

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO MATERIAIS DENTÁRIOS
DOUTORADO

LUCAS HÖRLLE

*Avaliação do processo de cicatrização óssea
com diferentes biomateriais em fêmur de ratos.*

Prof. Dr. Rogério Belle de Oliveira
Orientador

Porto Alegre
2013

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Área de Concentração em Materiais Dentários

- DOUTORADO -

***Avaliação do processo de cicatrização óssea com diferentes biomateriais em
fêmur de ratos***

Lucas Hörlle

Tese apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do título de Doutor em Odontologia, na área de concentração em Materiais Dentários pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Linha de pesquisa técnica e terapêutica aplicada

Orientador: Prof. Dr. Rogério Belle de Oliveira

Porto Alegre
2013

H812a Horlle, Lucas
Avaliação do processo de cicatrização óssea com diferentes biomateriais em fêmur de ratos / Lucas Horlle. – Porto Alegre, 2013.
63 f.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, PUCRS.
Orientador: Prof. Dr. Rogério Belle de Oliveira.

1.Odontologia. 2. Tecido Ósseo. 3. Materiais Biocompatíveis. 4. Ratos de Wistar. 5. Cicatrização. I. Oliveira, Rogério Belle de. II. Título.

CDD 617.52

Ficha Catalográfica elaborada por Loiva Duarte Novak – CRB10/2079

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por oportunizar mais um aprendizado em nossa vida, proporcionando crescimento e amadurecimento pessoal e profissional, nos guiando a cada caminho percorrido. Muito obrigado!

A minha esposa, minha filha e meus pais, pela compreensão de muitas vezes não poder dar a atenção que merecem e pelo apoio incondicional.

Ao meu orientador, prof. Dr. Rogério Belle, peça fundamental para que este trabalho tenha sido realizado e concluído. Com paciência e dedicação, se doou ao máximo a cada semana durante quatro anos para transmitir seus conhecimentos e experiências profissionais e pessoais, sempre entusiasmado e entusiasmando mesmo nos momentos de maior apreensão.

À professora Maria Martha pela ajuda na realização deste trabalho.

À colaboração da professora Fernanda Morrone, do Departamento de Atenção Farmacêutica e Práticas Profissionais (Faculdade de Farmácia PUC-RS).

Aos funcionários da Secretaria de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da PUC-RS pelo empenho e pela prontidão independente da situação e/ou ocasião.

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, na pessoa do Magnífico Reitor Prof. Joaquim Clotet.

À Faculdade de Odontologia da PUC-RS, na pessoa do seu Diretor, professor Dr. Alexandre Bahlis e seu ex-Diretor, professor Dr. Marcos Túlio Mazzini Carvalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da PUC-RS, na pessoa da sua Coordenadora, professora Dra. Ana Maria Spohr e seu ex-Coordenador, professor Dr. José Antônio Poli Figueiredo.

Ao IDEIA da PUC-RS, na pessoa do professor Arno Kieling.

Ao professor Dr. Lucas Neiva, quem se prontificou a ajudar em qualquer momento e realizar os dados estatísticos deste trabalho.

Ao Ministério da Educação, por meio da CAPES, a qual tem investido na formação de profissionais da educação e pesquisa.

RESUMO

Objetivo: O presente estudo objetivou verificar o processo de reparo ósseo frente à utilização dos biomateriais Bio-Oss®, Osteogen® e Bone Ceramic® em um modelo experimental com defeitos criados no fêmur de ratos, através de análise histológica, avaliando também a taxa de interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e TNF- α presente em cada processo inflamatório existente no reparo ósseo.

Materiais e Métodos: 36 ratos da linhagem *Wistar* com 8 semanas e cerca de 300 gramas foram submetidos à cirurgia do fêmur criando um defeito ósseo de 5mm de comprimento por 3mm de largura até chegar em tecido medular. Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: Grupo I - Bio-Oss® (Geistlich Sons Ltd. Wolhusen, Suíça); Grupo II - Bone Ceramic® (Straumann AG, Basel, Suíça); Grupo III - Osteogen® (Impladent Ltd., Hollywood, EUA); Grupo Controle – coágulo. Conforme cada grupo, o fêmur tinha sua medula preenchida pelo biomaterial correspondente, excetuando-se o Grupo Controle que teve preenchimento por coágulo. Trinta dias após a cirurgia, os animais sofreram eutanásia e cada fêmur operado removido, descalcificado, cortado em micrótomo e confeccionado lâmina microscópica para análise histológica.

Resultados: Em trinta dias, não houve diferença significativa na neoformação óssea entre os grupos. No entanto, quanto à taxa de marcação das citocinas pró-inflamatórias, o Bio-oss mostrou-se com a menor taxa de TNF- α , sendo em apenas dois sítios uma taxa leve. O mesmo ocorreu com IL-1, mas mostrando em seis sítios taxa leve. Em relação à IL-6, a taxa foi de moderada à severa para a maioria dos sítios. O Bone Ceramic mostrou taxa mais alta de TNF- α em relação ao Bio-oss, manteve um equilíbrio em relação à IL-1 e resultados

semelhantes à IL-6. E o Osteogen apresentou a taxa mais alta de TNF- α e IL-1 e mais baixa de IL-6 quando comparado ao Bio-oss e Bone Ceramic.

Conclusão: As implicações clínicas a partir de um estudo em modelo animal são controversas, mas dentro do escopo do trabalho, um biomaterial com baixo índice de TNF- α e IL-1 e índice moderado de IL-6 mostra-se maduro em 30 dias, ou seja, com condições histológicas ideais de neoformação óssea.

Palavras-chave*: Cimentos para Ossos; Fosfatos de Cálcio; Experimentação Animal; Ratos Wistar; Citocinas.

ABSTRACT

Objective: This study aimed to verify the process of bone repair biomaterials forward the use of Bio-Oss ®, Osteogen ® and Bone Ceramic ® in an experimental model with defects created in rat femurs through histological analysis, evaluating also the rate of interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) and TNF- α present in each inflammatory process existing in bone repair.

Materials and Methods: 36 *Wistar* rats aged 8 weeks and about 300 grams underwent surgery femur bone defect creating a 5mm long and 3mm wide to get in medullary tissue. The animals were randomly divided into four groups: Group I - Bio-Oss ® (Geistlich Wolhusen Sons Ltd., Switzerland), Group II - Bone Ceramic ® (Straumann AG, Basel, Switzerland), Group III - Osteogen ® (Impladent Ltd., Hollywood, USA), Group Control - clot. As each group, the femur had their bone biomaterial filled by correspondent, except for the control group that had filled with blood clot. Thirty days after surgery, animals were euthanized and each operated femur removed, decalcified, cut with a microtome and blade made for microscopic histological analysis.

Results: In thirty days, no significant difference in bone formation between the groups. However, as the rate of the marking of proinflammatory cytokines, Bio-Oss showed the lowest rate of TNF- α and in only two places a rate slightly. The same occurred with IL-1, but showing slight rate at six sites. Regarding IL-6, the rate was moderate to severe in most sites. The Bone Ceramic showed higher rate of TNF- α in relation to Bio-oss, maintained a balance in relation to IL-1 and similar to IL-6. And Osteogen showed the highest rate of TNF- α and IL-1 and lower IL-6 when compared to Bio-oss and Bone Ceramic.

Conclusion: The clinical implications from a study in animal models are

controversial, but within the scope of work, a biomaterial with low TNF- α and IL-1 and moderate content of IL-6 appears to be mature in 30 days , i.e., with optimal histological conditions of bone formation.

* **Keywords:** Bone Cements, Calcium Phosphate, Animal Experimentation; *Wistar* rats; Cytokines.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	15
2. ARTIGOS	20
ARTIGO 1 – Estudo do modelo de fêmur de ratos como protocolo para pesquisas com biomateriais.....	21
ARTIGO 2 – Avaliação do processo de cicatrização óssea com diferentes biomateriais em fêmur de ratos.....	32
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS GERAIS	48
4. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO GERAL	50
5. ANEXO	63

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Até o presente momento, vários biomateriais foram identificados com potencial osteocondutor e osteoindutor, mas somente o osso autógeno permanece com a tríade ideal - osteoindução, osteocondução e osteogênese.

Os biomateriais são uma alternativa em relação aos enxertos autógenos em muitos casos, pois podem diminuir a morbidade de um segundo sítio cirúrgico. Para isso, os materiais estudados devem apresentar, dentre outras características: biocompatibilidade, capacidade de suportar e transferir cargas mecânicas, cinética de superfície controlada, realizar a indução e/ou condução no reparo ósseo, manter ao longo do tempo homeostase de tecidos ósseos, assim como longevidade "*in situ*" (LEMONS e BIDEZ, 1991; PUELO e NANCY, 1999; LEMONS, 2004).

O termo fosfato de cálcio bifásico (BCP) foi usado pela primeira vez por Nery *et al.* em 1975 para descrever uma biocerâmica constituída da mistura de hidroxiapatita (HA) e fosfato β -tricálcico (β -TCP), que era na verdade 20% de HA e 80% de β -TCP. Cerâmicas de BCP, como outros materiais de enxertia bioativos, são osteocondutoras e não osteoindutoras. Ou seja, formam um arcabouço que permite o ingresso vascular, infiltração e migração celular, formação cartilaginosa e deposição de tecido ósseo calcificado (LEGEROS, 2002).

Um exemplo para essa substituição óssea é o Bone Ceramic® (Straumann AG, Basel, Suíça), que é um material de substituição óssea totalmente sintético, composto de fosfato de cálcio bifásico (HA de 60% e 40% de β -TCP). Esta combinação de um material não absorvível como a HA, com

um material reabsorvível, β -TCP, torna o material bioativo, reabsorvível, e biocompatível, e tem potencial osteoindutor (JAFARIAN *et al.*, 2008; PAKNEJAD *et al.*, 2008; MIRANDA *et al.*, 2005).

Outro material de substituição que se enquadra nas hidroxiapatitas sintéticas é o Osteogen® (Impladent Ltd., Hollywood, EUA). Este aloenxerto é uma hidroxiapatita sintética, de reabsorção homogênea e previsível quando metabolizada no tecido ósseo, com características osteocondutoras. Se posicionado também sob o periósteo, é encapsulado de forma fibrótica, oferecendo alternativa para o aumento de volume gengival (CORSAIR, 1990; DONOHUE; MASCRÈS, 1993; EPSTEIN; VALEN, 2006).

As hidroxiapatitas, em suas múltiplas apresentações, trazem em suas variadas formulações químicas, a presença predominante dos elementos essenciais que compõem o tecido ósseo humano: cálcio e fosfato. Em elevação de seio maxilar, após 6 meses há formação de tecido ósseo neoformado ao redor dos cristais de hidroxiapatita (MANGANO *et al.*, 2006)

Ainda outra alternativa de substituto ósseo é o enxerto xenógeno inorgânico, sendo atualmente utilizado em diversas situações clínicas. É um produto que mostra propriedades osteocondutoras e que auxilia a neoformação óssea nos processos de neoformação (VALENTINI; ABENSUR, 2003; HATANO *et al.*, 2004; JOHN; WENZ, 2004; SIMION *et al.*, 2007) e também é utilizado na periodontia, apresentando relativo sucesso nas cirurgias de regeneração tecidual guiada (STAVROPOULOS *et al.*, 2004).

Um exemplo de xenoenxerto de origem bovina é o Bio-Oss® (Geistlich Sons Ltd. Wolhusen, Suíça), que está associado à neoformação óssea,

(HAMMERLE et al., 1998; NOMURA et al., 2005; ORSINI et al., 2007; SIMION et al., 2007), e que possui propriedades de osteocondução como as do β -TCP.

O Bio-Oss® é comprovadamente biocompatível e osteocondutor, é reabsorvido lentamente em seres humanos e pode ser utilizado com sucesso como substituto ósseo em procedimentos de aumento do seio maxilar. Osso bovino desproteínizado com 75% a 80% de porosidade e com um tamanho de cristal variável de 0,1 a 1,0mm, sob a forma de grânulos corticais e esponjosos, e blocos corticais e esponjosos (HURZELER et al., 1997; CLERGEAU et al., 1996; BERGLUNDH; LINDHE, 1997; PIATTELLI et al., 1999).

Comparações entre biomateriais são importantes para determinar quais são os potenciais e limites de utilização. A literatura mostra estudos com modelo experimental de comparação entre os materiais, mas a definição de um modelo experimental definitivo ainda não é presente. A neoformação óssea é influenciada por vários fatores do processo inflamatório, tanto inicial, quanto tardio. Muitos destes fatores ainda não foram elucidados. (ROKN et al., 2011; BOYNE; JAMES, 1980; BERGLUNDH; LINDHE, 1997; HISLOP et al., 1993).

Além da osteocondução, facilitando a neoformação, tais substitutos ósseos, quando enxertados, levam a um processo inflamatório. Várias citocinas pró-inflamatórias estão envolvidas durante a fase inicial e tardia do processo de neoformação óssea. Padrões de expressão temporal de citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas, fatores de necrose tumoral e outros já foram avaliados em vários modelos de pesquisa. As interleucinas IL-1 e IL-6 estão envolvidas na complexa rede de cascatas de sinalização evocada durante a neoformação óssea e podem afetar diferencialmente células da

linhagem osteoblástica imaturas e maduras (KIM *et al.*, 1997; OHSHIMA *et al.*, 1998; CHO *et al.*, 2007).

A neoformação óssea envolve uma cascata de eventos que se inicia com uma reação inflamatória (BROWDER *et al.*, 1988), em que os macrófagos e outras células do sistema imune são recrutados para o local do defeito e há liberação de vários fatores, incluindo IL-1, IL-6, e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (KON *et al.*, 2001). Estas citocinas pró-inflamatórias estão associadas com a resposta inata do tecido à presença de lesões, mas também são conhecidas por aumentar a síntese de matriz extracelular, estimular a angiogênese, e recrutar células mesenquimais endógenas para o local da lesão (CHO *et al.*, 2001). IL-1, IL-6 e TNF- α demonstraram desempenhar importantes papéis reguladores na remodelação óssea e na homeostase (KIMBLE *et al.*, 1997) e, por meio de uma variedade de mecanismos, regulam a atividade dos osteoclastos, quer através da estimulação de células progenitoras hematopoiéticas diferenciando em osteoclastos maduros ou através da ativação de osteoclastos existentes (JILKA *et al.*, 1992).

A interleucina-1 (IL-1) é uma citocina pró-inflamatória, que é produzida por uma variedade de células, tais como monócitos, linfócitos, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos. IL-1 estimula a reabsorção óssea, e foi encontrada em concentrações elevadas em torno do processo de perda e substituição óssea (MUNDY, 1993; HARADA *et al.*, 1994).

Cillo *et al.* em 2000 estudaram o efeito da tensão mecânica sobre a expressão de mRNA dos fatores de crescimento e citocinas, numa linha de células de osteosarcoma (SaOS-2) e observaram que a expressão de IL-6mRNA foi induzida após 24 horas (CILLO *et al.*, 2000). Esta descoberta

sugere que as citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6, são induzidas pelas células e podem desempenhar um papel fundamental na neoformação óssea ou remodelação (CHO *et al.*, 2007).

TNF- α é um mediador-chave que aumenta a ação de osteoclastos em tecidos adjacentes aos locais de osteólise peri-implantar. Sugere-se identificar o TNF- α como um alvo potencial para a terapia osteolítica de lesões peri-implantares. A utilização de fármacos que inibem a ação do TNF- α é largamente aceita para o tratamento da artrite reumatoide em pacientes que não respondem a terapias anti-inflamatórias tradicionais. (SABOKBAR *et al.*, 2003; SCHWARZ *et al.*, 2003; ROKN *et al.*, 2011)

O fêmur é um osso longo com corticais densas e lúmen preenchido por tecido hematopoiético. Este tecido é responsável pela formação de células de linha de defesa, tais como linfócitos e monócitos. A presença de corpo estranho ou biomaterial nesta região implica em um processo inflamatório para combater o que o corpo detecta como estranho a ele com possibilidades de destruição do próprio tecido. Por outro lado, o processo inflamatório relacionado ao reparo ósseo da região pode indicar um adequado potencial de uso do biomaterial (CORMACK, 2001; CARNEIRO; JUNQUEIRA, 2004).

Com base nisso, o presente estudo objetivou verificar o processo de reparo ósseo frente à utilização dos biomateriais Bio-Ossão®, Osteogen® e Bone Ceramic® em um modelo experimental com defeitos criados no fêmur de ratos, através de análise histológica, avaliando também a taxa de interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) presente em cada processo inflamatório existente no reparo ósseo.

ARTIGO 1

ESTUDO DO MODELO DE FÊMUR DE RATOS COMO PROTOCOLO PARA PESQUISAS COM BIOMATERIAIS

INTRODUÇÃO

O modelo animal experimental de ratos é consagrado na literatura como base para experimentos em todos os campos da ciência. Protegida por Lei e normas de pesquisa, a utilização deste modelo requer cuidados e responsabilidade dos pesquisadores (LIEBSCHNER, 2004).

As propriedades biomecânicas do fêmur de ratos estão bem estabelecidas e têm sido estudadas por vários autores. (SONTAG, 1986; JORGENSEN; BAK; ANDREASSEN, 1991; BARENGOLTS *et al.*, 1993; LIEBSCHNER, 2004)

O uso da medula do fêmur em ratos apresenta-se com grande potencial no estudo da angiogênese e osteogênese e os processos inflamatórios envolvidos. Sontag em 1986 estudou a neoformação óssea na cortical interna do fêmur e apresentou uma descrição das corticais do fêmur (SONTAG, 1986).

Wang e colaboradores, 2013 demonstram o potencial de estudo da reparação óssea que a cortical interna do fêmur apresenta para estudos de biomateriais. (WANG *et al.*, 2013).

Células-tronco da medular de fêmur e tíbia de ratos foram isoladas. Estas células apresentaram forte capacidade de diferenciação osteogênica e adipogênica, além de alta taxa de proliferação (FU *et al.*, 2012).

A medula óssea é um tecido complexo que contém células-tronco com propriedades hematopoiéticas. As células-tronco hematopoiéticas são a principal fonte de células do sangue no organismo adulto reguladas no microambiente das células do estroma da medula. É um dos muitos métodos para isolar células-tronco hematopoiéticas em fêmur ou tíbia de ratos, coelhos ou humanos é através da introdução de polietileno biológico na medula óssea, havendo aderência dessas células ao biomaterial (POLISETTI *et al.*, 2010).

Outras áreas de uso para pesquisa em ratos são: calota craniana e tíbia. Estudos que empregaram a calota craniana de ratos como modelo experimental apresentaram cortes histológicos com pequena área de investigação (GÖELZER, *et al.* 2012). O mesmo foi observado por Grandi em 2007 e por Machado *et al.* em 2008 que referem o deslocamento de material associado ao defeito durante a confecção das lâminas histológicas devido à pequena espessura óssea.

MATERIAL E MÉTODO

A pesquisa foi aprovada pela CEUA/PUCRS (11/00237). O estudo foi norteado pelos Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, segundo a Lei Federal de 09 de outubro de 2008.

Foram utilizados 36 ratos *Wistar* machos, com 8 semanas e com cerca de 300 gramas. O número de amostras deste estudo está baseado em Grandi, 2007.

A distribuição dos animais em quatro grupos conforme quadro abaixo:

	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo Controle
Amostras	n=9	n=9	n=9	n=9
Morte	30 dias	30 dias	30 dias	30 dias

Quadro 1 - distribuição dos grupos.

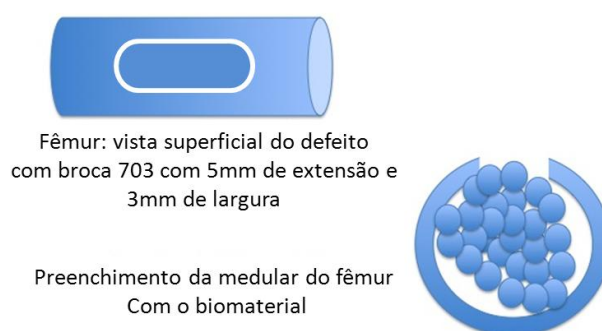


Figura 1 – Esquema do defeito no fêmur e inserção do Biomaterial.

Grupo I - Bio-oss® preenchendo o defeito ósseo criado no fêmur de 9 ratos. Conforme a Figura 1.

Grupo II - Osteogen® preenchendo o defeito ósseo criado no fêmur de 9 ratos. Conforme a Figura 1.

Grupo III - Bone Ceramic® preenchendo o defeito ósseo criado no fêmur de 9 ratos. Conforme a Figura 1.

Grupo Controle

Para o experimento do grupo controle, foi feito o defeito ósseo no fêmur de 9 ratos, com o preenchimento da medular do fêmur com coágulo sanguíneo. Conforme Figura 1, mas sem inserção de material.

Protocolo anestésico

O protocolo utilizado foi com infiltração de 75mg/kg de Cloridrato de Quetamina (Ketamina Agener® 10%, Agener) e 10mg/kg de Cloridrato de Xilazina (Calmun®, Agener) administradas via intraperitoneal. No local da intervenção cirúrgica, foi realizada infiltração de 1,0ml de Cloridrato de Lidocaína a 2%, 1:100.000 de adrenalina (Lidostesim® SV, DFL).

Acesso Cirúrgico

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Laboratório de Farmacologia Aplicada (Sala 148), da Faculdade de Farmácia da PUC-RS em ambiente separado do ambiente de criação.

Foi realizada a tricotomia da pele associada à superfície do fêmur com barbeador elétrico e degermação com iodoform aquoso 10%. Colocação de campo cirúrgico estéril e infiltração de 1,0ml de anestésico local lidocaína a 2% com vasoconstritor 1:100.000 de adrenalina (Lidostesim® SV, DFL). Incisão cutânea com lâmina nº 15 montada em cabo nº 3, divulgação dos tecidos por planos até a localização do perióstio na superfície lateral do fêmur. Incisão do perióstio e descolamento do mesmo e exposição e fixação da área do fêmur com duas pinças Backhaus. Uma broca 703 (Komet®, Alemanha) montada em peça-de-mão reta com velocidade de 2000rpm, em motor elétrico NSK Intrasurg XT® (NSK, Nakanishi, Japão) realizou uma perfuração de 5mm de

comprimento por 3mm de largura, chegando em medular. A irrigação local foi contínua com solução fisiológica 0,9%.

Os defeitos confeccionados foram lavados com solução fisiológica 0,9% e inserido o biomaterial conforme os grupos (Grupo I, II, III e Grupo Controle), para isolar os defeitos foi utilizada uma membrana de colágeno Collatape® (Zimmer Dental, Carlsbad, USA).

Após este procedimento, o periósteo e a pele foram suturados com fio Ethicon Mononylon 4-0 (Johnson e Johnson®, USA), com pontos simples e interrompidos.

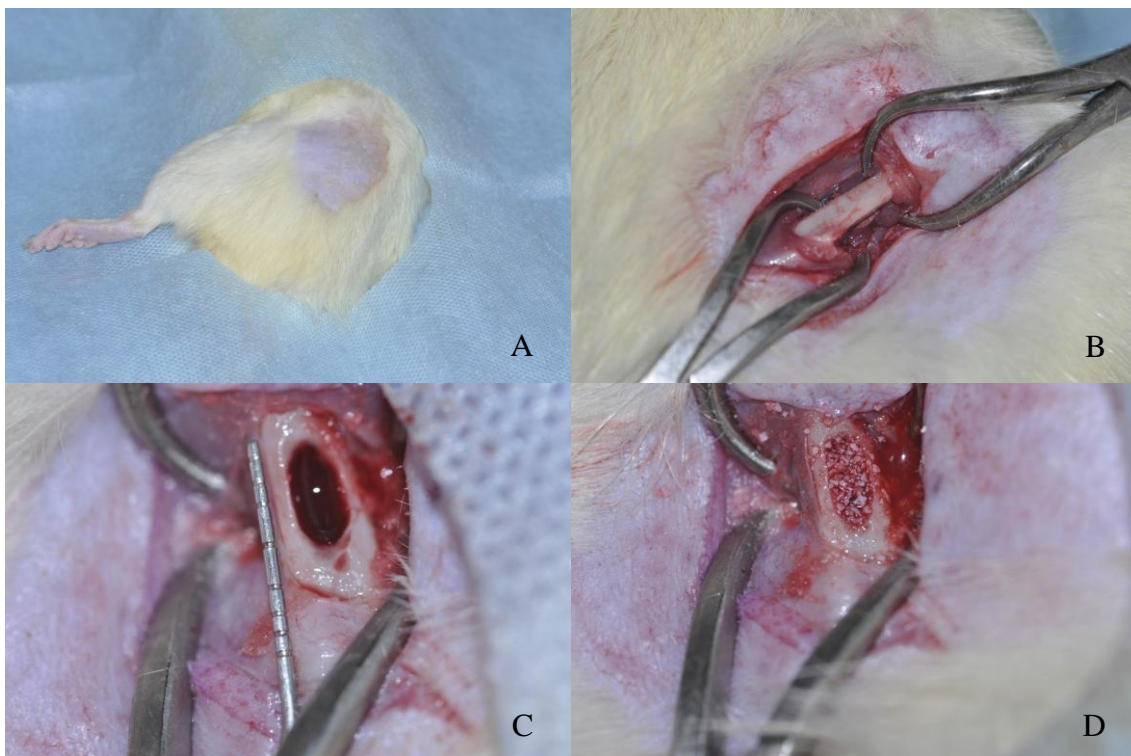


Figura 2- A) superfície lateral da coxa tricotomizada; B) acesso ao fêmur; C) medida do defeito ósseo; D) biomaterial inserido no defeito ósseo.

Durante o pós-operatório imediato, nas primeiras 24 horas, foi administrado, via oral, o analgésico Tylenol® (Jenssen-Cilag, Brasil) 200mg/mL, na dose de 50mg/Kg de peso corporal, diluído em água durante 4 dias. Também por via oral foi administrado antibiótico Tetraciclina (Bunker, Brasil) 500mg/ml, na dose de 100mg/Kg de peso corporal, diluído em água durante 3 dias pós-operatórios. Todos os animais foram acompanhados pela equipe de pesquisa durante o pré, trans e pós-operatório.(GONDIM et al., 2009).

RESULTADOS

A utilização do fêmur de ratos para a pesquisa mostrou-se satisfatória, não havendo complicações como infecções ou fraturas no osso.

Os ratos recuperaram-se sem complicações dos procedimentos anestésicos, e a capacidade de movimentação com o acesso cirúrgico proposto foi recuperada em 24 horas após o procedimento.

A obtenção das amostras também foi adequada, pois a desarticulação da junção coxo-femural e fêmur-tibial é de fácil execução. Não houve fratura de fêmur na obtenção das amostras.



Figura 3- Esquerda: acesso cutâneo para obtenção da amostra; Direita: fêmur desarticulado com área de defeito visível.

As amostras, adquiridas após eutanásia dos animais mediante Isoflurano 10%, protocolo da CEUA/PUC-RS, foram descalcificadas em solução de EDTA 10% durante 30 dias. A cada 48 horas o EDTA foi trocado e a amostra inspecionada com alfinete até chegar ao ponto em que o alfinete atravessou a amostra com pressão leve. Neste momento a amostra foi recortada com limites de 5mm de distância em relação ao defeito cirúrgico e parafinadas. Com micrótomo foram obtidos cortes de 5 micrometros de espesura em sentido transversal ao longo eixo do fêmur. As lâminas foram coradas com HE, sendo que em cada lâmina havia quatro cortes de cada fêmur de forma semi-seriada. Ao microscópio observou-se toda a estrutura cortical do fêmur em sua integridade, bem como o biomaterial associado ao seu lúmen. Os cortes permitiram a visualização ao microscópio óptico de estruturas como: osso neoformado, defeito criado, osso cortical prévio ao defeito e biomateriais.

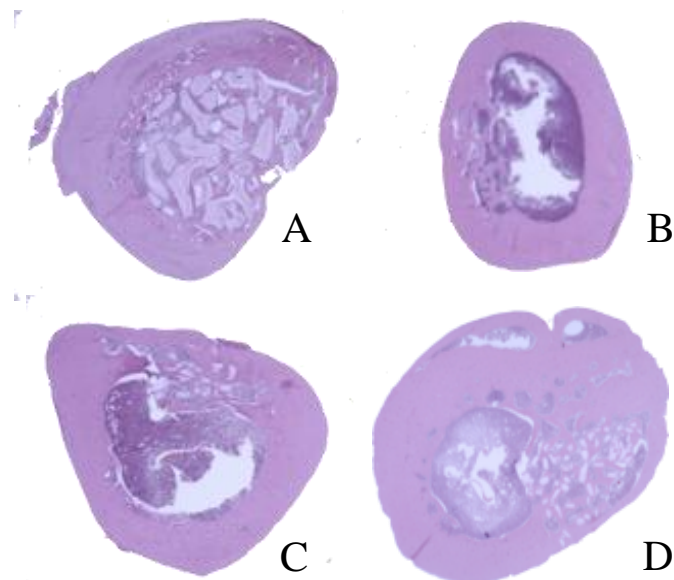


Figura 4- A) Imagem do corte histológico 40x HE Bio-oss®; B) Imagem do corte histológico 40x HE Coágulo; C) Imagem do corte histológico 40x HE Osteogen®; D) Imagem do corte histológico 40x HE Bone-ceramic®.

O uso do *software Image J Plus* foi feito com base em padronização das imagens com guia de milimetragem para que todas as medidas feitas estivessem dentro do mesmo padrão.

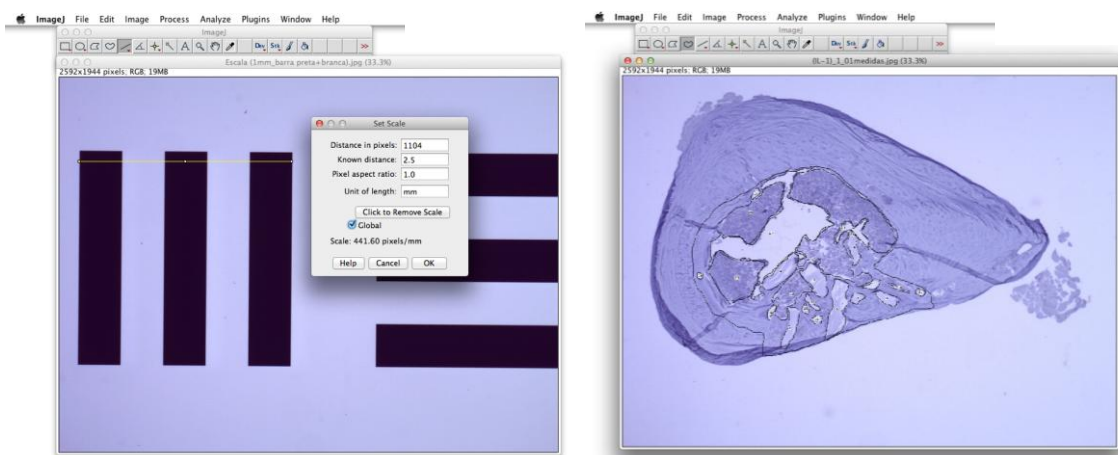


Figura 5- Esquerda: calibração segundo o protocolo do microscópio Olympus CX2. Direita: imagem histológica com a delimitação das áreas de biomateriais, osso neoformado e espaços vazios.

A guia de milimetragem é padrão para cada microscópio e pode ser intra-imagem ou com padrão externo, sendo este último utilizado neste estudo.

A partir da delimitação das áreas marca-se a opção de medida e o cálculo da área demarcada em milímetros quadrados apresenta-se em uma tabela que deve ser transferida para o *software Microsoft Excell 2010* para cálculo estatístico.

DISCUSSÃO

Com base no número de ratos operados, o modelo experimental de fêmur de rato mostrou-se adequado e discutem-se alguns aspectos.

Sugere-se que o protocolo medicamentoso seja eficaz. O protocolo anestésico infiltrado com base na massa de cada animal e com associação de

quetamina e xilazina mostrou-se eficaz, com segurança e qualidade anestésica durante o procedimento cirúrgico. A infiltração local de 1,0ml do tubete de lidocaína 2% com vasoconstritor 1:100.000 de adrenalina mostra-se altamente indicada pela analgesia local, bem como hemostasia. O acesso cirúrgico ao fêmur é um acesso que provoca maior risco de sangramento devido à grande área muscular exposta durante o procedimento. Verificou-se sangramento mínimo e capacidade visual total do campo operatório conforme Figura 2. A utilização das pinças Backhaus facilita a visualização e o acesso para osteotomia da região. Com vistas a reduzir a possibilidade de infecção pós-operatória, a cada animal campos novos e estéreis foram utilizados, bem como instrumental esterilizado, evitando contaminação externa ao procedimento. O uso de Tetraciclina foi eficaz em impedir infecção pós-operatória. Do ponto de vista da analgesia, o Tylenol® mostrou-se eficaz no controle da dor pós-operatória, onde a partir de 24 horas não houve sinais de claudicação nos animais. Não foram observadas deiscência de sutura.

Conforme visualizado na Figura 4, os biomateriais inseridos mantiveram-se em posição durante o período do experimento e não foram deslocados por forças mecânicas, nem durante a confecção das lâminas. O uso da membrana de colágeno mostrou-se eficaz em promover a seleção de tecidos, já que tecido mole não esteve associado à área do defeito.

Outro aspecto a ser relatado é a ausência de alteração das funções motoras dos ratos durante o estudo e a ausência de processos infecciosos. Todos os sítios no momento de obtenção das amostras estavam clinicamente saudáveis e após a confecção dos cortes histológicos todos apresentaram neoformação óssea associada aos biomateriais. (Figura 4)

A obtenção das amostras, 30 dias após o acesso cirúrgico, se mostrou de fácil execução desde o momento da remoção do fêmur até o momento da peça ser parafinada e cortada a cada 5 micrometros no sentido transversal do longo eixo do fêmur. Os cortes foram feitos de forma semi-seriada com quatro cortes inseridos por lâmina. (Figura 3)

Um dos procedimentos mais críticos é a descalcificação do fêmur, realizada para adequada confecção de lâminas com cortes de 5 micrometros de espessura. O procedimento de descalcificação com EDTA 10% é mais lento que outros processos, mas garante a manutenção de um arcabouço do fêmur. O período de descalcificação foi de 30 dias e a cada 48 horas o EDTA foi substituído. Nesse momento, foi aplicado com pressão manual um alfinete sobre amostra com o intuito de atravessar a amostra. Após 30 dias isso foi possível e então cortes adicionais foram feitos para delimitar melhor o campo utilizado para a confecção do bloco de parafina.

A espessura de corte da amostra mostrou-se eficaz na confecção das lâminas, permitindo avaliar a estrutura cortical do fêmur em sua integridade, bem como o biomaterial associado ao seu lúmen. Os cortes permitiram a visualização ao microscópio óptico de estruturas como: osso neoformado, defeito ósseo criado, osso cortical prévio ao defeito, biomateriais. Diferente de outros estudos com calota craniana e tíbia de ratos (GRANDI, 2007; MACHADO, 2008; GÖELZER *et al.* 2012) a quantidade de osso presente permite uma adequada visualização do biomaterial e suas interfaces entre o osso. As corticais espessas e o lúmen permitem cortes onde o biomaterial não é deslocado durante a confecção das lâminas, o que normalmente ocorre na calota e tíbia. Além disso, a inserção do biomaterial no defeito ósseo criado,

interior do lúmen do fêmur, não permite que ocorra a ação de forças mecânicas sobre o material, dificultando o processo de cicatrização e/ou alterando o processo inflamatório.

O uso do *software Image J Plus* foi essencial e feito com base em padronização das imagens com guias de milimetragem para que todas as medidas feitas estivessem dentro do mesmo padrão. A delimitação da área de defeito ósseo, área ocupada por biomaterial, área de osso neoformado e espaços vazios podem ser delimitadas com ferramentas presentes no *software* e o cálculo dessas áreas é imediatamente transferido para o *software* de estatística.

CONCLUSÃO

A partir do estudo realizado, sugere-se que o fêmur de rato apresenta grande potencial para pesquisas com biomateriais em relação ao reparo ósseo. Outras possibilidades são estudos de citotoxicidade, genotoxicidade e substâncias que possam interferir com as funções hematopoéticas do fêmur.

ARTIGO 2

AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO ÓSSEA COM DIFERENTES BIOMATERIAIS EM FÊMUR DE RATOS

INTRODUÇÃO

A neoformação óssea envolve uma sequências de eventos que se inicia com uma reação inflamatória (BROWDER *et al.*, 1988), em que os macrófagos e outras células do sistema imune são recrutados para o local do defeito e há liberação de vários fatores, incluindo IL-1, IL-6, e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (KON *et al.*, 2001). Estas citocinas pró-inflamatórias estão associadas com a resposta inata do tecido à presença de lesões, mas também são conhecidas por aumentar a síntese de matriz extracelular, estimular a angiogênese, e recrutar células mesenquimais endógenas para o local da lesão (CHO *et al.*, 2001). IL-1, IL-6 e TNF- α desempenham importantes papéis reguladores na remodelação óssea e na homeostase (KIMBLE *et al.*, 1997) e, por meio de uma variedade de mecanismos, regulam a atividade dos osteoclastos, quer através da estimulação de células progenitoras hematopoiéticas diferenciando em osteoclastos maduros ou através da ativação de osteoclastos existentes (JILKA *et al.*, 1992).

A interleucina-1 (IL-1) é uma citocina pró-inflamatória produzida por uma variedade de células, tais como monócitos, linfócitos, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos. A IL-1 estimula a reabsorção óssea, e é encontrada

em concentrações elevadas em torno do processo de perda e substituição óssea (MUNDY, 1993; HARADA *et al.*, 1994).

O efeito da tensão mecânica sobre a expressão de mRNA dos fatores de crescimento e citocinas foi estudada em uma linha de células de osteosarcoma (SaOS-2) e observou-se que a expressão de IL-6mRNA foi induzida após 24 horas. Esta descoberta sugere que as citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, são induzidas pelas células e apresentam um papel fundamental na neoformação óssea ou remodelação (CILLO *et al.*, 2000; CHO *et al.*, 2007).

TNF- α é um mediador-chave que aumenta a ação de osteoclastos em tecidos adjacentes aos locais de osteólise peri-implantar. Sugere-se identificar o TNF- α como um alvo potencial para a terapia osteolítica de lesões peri-implantares. A utilização de fármacos que inibem a ação do TNF- α é largamente aceita para o tratamento da artrite reumatoide em pacientes que não respondem a terapias anti-inflamatórias tradicionais (SABOKBAR *et al.*, 2003; SCHWARZ *et al.*, 2003; ROKN *et al.*, 2011).

Biomateriais apresentam propriedades osteocondutoras e as células osteoblásticas e osteoclásticas respondem às citocinas durante o processo de reparo ósseo. Tanto o reparo, como a reabsorção, estão relacionados com citocinas pró-inflamatórias. (LEMONS, 2004)

Ainda há vários aspectos de ação das citocinas frente ao uso de biomateriais a serem investigados. O presente estudo em fêmur de ratos procura identificar a presença dessas citocinas após 30 dias de implantação de diferentes biomateriais.

MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi aprovada pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) da PUC-RS, protocolo 11/00237. Para este estudo, 36 ratos, *Wistar*, machos foram utilizados. Os ratos tinham 8 semanas e pesavam aproximadamente 300g. Ração e água eram providenciados diariamente e a sala era mantida a 22°C com ciclos de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão.

Os ratos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: Grupo I - Bio-Oss® (Geistlich Sons Ltd. Wolhusen, Suíça); Grupo II - Bone Ceramic® (Straumann AG, Basel, Suíça); Grupo III - Osteogen® (Impladent Ltd., Hollywood, EUA); Grupo Controle – coágulo. Excetuando-se o tipo de material enxertado ou a manutenção apenas de um coágulo, todos os grupos receberam o mesmo tipo de cuidado e tratamento no pré, no trans e no pós-operatório. Todos os grupos receberam uma membrana de colágeno Collatape® (Zimmer Dental, Carlsbad, USA).

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob condições individuais de assepsia e em ambiente separado do ambiente de criação.

O protocolo anestésico utilizado foi com infiltração de 75mg/kg de Cloridrato de Quetamina (Ketamina Agener® 10%, Agener) e 10mg/kg de Cloridrato de Xilazina (Calmium®, Agener) administradas via intraperitonal. No local da intervenção cirúrgica, após tricotomia realizada com barbeador elétrico, degermação com iodoform aquoso 10% e cobertura por campo estéril, foi realizada infiltração com 1,0ml de Cloridrato de Lidocaína a 2% e 1:100.000 de adrenalina (Lidostesim® SV, DFL). Local adequado para o acesso cirúrgico, a incisão cutânea com lâmina nº 15 montada em cabo nº 3 foi realizada. Após,

divulção dos tecidos por planos até a localização do periósteo na superfície lateral do fêmur. Para exposição do tecido ósseo, foi necessária a incisão do periósteo e descolamento do mesmo, além da exposição e fixação da área do fêmur com duas pinças Backauss. Uma broca 703 (Komet® – Alemanha) montada em peça-de-mão reta com velocidade de 2000rpm, em motor elétrico NSK Intracurg XT® (NSK, Nakanishi, Japão) realizou uma perfuração de 5mm de comprimento por 3mm de largura, chegando em medular. A irrigação local foi contínua com solução fisiológica de NaCl 0,9%.

Os defeitos confeccionados foram lavados com soro fisiológico e inserido o biomaterial conforme os grupos (Grupo I, II, III) e mantido somente com coágulo, Grupo Controle. Após, cobertos com membrana de colágeno antes da sutura com fio Ethicon Mononylon 4-0 (Johnson e Johnson®, USA), com pontos simples e interrompidos.

Durante o pós-operatório imediato, nas primeiras 24 horas, foi administrado, via oral, o analgésico Tylenol® (Jenssen-Cilag, Brasil) 200mg/mL, na dose de 50mg/Kg de peso corporal, diluído em água durante 4 dias. Também por via oral foi administrado antibiótico Tetraciclina (Bunker, Brasil) 500mg/ml, na dose de 100mg/Kg de peso corporal, diluído em água durante 3 dias pós-operatórios. Todos os animais foram acompanhados pela equipe de pesquisa durante o pré, trans e pós-operatório (GONDIM *et al.*, 2009). Os ratos recuperaram-se sem complicações aos procedimentos anestésicos com capacidade de movimentação normal em 24 horas após o procedimento cirúrgico.

Amostras

Trinta dias após o procedimento cirúrgico foi feita a eutanásia dos animais com Isoflurano 10% (protocolo CEUA-PUCRS) e remoção de cada fêmur operado. As amostras foram descalcificadas em solução de EDTA 10% durante 30 dias. Para o preparo das lâminas e posterior análise imunohistoquímica, foram feitas secções multi-seriadas de 5µm de espessura, obtidas com o auxílio de um micrótomo (Leica, SM 2000R, Alemanha). Os cortes foram colocados em lâminas com carga positiva (Flex IHC Microscope Slides, DAKO,USA) e levados à estufa a 60°C por 24h.

A exposição do antígeno, através da metodologia de recuperação antigênica induzida por calor à alta temperatura, foi realizada na plataforma PTLINK (DAKO, USA) em solução Envision Flex Solução de Recuperação antigênica pH alto por 40 minutos.

Após este período, foi realizada a lavagem das lâminas em tampão PBS, pH 7.2. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com solução de 3% de H₂O₂ em álcool metílico em duas incubações de 15 minutos seguido de três ciclos de lavagem com tampão PBS, pH 7.2.

Os anticorpos anti-IL-6, clone 1 (Santa Cruz Biotechnology, SC130326), anti-IL-1, clone H153 (Santa Cruz Biotechnology, SC7884) e TNFα, clone N20 (Santa Cruz Biotechnology, SC52746) foram diluídos em 1:100 com o diluente Antibody Diluent with background reducing components (Dako,USA). Os cortes foram incubados pela metodologia de capilaridade através da estação de imuno-coloração Sequenza (Thermo Shandon, USA) overnight em temperatura entre 2°C e 6°C seguido de 3

lavagens com tampão PBS, pH 7.2. Para amplificação da reação antígeno-anticorpo utilizou-se o sistema Advanced HRP (Dako, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. A seguir, as lâminas foram lavadas com tampão PBS, pH 7.2, e incubadas com solução de diaminobenzidina (Liquid DAB Substrate Chromogen System, Dako USA) por 5 minutos. Após lavagem em água destilada, as lâminas foram contra coradas com Hematoxilina de Harris por 1 minuto seguido de lavagem em água corrente até remoção completa do corante, e incubadas em um solução de amônia 37mM por 15 segundos. Para finalizar, as lâminas foram desidratadas em álcool etílico absoluto (quatro incubações de 2 minutos) e após, realizado dois tratamentos com xileno por 5 minutos. As lâminas foram montadas em equipamento Coverslipper (Dako, USA). Levadas ao microscópio, observou-se toda a estrutura cortical do fêmur em sua integridade, bem como o biomaterial associado à medular com aumento de 40x. Os cortes permitiram a visualização ao microscópio óptico de estruturas como: osso neoformado, o defeito ósseo criado, osso cortical prévio ao defeito, biomateriais, taxa de marcação por IL-1, IL-6 e TNF- α . A taxa foi avaliada segundo Scarparo *et al.*, 2012. Observando-se graus de presença de infiltrado corado por IL-1, IL-6 e TNF- α , sendo esses: negativo (0), leve (1), moderado (2) e severo (3).

O uso do *software Image J Plus* foi feito com base em padronização das imagens com guias de milimetragem para que todas as medidas feitas estivessem dentro do mesmo padrão. Os avaliadores, no número de três, com diferentes graus de experiência foram calibrados e aferidos pelo ICC, índice de

correlação intraclasse. Um avaliador conhecedor do conteúdo das lâminas e dois cegos em relação aos biomateriais.

Os avaliadores, no número de três, realizaram 10 avaliações completas em diferentes lâminas e os resultados submetidos ao ICC, cujo resultado mostrou que ambos estavam calibrados entre si. A correlação é considerada com um resultado bom quando apresenta um índice de correlação igual ou maior que 0,8, com um $p < 0,05$. Neste caso, a correlação intraclasse levou em consideração *área total do defeito criado; número de partículas do biomaterial utilizado; área da soma das partículas do biomaterial utilizado e área de espaços vazios existentes*, obtendo como resultados, respectivamente: ICC = 0,846 com $p = 0,004$; ICC = 0,979 com $p < 0,001$; ICC = 0,989 com $p < 0,001$; ICC = 0,943 com $p < 0,001$. A utilização do ICC foi feita tendo em vista que este índice avalia a taxa de acertos entre os examinadores, determinando se estes estão ou não calibrados entre si.

RESULTADOS

Mediante a calibração, foi possível mensurar os resultados da pesquisa, através da Análise de Variância (ANOVA), que avaliou: *área de neoformação óssea, área de biomaterial e área de espaços vazios* em cada defeito ósseo criado de cada lâmina, constatando-se que não houve diferença significativa na média da área de neoformação óssea entre os diferentes biomateriais. De acordo com o teste de análise de variância (ANOVA), obteve-se um nível de significância de 0,484.

No entanto, entre os grupos da média da área de grânulos de biomaterial restante após 30 dias da intervenção houve diferença significativa ($p < 0,001$). O grupo com maior área de grânulos de biomaterial não-absorvido

foi o Bio-oss ($M=1,085 \text{ mm}^2$) e o grupo com menor área foi o Bone Ceramic ($M=0,266\text{mm}^2$). O teste post-hoc de Tukey mostrou que houve diferença significativa entre o grupo Bio-oss e Bone ceramic ($p=0,002$); e entre Bio-oss e Osteogen ($p=0,004$). Contudo, não houve diferença significativa entre o grupo Bone ceramic e Osteogen ($p=0,954$).

Quanto à análise da soma das áreas de espaços vazios existentes em cada defeito ósseo das lâminas microscópicas, a maior área média encontrada foi no grupo Bone Ceramic ($M=1,095\text{mm}^2$), enquanto que a menor área de espaços vazios estava no grupo Osteogen ($M=0,679\text{mm}^2$). Contudo, o teste de análise de variância (ANOVA) mostrou que estas diferenças não são estatisticamente significativas ($p=0,329$).

Quanto à taxa de marcação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , o biomaterial Osteogen mostrou os maiores índices, seguido de Bone Ceramic, coágulo e, com menor taxa, Bio-oss. Em relação à IL-1 o biomaterial que mostrou os maiores índices foi o Osteogen, seguido de coágulo, Bio-oss e, com menor taxa, o Bone Ceramic. Em relação à IL-6 o biomaterial Bio-oss mostrou os maiores índices, seguido de Bone Ceramic, Osteogen e, com menor taxa, o coágulo.

ÁREA DE NEOFORMAÇÃO ÓSSEA

Quadro 1. Área de formação óssea após 30 dias da intervenção

GRUPO	N	MÉDIA (mm ²)	DESVIO PADRÃO (mm ²)	MÍNIMO (mm ²)	MÁXIMO (mm ²)
BIO-OSS®	9	3,790	0,946	2,742	5,493
BONE CERAMIC®	9	3,786	1,032	2,062	5,034
OSTEOGEN®	9	4,261	0,872	2,897	5,245
COÁGULO	9	3,677	0,441	2,983	4,519
TOTAL	36	3,878	0,848	2,062	5,493

Análise de variância (ANOVA): $p=0,484$.

ÁREA DE BIOMATERIAL

Quadro 2. Área de biomaterial restante em cada grupo após o período de 30 dias da intervenção.

GRUPO	N	MÉDIA (mm ²)	DESVIO PADRÃO (mm ²)	MÍNIMO (mm ²)	MÁXIMO (mm ²)
BIO-OSS®	9	1,085	0,735	0,00	2,073
BONE CERAMIC®	9	0,266	0,182	0,00	0,508
OSTEOGEN®	9	0,328	0,169	0,091	0,616
TOTAL	27	0,560	0,573	0,00	2,073

Análise de variância (ANOVA): $p<0,001$.

ÁREA DE ESPAÇOS VAZIOS

Quadro 3. Área de espaços vazios dentro dos defeitos ósseos após 30 dias da intervenção

GRUPO	N	MÉDIA (mm ²)	DESVIO PADRÃO (mm ²)	MÍNIMO (mm ²)	MÁXIMO (mm ²)
BIO-OSS®	9	0,780	0,678	0,206	2,390
BONE CERAMIC®	9	1,095	0,664	0,00	2,122
OSTEOGEN®	9	0,679	0,402	0,217	1,503
COÁGULO	9	1,050	0,424	0,335	1,710
TOTAL	36	0,901	0,562	0,00	2,390

Análise de variância (ANOVA): $p=0,329$.

Em relação à taxa de marcação de citocinas observou-se conforme quadro abaixo:

Quadro 4. Taxa de marcação de IL-1, IL-6 e TNF- α

GRUPO	N Total	N Parcial marcado em TNF- α	Taxa TNF- α	N Parcial marcado em IL-1	Taxa IL-1	N Parcial marcado em IL-6	Taxa IL-6
BIO-OSS®	9	7	0	3	0	2	1
		2	1	6	1	4	2
						3	3
BONE CERAMIC®	9	5	0	8	0	1	0
		2	1	1	1	1	1
		1	2			4	2
		1	3			3	3
OSTEOGEN®	9	2	0	4	0	7	1
		3	1	4	1	2	2
		2	2	1	3		
		2	3				
COÁGULO	9	3	0	6	0	8	1
		3	1	1	1	1	2
		3	2	2	2		
TOTAL	36	15	0	21	0	1	0
		8	1	12	1	18	1
		5	2	2	2	11	2
		3	3	1	3	6	3

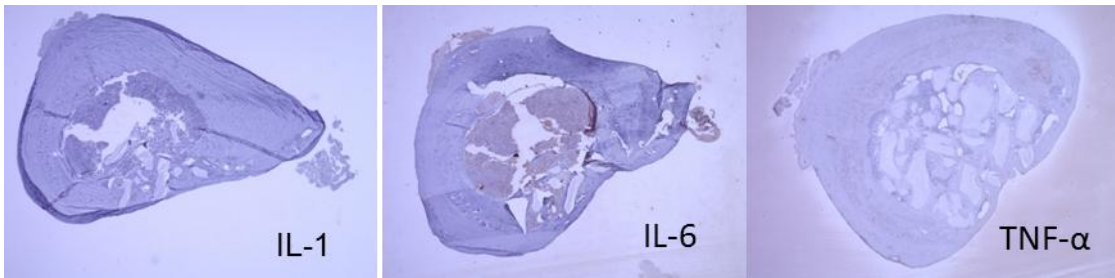


Figura 1- Cortes histológicos 40x Bio-oss.

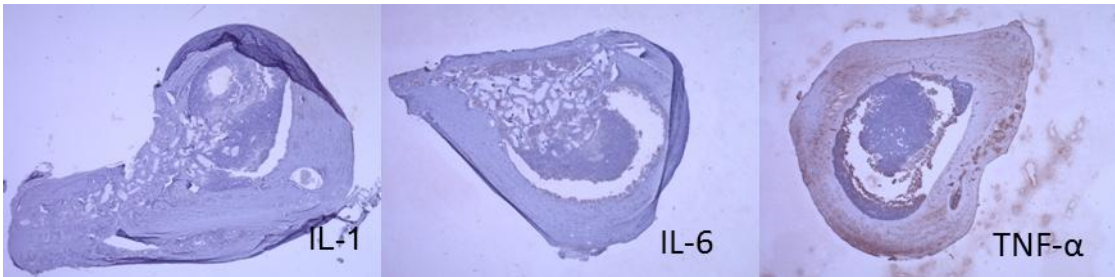


Figura 2- Cortes histológicos 40x Osteogen.

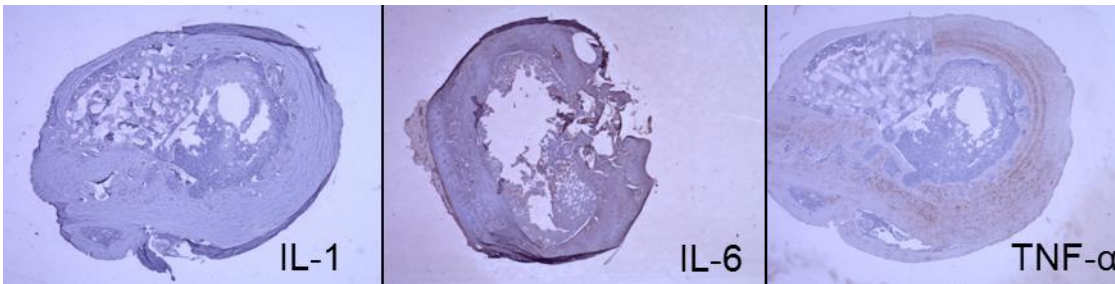


Figura 3- Cortes histológicos 40x Bone Ceramic.

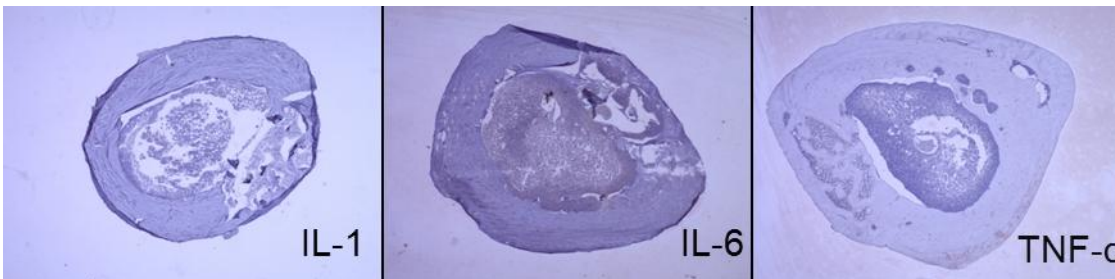


Figura 4- Cortes histológicos 40x Coágulo.

DISCUSSÃO

Os avaliadores, no número de três, foram calibrados e aferidos pelo ICC, sendo dois destes completamente cegos em relação às lâminas.

Em relação à área de neoformação óssea não houve diferenças significativas entre os biomateriais e o coágulo. Isto implica em dizer que o reparo da cortical óssea ocorreu independente do biomaterial. Como o objeto de estudo do presente trabalho não era avaliar um defeito crítico e sim a relação que cada biomaterial teria de interferência nas citocinas estudadas em meio à medula do fêmur, o resultado encontra-se dentro do esperado. Vários artigos na literatura comprovam a capacidade de reparo ósseo frente à utilização desses biomateriais (CORSAIR, 1990; DONOHUE; MASCRÈS, 1993; CLERGEAU *et al.*, 1996; BERGLUNDH; LINDHE, 1997; HURZELER *et al.*, 1997; HAMMERLE *et al.*, 1998; PIATTELLI *et al.*, 1999; NOMURA *et al.*, 2005; MIRANDA *et al.*, 2005; EPSTEIN; VALEN, 2006; ORSINI *et al.*, 2007; SIMION *et al.*, 2007; JAFARIAN *et al.*, 2008).

Em relação à área de biomaterial presente após 30 dias observou-se diferença significativa ($p < 0,001$). O Bone Ceramic foi o grupo que apresentou maior incorporação pelo osso, enquanto o Bio-oss foi o material que mais apresentou grânulos. Sabendo-se que os materiais utilizados apresentam a estrutura granular semelhante, supõe-se que houve maior incorporação de Bio-oss em relação aos demais biomateriais. O comportamento do Bone Ceramic e Osteogen mostrou-se similar, possivelmente porque estes apresentam estrutura química mais próxima, sendo sintéticos. Uma das possibilidades de menor reabsorção do Bio-oss reside no fato de ser um derivado animal.

Em relação à análise da soma das áreas de espaços vazios existentes em cada defeito ósseo das lâminas microscópicas observou-se que as

diferenças não são estatisticamente significativas ($p=0,329$). Esta análise foi feita para descartar que artefatos na confecção das lâminas fossem incorporados como resultados válidos na avaliação da área de osso neoformado. Outro objetivo com esta análise é verificar quanto de biomaterial de cada lâmina poderia ser deslocado durante o processo de confecção das mesmas, e os resultados sem diferença estatística mostram que o modelo de fêmur de rato é seguro em relação à permanência do biomaterial inserido no seu sítio após a confecção das lâminas histológicas.

Com relação às citocinas pró-inflamatórias, observou-se que os biomateriais e coágulo influenciam a marcação de IL-1, IL-6 e TNF- α de formas diferentes e a real implicação de cada um ainda não é totalmente conhecida, mas cabem algumas inferências.

O período de 30 dias em relação ao metabolismo do rato mostra-se tardio em relação ao reparo ósseo. Neste momento, a remodelação óssea está mais ativa do que a neoformação óssea e, portanto, o processo inflamatório presente deveria ser de baixa intensidade para citocinas de alta relação com reabsorção óssea.

O Bio-oss mostrou uma taxa baixa de TNF- α , sendo em apenas dois sítios uma taxa leve (1). O mesmo ocorreu com IL-1, mas mostrando em seis sítios taxa leve. Em relação à IL-6, a taxa foi de moderada à severa para a maioria dos sítios. Estes resultados implicam dizer que o Bio-oss apresenta-se em processo de remodelação óssea fisiológica, pois a baixa taxa de TNF- α com índice alto de IL-6 mostra equilíbrio neste processo.

O Bone Ceramic mostrou taxa mais alta de TNF- α em relação ao Bio-oss, manteve um equilíbrio em relação à IL-1 e resultados semelhantes à IL-6.

Estes resultados permitem sugerir que o Bone Ceramic em 30 dias em ratos ainda apresenta uma reabsorção estrutural de seus grânulos e que o período de remodelação óssea final ultrapassa o período estipulado por esta pesquisa. Permite sugerir também que, em 30 dias quando comparados Bio-oss e Bone Ceramic, o Bio-oss apresenta-se em um estágio de reparo ósseo mais avançado que o Bone Ceramic.

O Osteogen apresentou a taxa mais alta de TNF- α e IL-1 e mais baixa de IL-6 quando comparado ao Bio-oss e Bone Ceramic. Estes resultados permitem afirmar que o período de reparo ósseo associado ao Osteogen excede o período do estudo. Em segundo lugar, no período de 30 dias, o biomaterial ainda está em alta atividade de remodelamento quando comparado ao Bone Ceramic e ao Bio-oss.

As taxas altas de TNF- α e IL-1 mostram que apesar da área de tecido ósseo neoformado sejam estatisticamente sem diferenças entre os biomateriais, existe uma diferença significativa em relação ao processo inflamatório presente. O Bio-oss mostra-se como um material com resultado mais estável do ponto de vista de maturidade de reparo e o Osteogen é o mais imaturo no período de 30 dias.

CONCLUSÃO

As implicações clínicas a partir de um estudo em modelo animal são controversas, mas dentro do escopo do trabalho, um biomaterial com baixo índice de TNF- α e IL-1 e índice moderado de IL-6 mostra-se maduro em 30 dias.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS GERAIS

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS GERAIS

A partir do trabalho exposto, fica claro que a metodologia utilizada se mostrou adequada dentro de um estudo em modelo animal, podendo ser empregada como referência em novos estudos que envolvam animais.

Com relação à área de neoformação óssea ocorrida no fêmur de cada rato operado, não houve diferenças significativas entre os grupos avaliados, ou seja, o reparo da cortical óssea aconteceu independentemente de um biomaterial presente. No entanto, dentro das variações ocorridas no parâmetro de neoformação óssea, todos os biomateriais se mostraram superiores ao coágulo, o que indica cada um desses como materiais a serem utilizados na enxertia, promovendo aumento de volume ósseo; fato este que não ocorre frente apenas a coágulo.

Dentre os grupos avaliados, o grupo do Bio-oss mostrou menor incorporação do material ao tecido ósseo neoformado e com um baixo índice de TNF- α e IL-1, e um índice moderado de IL-6, mostrando maturidade óssea em 30 dias, o que demonstra que este biomaterial, assim como o Bone-Ceramic, que apresentou resultados semelhantes ao Bio-Oss, apresenta condições histológicas compatíveis com o processo de amadurecimento ósseo no período aproximado de 30 dias.

4. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO GERAL

4. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO GERAL

Barengolts EI, Curry DJ, Bapna MS, Kukreja SC. Effects of endurance exercise on bone mass and mechanical properties in intact and ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 1993;8(8):937–42.

Berglundh T, Lindhe J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res.* 1997 Apr;8(2):117-24.

Boyne PJ, James RA. Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone. *J Oral Surg.* 1980 Aug;38(8):613-6.

Browder W, Williams D, Lucore P, Pretus H, Jones E, McNamee R. Effect of enhanced macrophage function on early wound healing. *Surgery.* 1988 Aug;104(2):224-30.

Buma P, Schreurs W, Verdonschot N.: Skeletal tissue engineering—from in vitro studies to large animal models. *Biomaterials*, 25:1487–1495, 2004.

Carneiro J, Junqueira LC. *Histologia Básica*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2004.

Cho KJ, Yun CH, Packer L, Chung AS. Inhibition mechanisms of bioflavonoids extracted from the bark of *Pinus maritima* on the expression of proinflammatory cytokines. *Ann N Y Acad Sci.* 2001 Apr;928:141-56.

Cho TJ, Kim JA, Chung CY, Yoo WJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA, Choi IH. Expression and Role of Interleukin-6 in Distraction Osteogenesis. *Calcif Tissue Int* ; 2007. 80:192_200

Cillo JE Jr, Gassner R, Koepsel RR, Buckley MJ. Growth factor and cytokine gene expression in mechanically strained human osteoblast-like cells: implications for distraction osteogenesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2000 Aug;90(2):147-54.

Clergeau LP, Danan M, Clergeau-Guérithault S, Brion M. Healing response to anorganic bone implantation in periodontal intrabony defects in dogs. Part I. Bone regeneration. A microradiographic study. *J Periodontol*. 1996 Feb;67(2):140-9.

Cormack DH. *Fundamentos de Histologia*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001.

Corsair A. A clinical evaluation of resorbable hydroxylapatite for the repair of human intra-osseous defects. *J Oral Implantol*. 1990;16(2):125-8.

Donohue WB, Mascrès C. A comparison of the effects of two hydroxyapatites and a methacrylate resin on bone formation in the rat ilium. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1993;8(1):75-82.

Epstein SR, Valen M. An alternative treatment of the periodontal infrabony defect: a synthetic bioactive resorbable composite graft. J Periodontol. 2006 Feb;25(2):92-7.

Fu WL, Zhang JY, Fu X, Duan XN, Leung KK, Jia ZQ, Wang WP, Zhou CY, Yu JK. Comparative study of the biological characteristics of mesenchymal stem cells from bone marrow and peripheral blood of rats. Tissue Eng Part A. 2012 Sep;18(17-18):1793-803. doi: 10.1089/ten.TEA.2011.0530. Epub 2012 Jul 30.

Goia, TS. Avaliação in vitro e in vivo de ligas porosas de Ti-13Nb-13Zr obtidas por metalurgia do pó. Dissertação de Mestrado. Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares associada à Universidade de São Paulo, 2008.

Göelzer, JG; Avelar, RL; Dolzan, AN; Becker, OE; Haas Jr, O; Oliveira, LAS; Oliveria, RB. Evaluation of tissue response and genotoxicity of poly(L/D-lactic acid) disks implanted in rat calvarium. Histol Histopathol, 27, 1551-1557 (2012).

Gondim ALMF. Efeito da laserterapia sobre a osteogênese em defeitos preenchidos com α -TCP e grânulos de β -TCP/HA confeccionados em calota craniana de ratos [Tese de Doutorado]. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2009.

Grandi G. Análise histomorfométrica comparativa entre o cimento de alfa-TCP e os grânulos de beta-TCP/HA no reparo ósseo de calotas cranianas de ratos

[Dissertação de Mestrado]. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2007.

Harada M, Miyahara T, Miyata M, Komiyama H, Sugure A, Ikemoto Y, Kondo S, Takamura T, Higuchi S, Otomo S. Calcium regulating activity of 24a-homo-24,24-difluoro-1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and 26,27-dimethyl-24,24-difluoro-1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *Calcif Tissue Int.* 1993 Nov;53(5):318-23.

Hämmerle CH, Chiantella GC, Karring T, Lang NP. The effect of a deproteinized bovine bone mineral on bone regeneration around titanium dental implants. *Clin Oral Implants Res.* 1998 Jun;9(3):151-62.

Hatano N, Shimizu Y, Ooya K. (2004) A clinical long-term radiographic evaluation of graft height changes after maxillary sinus floor augmentation with 2:1 autogenous bone/xenograft mixture and simultaneous placement of dental implants. *Clinical Oral Implants Research* 15: 339–345.

Hislop WS, Finlay PM, Moos KF. A preliminary study into the uses of anorganic bone in oral and maxillofacial surgery. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 1993 Jun;31(3):149-53.

Hürzeler MB, Quiñones CR, Kirsch A, Gloker C, Schüpbach P, Strub JR, Caffesse RG. Maxillary sinus augmentation using different grafting materials

and dental implants in monkeys. Part I. Evaluation of anorganic bovine-derived bone matrix. *Clin Oral Implants Res.* 1997 Dec;8(6):476-86.

Jafarian M, Eslaminejad MB, Khojasteh A, Mashhadi Abbas F, Dehghan MM, Hassanizadeh R, Houshmand B. Marrow-derived mesenchymal stem cells-directed bone regeneration in the dog mandible: a comparison between biphasic calcium phosphate and natural bone mineral. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008 May;105(5):e14-24. doi: 10.1016/j.tripleo.2008.01.010.

Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, Passeri G, Williams DC, Abrams JS, Boyce B, Broxmeyer H, Manolagas SC (1992) Increased osteoclast development after estrogen loss mediation by interleukin-6. *Science* 257:88_91

John, HD, Wenz, B. (2004) Histomorphometric analysis of natural bone mineral for maxillary sinus augmentation. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 19: 199–207.

Jorgensen PH, Bak B, Andreassen TT.: Mechanical properties and biochemical composition of rat cortical femur and tibia after long-term treatment with biosynthetic human growth hormone. *Bone*, 12:353–359, 1991.

Kim GS, Kim CH, Choi CS, Park JY, Lee KU (1997) Involvement of different second messengers in parathyroid hormone- and interleukin-1-induced

interleukin-6 and interleukin-11 production in human bone marrow stromal cells.
J Bone Miner Res 12:896_902

Kimble RB, Bain S, Pacifici R. The functional block of TNF but not of IL-6 prevents bone loss in ovariectomized mice. J Bone Miner Res. 1997 Jun;12(6):935-41.

Kon T, Cho TJ, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. J Bone Miner Res. 2001 Jun;16(6):1004-14.

LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. Clin Orthop Relat Res. 2002 Feb;(395):81-98.

Lemons JE. Biomaterials, biomechanics, tissue healing, and immediate-function dental implants. J Oral Implantol. 30(5): 318-24, 2004. Review.

Lemons, JE; Bidez, M.W. Endosteal Implant Biomaterials and Biomechanics. In: Endosteal EDntal Implants. McKinney Jr., RV. Saint Louis (Missouri): Mosby, 1991: 27-36

Liebschner MAK.: Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. Biomaterials, 25:1697–1714, 2004.

Machado RA, Silveira C, Oliveira RB.: Bone repair process in calvarial defects using bioactive glass and calcium sulfate barrier. *Acta Cirurgica*, v.23, n.4, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502008000400005>

Mangano C, Scarano A, Iezzi G, Orsini G, Perrotti V, Mangano F, Montini S, Piccirilli M, Piattelli A. Maxillary sinus augmentation using an engineered porous hydroxyapatite: a clinical, histological, and transmission electron microscopy study in man. *J Oral Implantol*. 2006;32(3):122-31.

Miranda, ES; Cardoso FTS; Medeiros Filho, JF; Barreto, MDR; Teixeira, RMM; Wanderley, AL; Fernandes, KE. Estudo experimental comparativo no uso de enxerto ósseo orgânico e inorgânico no reparo de fraturas cirúrgicas em rádio de coelhos. *Acta Ortopédica Brasileira*, v. 13, n.5, p. 245-8, 2005.

Mundy GR. Role of cytokines in bone resorption. *J Cell Biochem*. 1993 Dec;53(4):296-300.

Nery EB, Lynch KL, Hirthe WM, Mueller KH. Bioceramic implants in surgically produced infrabony defects. *J Periodontol*. 1975 Jun;46(6):328-47.

Nomura T, Katz JL, Powers MP, Saito C. Evaluation of the micromechanical elastic properties of potential bone-grafting materials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005 Apr;73(1):29-34.

Ohshima S, Saeki Y, Mima T, Sasai M, Nishioka K, Nomura S, Kopf M, Katada Y, Tanaka T, Suemura M, Kishimoto T (1998) Interleukin 6 plays a key role in the development of antigen-induced arthritis. Proc Natl Acad Sci USA 95:8222_8226

Orsini G, Scarano A, Degidi M, Caputi S, Iezzi G, Piattelli A. Histological and ultrastructural evaluation of bone around Bio-Oss particles in sinus augmentation. Oral Dis. 2007 Nov;13(6):586-93.

Paknejad M, Emtiaz S, Rokn A, Islamy B, Safiri A. Histologic and histomorphometric evaluation of two bone substitute materials for bone regeneration: an experimental study in sheep. Implant Dent. 2008 Dec;17(4):471-9. doi: 10.1097/ID.0b013e3181815596.

Piattelli M, Favero GA, Scarano A, Orsini G, Piattelli A. Bone reactions to anorganic bovine bone (Bio-Oss) used in sinus augmentation procedures: a histologic long-term report of 20 cases in humans. Int J Oral Maxillofac Implants. 1999 Nov-Dec;14(6):835-40.

Polisetti N, Chaitanya VG, Babu PP, Vemuganti GK. Isolation, characterization and differentiation potential of rat bone marrow stromal cells. Neurol India. 2010 Mar Apr;58(2):201-8. doi: 10.4103/0028-3886.63789.

Puelo, DA; Nancy, A. Understanding and controlling the bone implant interface. Biomaterials, vol. 20, n. 23, p. 2311-21, 1999.

Rokn AR, Khodadoostan MA, Reza Rasouli Ghahroudi AA, Motahhary P, Kharrazi Fard MJ, Bruyn HD, Afzalifar R, Soolar E, Soolari A. Bone formation with two types of grafting materials: a histologic and histomorphometric study. *Open Dent J.* 2011;5:96-104. doi: 10.2174/1874210601105010096. Epub 2011 Jul 7.

Sabokbar A, Kudo O, Athanasou NA. Two distinct cellular mechanisms of osteoclast formation and bone resorption in periprosthetic osteolysis. *J Orthop Res.* 2003 Jan;21(1):73-80.

Scarpato RK; Dondoni L; Böttcher DE; Grecca FS; Figueiredo JA; Batista EL Jr. Apical periodontium response to enamel matrix derivative as an intracanal medication in rat immature teeth with pulp necrosis: radiographic and histologic findings. *J Endodontic*, v.38, n.4, p. 449-53, 2012 doi: 10.1016/j.joen.2011.12.041.

Schwarz EM, Campbell D, Totterman S, Boyd A, O'Keefe RJ, Looney RJ. Use of volumetric computerized tomography as a primary outcome measure to evaluate drug efficacy in the prevention of peri-prosthetic osteolysis: a 1-year clinical pilot of etanercept vs. placebo. *J Orthop Res.* 2003 Nov;21(6):1049-55.

Simion, M., Fontana, F., Rasperini, G. & Maiorana, C. Vertical ridge augmentation by expanded-polytetrafluoroethylene membrane and a

combination of intraoral autogenous bone graft and deproteinized anorganic bovine bone (Bio-Oss). *Clinical Oral Implants Research* 18: 620–629, 2007

Sontag W. Quantitative measurements of periosteal and cortical-endosteal bone formation and resorption in the midshaft of male rat femur. *Bone*, 7:63–70, 1986.

Stavropoulos A, Kostopoulos L, Nyengaard JR, Karring T. Fate of bone formed by guided tissue regeneration with or without grafting of Bio-Oss or Biogran. An experimental study in the rat. *J Clin Periodontol.*;31(1):30-9. 2004 Jan

Shiratori K, Matsuzaka K, Koike Y, Murakami S, Shimono M, Takashi I. Bone formation in β - tricalcium phosphate-filled bone defects of the rat femur: Morphometric analysis and expression of bone related protein mRNA. *Biomedical Research*, v.26, n.2, p.51-59, 2005.

Takagi K, Urist MR. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. *Ann. Surg.* v.196, n.100, 1982.

Turnbull RS, Freeman E. Use of wounds in the parietal bone of the rat for evaluating bone marrow for grafting into periodontal defects. *J Periodont. Res*, v.9, n.39, 1974.

Valentini, P.; Abensur, D. (2003) Maxillary sinus grafting with anorganic bovine bone: a clinical report of long-term results. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 18: 556–560.

Wang C, Lin K, Chang J, Sun J.: Osteogenesis and angiogenesis induced by porous β -CaSiO₃/PDLGA composite scaffold via activation of AMPK/ERK1/2 and PI3K/Akt pathways. *Biomaterials*, 34:64–77, 2013.

5. ANEXO



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 136/11 – CEUA

Porto Alegre, 20 de outubro de 2011.

Senhor Pesquisador:

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou, seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 11/00237 intitulado: **“Avaliação do processo de cicatrização óssea com diferentes biomateriais em fêmur de ratos”**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,


Profa. Dra. Anamaria Gonçalves Feijó
Coordenadora da CEUA/PUCRS

Ilmo. Sr.
Prof. Rogério Oliveira
Faculdade de Odontogia
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60, sala 314
CEP: 90610-000
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: ceua@pucrs.br