxerto utilizado (FC : Fetal controle ou celularizado, FD : Fetal descelularizado, AC : Adulto controle ou celularizado, AD : Adulto descelularizado), e do tempo de eutanásia dos animais (2 ou 4 semanas). Mesmo para os animais que não receberam enxerto (Vazio : VZ), não houve significância estatística para os mesmos períodos de eutanásia citados. (Figuras 8, 9, 10, 11, 12, 13,14, 15, 16, 17, 18 e 19)



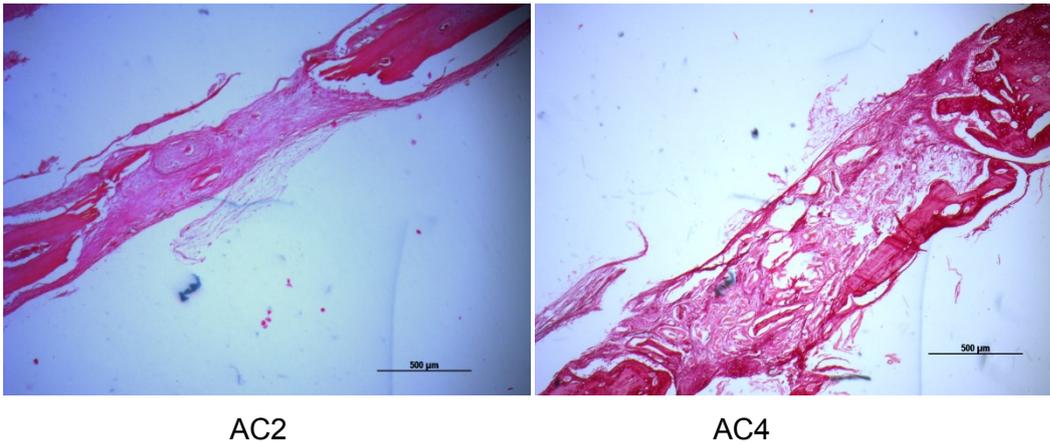
VZ2

VZ4

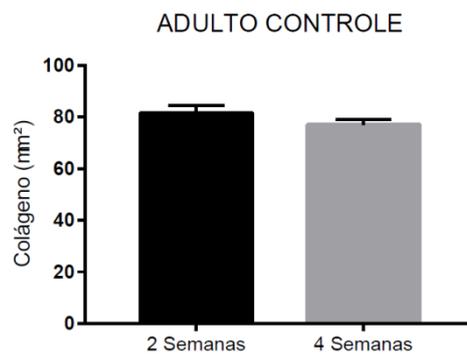
**Figura 5:** Imagens de microscopia óptica das amostras de enxerto coradas com picrosirius. Vazio com eutanásia em 2 semanas – VZ2 e Vazio com eutanásia em 4 semanas – VZ4 Barra de escala: 500µm.



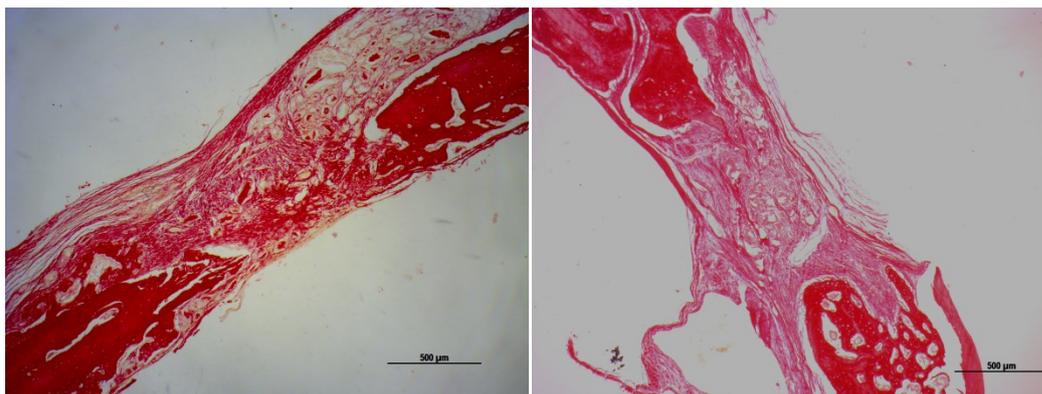
**Figura 6:** Concentração de colágeno em mm<sup>2</sup> nos orifícios que não receberam enxerto (Vazio – VZ), e com eutanásia em 2 e 4 semanas após a cirurgia. Vazio com 2 semanas (VZ2, n=9) e vazio com 4 semanas (VZ4 n=5). Os dados estão expressos em média ± EPM; (p=0,1727).



**Figura 7:** Imagens de microscopia óptica das amostras de enxerto coradas com picrosirius. Adulto controle (ou celularizado) – AC2 com eutanásia em 2 semanas – Adulto controle (ou celularizado) – AC4 com eutanásia em 2 semanas. Barra de escala: 500 $\mu$ m.



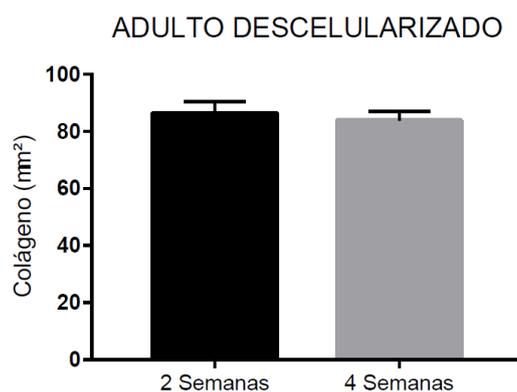
**Figura 8:** Concentração de colágeno em mm<sup>2</sup> nos orifícios que receberam enxerto adulto controle ou celularizado (Adulto controle ou celularizado – AC), e com eutanásia em 2 e 4 semanas após a cirurgia para a colocação do enxerto. Adulto controle ou celularizado com 2 semanas (AC2, n=8) e adulto controle ou celularizado com 4 semanas (AC4 n=6). Os dados estão expressos em média  $\pm$  EPM; (p=0,2934).



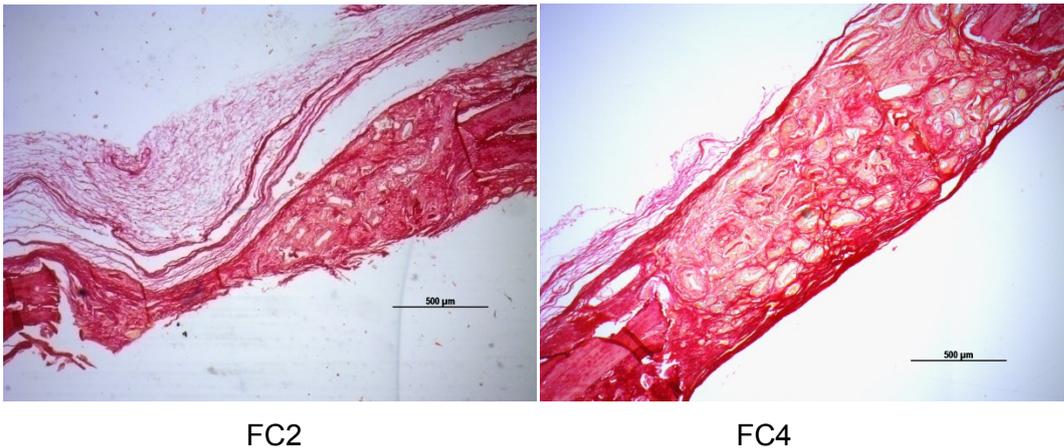
AD2

AD4

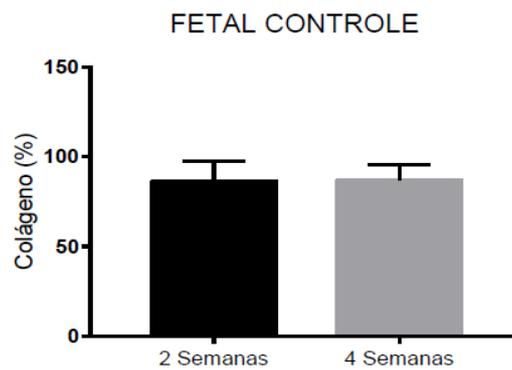
**Figura 9:** Imagens de microscopia óptica das amostras de enxerto coradas com picrosirius. Adulto descelularizado) – AD2 com eutanásia em 2 semanas – Adulto descelularizado) – AD4 com eutanásia em 2 semanas. Barra de escala: 500μm.



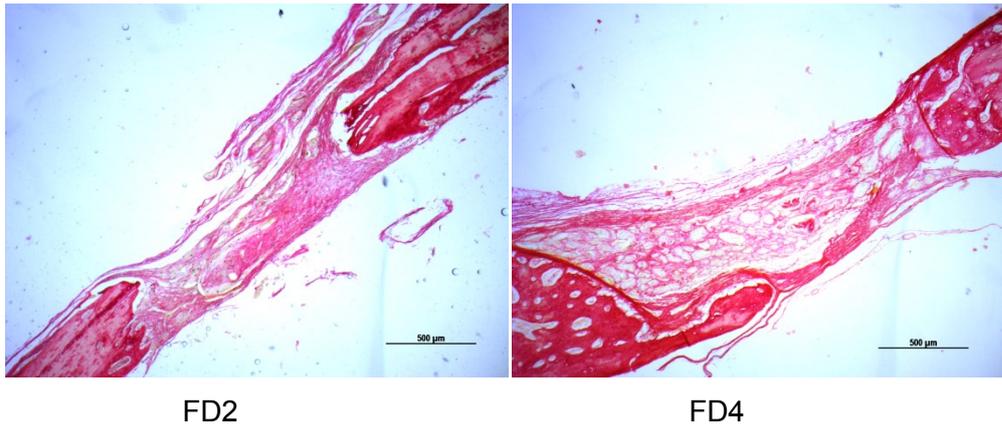
**Figura 10:** Concentração de colágeno em mm<sup>2</sup> nos orifícios que receberam enxerto adulto descelularizado (Adulto descelularizado – AD), e com eutanásia em 2 e 4 semanas após a cirurgia para a colocação do enxerto. Adulto descelularizado com 2 semanas (AD2, n=6) e adultodescelularizado com 4 semanas (AD4 n=10). Os dados estão expressos em média ± EPM;(p=0,6346).



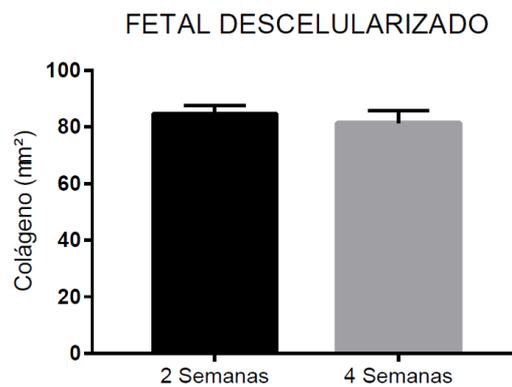
**Figura 11:** Imagens de microscopia óptica das amostras de enxerto coradas com picrosirius. Fetal controle (ou celularizado) – FC2 com eutanásia em 2 semanas – Fetal controle (ou celularizado) – FC4 com eutanásia em 4 semanas. Barra de escala: 500 $\mu$ m.



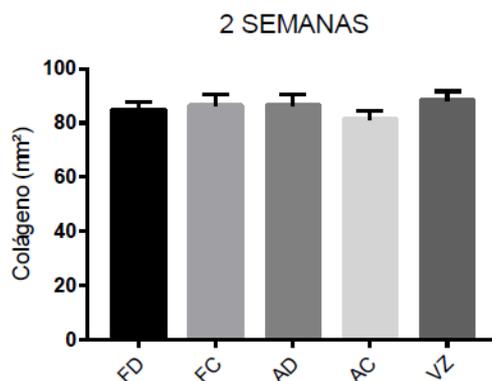
**Figura 12:** Concentração de colágeno em  $\text{mm}^2$  nos orifícios que receberam enxerto fetal controle ou celularizado (Fetal controle ou celularizado – FC), e com eutanásia em 2 e 4 semanas após a cirurgia para a colocação do enxerto. Fetal controle ou celularizado com 2 semanas (FC2, n=8) e fetal controle ou celularizado com 4 semanas (FC4 n=7). Os dados estão expressos em média  $\pm$  EPM; (p=0,8665).



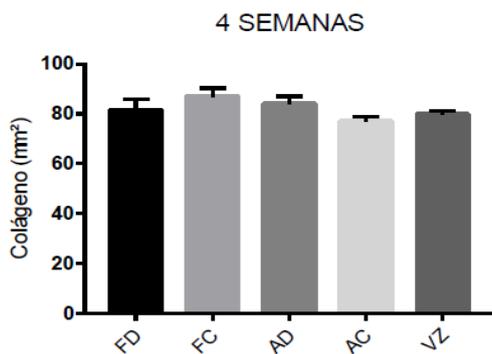
**Figura 13:** Imagens de microscopia óptica das amostras de enxerto coradas com picrosirius. Fetal descellularizado – FD2 com eutanásia em 2 semanas – Fetal descellularizado) – FD4 com eutanásia em 4 semanas. Barra de escala: 500 $\mu$ m.



**Figura 14:** Concentração de colágeno em mm<sup>2</sup> nos orifícios que receberam enxerto fetal descellularizado (Fetal descellularizado – FD), e com eutanásia em 2 e 4 semanas após a cirurgia para a colocação do enxerto. Fetal descellularizado com 2 semanas (FD2, n=11) e fetal descellularizado com 4 semanas (FD4 n=5). Os dados estão expressos em média  $\pm$  EPM; (p=0,5642).



**Figura 15:** Concentração de colágeno em mm<sup>2</sup> nos orifícios que receberam diferentes tipos de enxerto e orifícios que não receberam enxerto. Animais sofreram eutanásia em 2 semanas após a cirurgia. Fetal descelularizado (FD, n=11), fetal controle ou celularizado (FC, n=8), adultodescelularizado (AD, n=6), adulto controle ou celularizado (AC, n=8) e vazio (VZ, n=9). Os dados estão expressos em média  $\pm$  EPM; (p=0,7127).



**Figura 16:** Concentração de colágeno em mm<sup>2</sup> nos orifícios que receberam diferentes tipos de enxerto e orifícios que não receberam enxerto. Animais sofreram eutanásia em 4 semanas após a cirurgia. Fetal descelularizado (FD, n=5), fetal controle ou celularizado (FC, n=7), adultodescelularizado (AD, n=10), adulto controle ou celularizado (AC, n=6) e vazio (VZ, n=5). Os dados estão expressos em média  $\pm$  EPM; (p=0,2994).

## 5 Conclusão:

Os resultados apresentados neste estudo demonstraram que biomaterial ósseo derivado de osso adulto e fetal bovino descelularizado, para avaliação quantitativa de formação do colágeno pela coloração de Picrosirius, não apresentaram diferenças estatísticas quando comparados com o biomaterial ósseo adulto e fetal bovino celularizado. Não houve diferenças estatísticas, para formação de colágeno pela coloração de picrosirius, entre os diferentes grupos avaliados, independentemente do tipo de enxerto utilizado (FC : Fetal controle ou celularizado, FD : Fetal descelularizado, AC : Adulto controle ou celularizado, AD : Adulto descelularizado), e do tempo de eutanásia dos animais (2 ou 4 semanas). Mesmo para os animais que não receberam enxerto (Vazio : VZ), não houve significância estatística para os mesmos períodos de eutanásia citados.

Na avaliação qualitativa (pela coloração do tricrômio de Masson-Goldner), foi possível observar que houve uma melhor formação de cartilagem nos enxertos Adulto Descelularizado com 2 semanas de eutanásia (AD2) e Fetal Descelularizado com 4 semanas de eutanásia (FD4), seguidos pelo Fetal Descelularizado com 2 semanas de eutanásia (FD2). Ou seja, nesta avaliação qualitativa os grupos descelularizados foram superiores aos grupos celularizados para a formação de tecido cartilaginoso.

Na avaliação qualitativa (pela coloração de picrosirius e tricrômio de Masson-Goldner) foi possível observar que houve uma melhor formação de fibras colágenas com disposição longitudinal e paralelas no grupo Adulto Descelularizado com 2 semanas de eutanásia (AD2). Ou seja, nesta avaliação qualitativa, também houve superioridade de um grupo descelularizado.

Portanto pelas avaliações qualitativas para a formação de tecido cartilaginoso e para a formação de fibras colágenas, foi possível observar uma superioridade dos biomateriais descelularizados em relação aos biomateriais celularizados.

É necessário que novas investigações sejam realizadas para possibilitar uma melhor avaliação quanto a superioridade dos diferentes biomateriais.

## 6 Referências Bibliográficas:

ACCORSI-MENDONÇA, T. *et al.* Physicochemical characterization of two deproteinized bovine xenografts. *Brazilian Oral Research*, v. 22, n. 1, p. 5–10, 2008.

ALFORD, Andrea I.; KOZLOFF, Kenneth M.; HANKENSON, Kurt D. Extracellular matrix networks in bone remodeling. *The international journal of biochemistry & cell biology*, v. 65, p. 20-31, 2015.:

BADYLAK, S. F.; TAYLOR, D.; UYGUN, K. Whole Organ Tissue Engineering: Decellularization and Recellularization of Three-Dimensional Matrix Scaffolds. *Annual Review of Biomedical Engineering*, v. 13, 2010.

Barros, Rodolpho José da Silva, B277d Desenvolvimento de biomaterial ósseo / Rodolpho José da Silva Barros. –2018. 86 f. :il.

BENDERS, K. E. M. M. *et al.* Extracellular matrix scaffolds for cartilage and bone regeneration. *Trends in Biotechnology*, v. 31, n. 3, p. 169–176, 2013.

Bl, Long *et al.* Effects of sodium hydroxide, sodium hypochlorite, and gaseous hydrogen peroxide on the natural properties of cancellous bone. *Artificial Organs*, v. 37, n. 7, p. 629-636, 2013.

BIANCO, Paolo *et al.* Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues. *Calcified tissue international*, v. 49, n. 6, p. 421-426, 1991.

BIGHAM-SADEGH, Amin *et al.* Evaluation of bone healing in canine tibial defects filled with cortical autograft, commercial-DBM, calf fetal DBM, omentum and omentum-calf fetal DBM. *Journal of Veterinary Science*, v. 14, n. 3, p. 337-343, 2013.

BROZ, J. J. *et al.* Effects of deproteinization and ashing on site-specific properties of cortical bone. *Journal of Materials Science : Materials in Medicine*. v. 8, p. 395–401, 1997.

BROWN, B. N.; BADYLAK, S. F. *Extracellular matrix as an inductive scaffold for functional tissue reconstruction. Translational Research*. 2014.

BURCHARDT, H. A. N. S. Biology of bone transplantation. *The Orthopedic Clinics of North America*, v. 18, n. 2, p. 187-196, 1987.

CASTRO-CESEÑA, A. B. *et al.* Kinetic characterization of the deproteinization of trabecular and cortical bovine femur bones. *Materials Science and Engineering: C*, v. 33, n. 8, p. 4958–4964, 2013.

CHAPPARD, Daniel *et al.* Fat in bone xenografts: importance of the purification procedures on cleanliness, wettability and biocompatibility. *Biomaterials*, v. 14, n. 7, p. 507-512, 1993.

CHENG, C. W.; SOLORIO, L. D.; ALSBERG, E. Decellularized tissue and cell-derived extracellular matrices as scaffolds for orthopaedic tissue engineering. *Biotechnology Advances*, v. 32, n. 2, p. 462–484, 2014.

DIESEL, Cristiano Valter et al. Revisão acetabular em artroplastia total de quadril com cunhas de tântalo associadas a enxerto ósseo bovino liofilizado. *Revista Brasileira de Ortopedia*, v. 52, p. 46-51, 2017.

DOS SANTOS, Anderson Cunha dos Cunha; DOS ANJOS RIBEIRO, Iorrana Índira; ROSA, Fabiana Paim Paim. Avaliação morfológica por imagem microtomográfica e histológica do reparo ósseo após o uso de biomaterial. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v. 14, n. 3, p. 310-315, 2015.

ELIAS, C. N.; VASCONCELLOS, V. DE S. L. DE; RESENDE, C. R. DE S. Análise dos mecanismos celulares durante a osteointegração dos implantes. 2012, Natal - RN: 2012.

FERNANDEZ-YAGUE, M. A. *et al.* Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physicommechanical strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 84, p. 1–29, 2015.

FICAI, Anton et al. Colagen/hydroxyapatite interactions in composite biomaterials. *Materiale Plastice*, v. 46, n. 1, p. 11-15, 2009.

FISHER, Larry W. et al. Matrix sialoprotein of developing bone. *Journal of Biological Chemistry*, v. 258, n. 20, p. 12723-12727, 1983.

GALIA, C. R. Enxertos ósseos liofilizados impactados humano e bovino em revisão de artroplastia total de quadril. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v. 35, n. 4, p. 1–126, 2004.

GHANAATI, S. *et al.* Induction of multinucleated giant cells in response to small sized bovine bone substitute (Bio-Oss TM ) results in an enhanced early implantation bed vascularization. *Annals of Maxillofacial Surgery*, v. 4, n. 2, p. 150, 2014.

GIORDANO, Vincenzo; GIORDANO, Marcos; KNACKFUSS, Irocy G. Fatores de crescimento e diferenciação ósseos. Efeitos sobre o processo de consolidação de fratura: presente e futuro. *RevBrasMed*, v. 57, n. 9, p. 14-20, 2000.

GRUSKIN, E. *et al.* Demineralized bone matrix in bone repair: History and use. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 64, n. 12, p. 1063–1077, 2012.

GUTIERRES, Manuel et al. Substitutos Ósseos: conceitos gerais e estado actual. *Arquivos de Medicina*, v. 19, n. 4, p. 153-162, 2005.

HUTMACHER, Dietmar W. Regenerative medicine will impact, but not replace, the medical device industry. *Expert Review of Medical Devices*, v. 3, n. 4, p. 409-412, 2006.

JUDAS, Fernando et al. Estrutura e dinâmica do tecido ósseo. 2012.

KLEIN, Justin D. et al. Chest wall repair with engineered fetal bone grafts: an efficacy analysis in an autologous leporine model. *Journal of Pediatric Surgery*, v. 45, n. 6, p. 1354-1360, 2010.

LATTOUF, Raed et al. Picrosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 62, n. 10, p. 751-758, 2014.

MESQUITA, P. *et al.* Avaliação in vitro do comportamento de osteoblastos sobre implantes com diferentes tratamentos de superfície. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*, v. 56, n. 2, p. 95–102, abr. 2015.

MONTJOVENT, Marc-Olivier et al. Fetal bone cells for tissue engineering. *Bone*, v. 35, n. 6, p. 1323-1333, 2004.

MOORE, Steven T. et al. Osteoconductivity and osteoinductivity of Puros® DBM putty. *Journal of biomaterials applications*, v. 26, n. 2, p. 151-171, 2011.

PAPADIMITROPOULOS, Adam et al. Engineered decellularized matrices to instruct bone regeneration processes. *Bone*, v. 70, p. 66-72, 2015.

PARIKH, S. N. et al. Bone graft substitutes: past, present, future. *Journal of postgraduate medicine*, v. 48, n. 2, p. 142, 2002.

PERIC, Mihaela et al. The rational use of animal models in the evaluation of novel bone regenerative therapies. *Bone*, v. 70, p. 73-86, 2015.

ROACH, H. I. Why does bonematrixcontain non-collagenousproteins? The possible roles ofosteocalcin, osteonectin, osteopontinandbonesialoprotein in bonemineralisationandresorption. *Cellbiologyinternational*, v. 18, n. 6, p. 617-628, 1994.

RUSSELL *et al.* The Effect of Processing Conditions of the Osteoinductivity of Sheep Demineralized Bone Matrix in an Ectopic Nude Rat Model: A Pilot Study. 2012, [S.l: s.n.], 2012. p. Poster 0629.

SCHALLER, O. *et al.* Validation of a Western immunoblotting procedure for bovine PrP Sc detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Acta Neuropathologica*, v. 98, n. 5, p. 437–443, 27 nov. 1999.

SILVA, R. B. P. et al. PPPg o14- Características histológicas e microtomográfica do reparo ósseo utilizando diferentes substitutos ósseos. *Archives of Health Investigation*, v. 6, 2017.

SMITH, C. A. et al. The use of a novel bone allograft wash process to generate a biocompatible, mechanically stable and osteoinductive biological scaffold for use in bone tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 9, n. 5, p. 595-604, 2015.

SZULC, P.; SEEMAN, E.; DELMAS, P. D. Biochemical measurements of bone turnover in children and adolescents. *Osteoporosis International*, v. 11, n. 4, p. 281-294, 2000.

TAZIMA, M.F.G.S. et al. Biologia da ferida e cicatrização. *Medicina (Ribeirão Preto. Online)*, v. 41, n. 3, p. 259-264, 2008.

TOLOSA, E. M. C. DE et al. *Livro: Manual de Tecnicas para Histologia Normal e Patológica*. 2. ed. Barueri: 2003.

WANG, Ping et al. Bone tissue engineering via human induced pluripotent, umbilical cord and bone marrow mesenchymal stem cells in rat cranium. *Actabiomaterialia*, v. 18, p. 236-248, 2015.

ZHANG, Zhi-Yong et al. Superior osteogenic capacity for bone tissue engineering of fetal compared with perinatal and adult mesenchymal stem cells. *Stem cells*, v. 27, n. 1, p. 126-137, 2009.

ZHANG, Zhi-Yong et al. Neo-vascularization and bone formation mediated by fetal mesenchymal stem cell tissue-engineered bone grafts in critical-size femoral defects. *Biomaterials*, v. 31, n. 4, p. 608-620, 2010.