

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

ALAN MATHEUS RAMOS GARCIA

**RESPOSTA TECIDUAL PÓS-IMPLANTAÇÃO DE
MATERIAL PARTICULADO PARA ENXERTO ÓSSEO
XENÓGENO (LUMINA POROUS®) EM SUBCUTÂNEO
DE RATOS**

BAURU
2016

ALAN MATHEUS RAMOS GARCIA

**RESPOSTA TECIDUAL PÓS-IMPLANTAÇÃO DE
MATERIAL PARTICULADO PARA ENXERTO ÓSSEO
XENÓGENO (LUMINA POROUS®) EM SUBCUTÂNEO
DE RATO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração, como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Odontologia, sob orientação da Profa. Dra. Patrícia Pinto Saraiva.

BAURU
2016

Garcia, Alan Matheus Ramos

G2161r

Resposta tecidual pós Implantação de material particulado para enxerto ósseo xenógeno (Lumina Porous®) em subcutâneo de rato / Alan Matheus Ramos Garcia. -- 2015.

23f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Pinto Saraiva.

Coorientador: Prof. Dr. Jordan Lima da Silva.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.

1. Xenoenxerto. 2. Fibrose. 3. Tecido ósseo. 4. Diferenciação celular. I. Saraiva, Patrícia Pinto. II. Silva, Jordan Lima Da. III. Título.



ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Ata de Defesa do Trabalho de Conclusão de Curso em Odontologia de Alan Matheus Ramos Garcia.

Ao dia dezenove de outubro de dois mil e dezesseis, reuniu-se a banca examinadora do trabalho apresentado como Trabalho de Conclusão de Curso em Odontologia de ALAN MATHEUS RAMOS GARCIA intitulado: **“Resposta tecidual pós implantação de material particulado para enxerto ósseo xenógeno (Lumina Porous®) em subcutâneo de rato.”** Compuseram a banca examinadora os professores Dra. Patrícia Pinto Saraiva (orientadora), Dra. Camila Lopes Cardoso e Dra. Andréia Aparecida da Silva. Após a exposição oral, o candidato foi arguido pelos componentes da banca que se reuniram, e decidiram, aprovado, com a nota 10.0 a monografia. Para constar, fica redigida a presente Ata, que aprovada por todos os presentes, segue assinada pela Orientadora e pelos demais membros da banca.

Dra. Patrícia Pinto Saraiva (Orientadora)

Dra. Camila Lopes Cardoso (Avaliador 1)

Dra. Andréia Aparecida da Silva (Avaliador 2)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Incisão realizada no dorso do animal.....	09
Figura 2 – Divulsão tecidual abrindo espaço para colocação do material.....	09
Figura 3 – Partículas do material xenógeno que será posicionado no local.....	10
Figura 4 – Corte histológico da região corado com HE.....	11
Figura 5 – Coloração com hematoxilina de Harris, sendo submetida a análise de birrefringência	11
Figura 6 - Análise de birrefringência aos 7, 14 e 28 dias. Para relevância estatística, grupos diferentes entre si, dentro de cada tipo de fibra (G, Y, R e T), estão identificados com letras minúsculas iguais (P<0,05).....	15

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA	5
1.1 OBJETIVOS.....	7
2 METODOLOGIA	8
2.1 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS PARA A IMPLANTAÇÃO DO ENXERTO ÓSSEO	8
2.2 OBTENÇÃO DAS PEÇAS PARA ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA	10
3 RESULTADOS	12
3.1 Células inflamatórias	12
3.2 Análise de birrefringência.....	14
4 CONCLUSÃO.....	16
REFERÊNCIAS.....	19

1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA

Biomaterial é uma substância inerte, de origem natural ou sintética, utilizada para substituir, aumentar ou melhorar tecidos e órgãos. A formação óssea direcionada por um biomaterial envolve o estímulo para proliferação e diferenciação de células mesenquimais em células de padrão osteogênico. Células mesenquimais podem ser derivadas de tecido adiposo, e representam uma fonte acessível, disponível e abundante de células osteogênicas. O Lumina Porous®, é um material para xenoenxerto que será utilizado neste trabalho, com características que favorecem a absorção de proteínas endógenas e fatores de crescimento que atuam como indutores de diferenciação celular. O objetivo deste trabalho foi avaliar a biocompatibilidade, formação de tecido fibroso, e indução de diferenciação de células mesenquimais. Foram utilizados 32 ratos wistars machos, com idade de 4 meses. Foram formados dois grupos: controle e trabalho, sendo que cada grupo foi analisado nos períodos de 7, 14 e 28 dias (4 animais por grupo e período). No grupo de trabalho foi implantado o material para enxerto, enquanto o grupo controle somente passou pelos procedimentos cirúrgicos, sem receber o material. No procedimento cirúrgico, foi realizada uma incisão e divulsão do tecido conjuntivo subcutâneo até a formação de uma bolsa no seu interior, na qual foi implantado o enxerto do material. A eutanásia foi induzida por injeção de Tiopental em conjunto com lidocaína, nos períodos indicados. As peças obtidas foram processadas histologicamente, e os cortes foram corados pela hematoxilina e eosina (análise do processo inflamatório), e Picrossiriu-red, contra corados com Hematoxilina de Harris (birrefringência para verificar formação fibrose). Os resultados indicaram que o processo inflamatório ocorreu de forma mais intensa no grupo tratado aos 7 dias, em relação aos Morfonucleares ($p < 0,05$). Nos períodos de 14 e 28 dias a maior intensidade da inflamação ocorreu no grupo controle ($p < 0,05$). Os Polimorfonucleares estiveram em menor número no grupo tratado, em todas os períodos analisados ($p < 0,05$). A formação de fibras colágenas foi maior no grupo de trabalho aos 7 dias, mas tornou-se igual ao controle nos demais tempos de análise ($p > 0,05$). Não houve formação de tecido ósseo próximo a membrana implantada. Assim, o material utilizado mostrou-se biocompatível, mas suas propriedades devem

ser verificadas quando utilizado para regeneração óssea, pois há sinais de menor colageneização da área em que foi utilizado.

Palavras chave: Xenoenxerto. Fibrose. Tecido ósseo. Diferenciação celular

1.1 OBJETIVOS

Avaliar a biocompatibilidade, formação de tecido fibroso e indução de diferenciação de células mesenquimais, uma vez implantando em subcutâneo de ratos.

2 METODOLOGIA

Esta pesquisa foi avaliada e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais, da Universidade Sagrado Coração, sob nº 02/2014.

Foram utilizados 32 ratos *Wistar* machos, com idade de 4 meses, pesando entre 350 e 400g. Todos os animais receberam cuidados humanos, em um ambiente controlado com temperatura de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ e ciclo de claro-escuro de 12 horas. Os animais tiveram livre acesso à ração padrão (22% de proteína bruta, 1,4% de cálcio, 0,6% de fósforo e micronutrientes em concentrações adequadas) e água *ad libitum* e foram acondicionados em caixas plásticas (5 animais por caixa).

Os animais foram divididos em 2 grupos: controle e de trabalho, contendo 4 animais cada, para determinação do período de análise, nos seguintes tempos: 7, 14 e 28 dias.

Os animais do grupo de trabalho receberam implantes de matriz óssea xenóloga liofilizada (Lumina Porous®), subcutaneamente, na região dorsal superior direita. Os animais do grupo controle passaram pelas mesmas etapas cirúrgicas do grupo de trabalho, sem receber o material implantado.

2.1 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS PARA A IMPLANTAÇÃO DO ENXERTO ÓSSEO

Para os procedimentos cirúrgicos, os animais receberam medicação anestésica à base de cloridrato de xilazina (Anasedan - 10mg/Kg) e quetamina (Dopalen - 80 mg/kg), via intraperitoneal (IP). Após a anestesia, foi realizada a tricotomia na região dorsal superior direita e antisepsia com solução depolivinilpirrolidona (PVP-I) a 1 % (ou Dermoidine – Gessy Lever Industrial Ltda.). Em seguida, foi realizada uma incisão linear de aproximadamente 1cm de extensão com lâmina de bisturi nº 15C (Figura 1).



Fig. 1 - Incisão realizada no dorso do animal

A divulsão do tecido conjuntivo subcutâneo de ambos os lados da incisão foi feita com tesoura romba até a formação de uma bolsa no seu interior (Figura 2), na qual foi implantado o material.



Fig. 2 – Divulsão tecidual abrindo espaço para a colocação do material.

Nesta bolsa, as partículas de matriz óssea xenógena liofilizada (LuminaPorous) foi colocada cuidadosamente (Figura 3). Ato contínuo, os retalhos foram recolocados sem posição e suturados com fio de nylon nº 4-0 (Ethicon – Johnson & Johnson). Após a sutura, foi realizada a antissepsia sobre a área cirúrgica com gaze embebida em solução de álcool iodado.

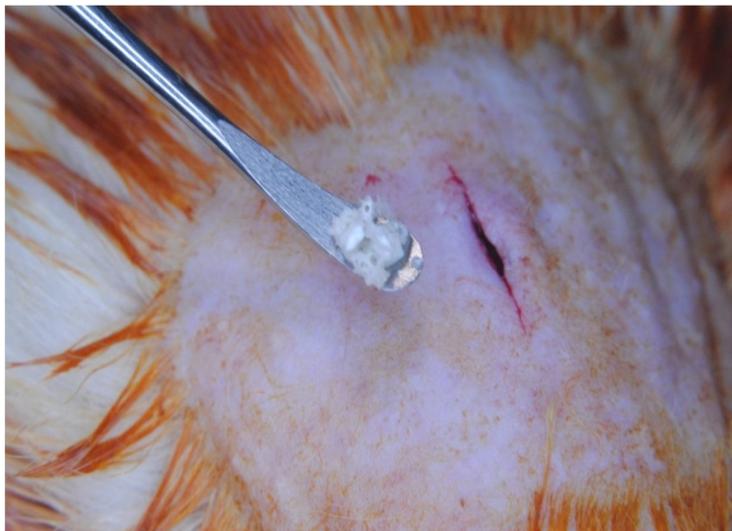


Fig. 3 – Partículas do material xenógeno que será posicionado no local.

2.2 OBTENÇÃO DAS PEÇAS PARA ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA

Decorridos 7,14 e 28 dias após o ato cirúrgico, os animais foram eutanasiados por meio de injeção de Tiopental, na dose de 150mg/kg, IP, em conjunto com lidocaína (10mg/mL). As peças contendo o implante foram removidas e fixadas em formol a 10% tamponado. Após processamento laboratorial de rotina, as peças foram incluídas em parafina para possibilitar a microtomia. Os cortes, semiseriados, com 5 μ m de espessura foram corados pela hematoxilina e eosina (HE) para análise histológica (Figura 4), em microscopia de luz, das peças obtidas. Para a análise de birrefringência, os cortes foram corados com Picrossírius-*red* e contra corados com Hematoxilina de Harris (Figura 5).

A resposta biológica tecidual foi determinada em função das alterações inflamatórias (infiltrado inflamatório) e dos processos reparatórios (grau de fibrosamento, proliferação angioblástica e fibroblástica).

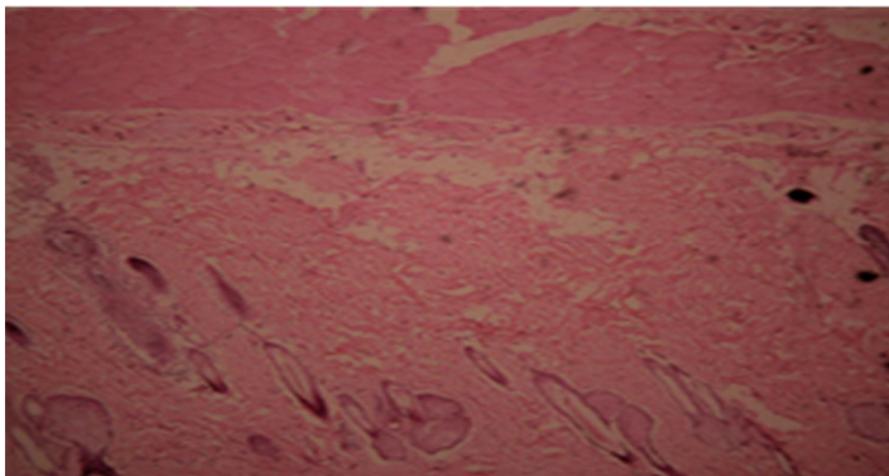


FIG. 4 – Corte histológico da região corado com HE.

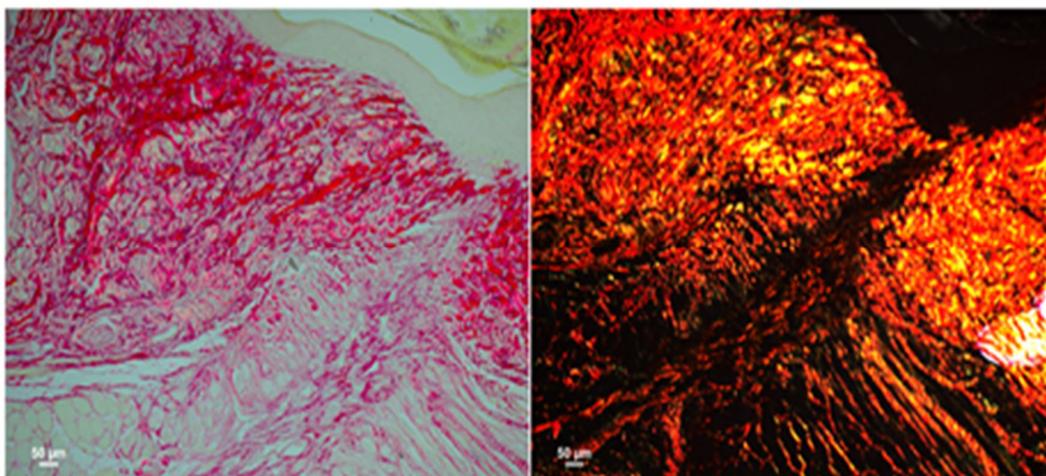


FIG. 5 – Coloração com hematoxilina de Harris, sendo submetida à análise de birrefringência. **(Pricossirius-Red)**

3 RESULTADOS

Todos os animais, tanto do grupo controle como do grupo de trabalho passaram pelos procedimentos cirúrgicos previstos e foram eutanasiados nos períodos de 7, 14 e 28 dias. Não foram realizadas análises para o período de 60 dias proposto inicialmente.

As peças anatômicas removidas foram encaminhadas ao laboratório de histotécnica, processados, e as lâminas histológicas foram obtidas e coradas.

3.1 CÉLULAS INFLAMATÓRIAS

Foi realizada a contagem das células inflamatórias mononucleares e polimorfonucleares nos respectivos tempos de análise. Os dados estão dispostos na Tabela 1.

Tab. 1 – Número de células mononucleares e polimorfonucleares, considerando-se os grupos e tempos de análise

Mononucleares	7 dias	14 dias	28 dias
Grupo controle	91±1,9	96,75±0,25	97,25±0,4
Grupo trabalho	100,5±0,28	47,5±4,5	66,25±0,85
	P=0,0018	P=0,002	P=0,0001
Polimorfonucleares			
Grupo controle	32,25±0,85	35,25±0,25	36,25±0,25
Grupo trabalho	22,75±1,2	22,5±2,0	19,5±0,64
	P=0,0001	P=0,009	P=0,0001

Foram realizadas análises estatísticas entre os diferentes tempos de tratamento dentro dos mesmos grupos, e entre os diferentes grupos, nos mesmos tempos de tratamento. O teste utilizado para estas análises foi o teste T não paramétrico, seguido pelo Teste de Welch.

Para as células mononucleares:

Foi observado um aumento no número de células, entre os 7 e 14 dias do grupo controle ($P=0,05$), O aumento no número destas células continuou, conforme observado entre o período de 14 e 28 dias ($P=0,6$). Apesar deste aumento ter ocorrido, não foi estatisticamente significativo ($P<0,05$).

No grupo de trabalho foi observada uma diminuição destas células entre os períodos de 7 e 14 dias ($P=0,0013$). Entre os períodos de 14 e 28 dias o número de células aumentou ($P=0,0023$). A variação ocorrida neste grupo foi estatisticamente significativa ($P<0,05$).

Quando comparados os tempos de tratamento entre os grupos, aos 7 dias, o número de células mononucleares foi maior no grupo de trabalho ($P<0,05$), enquanto nos períodos de 14 e 28 dias a quantidade de células no grupo de trabalho foi menor em relação ao controle ($P<0,05$).

Para as células polimorfonucleares:

No grupo controle as células PMN tiveram um aumento ao longo do período de observação, tanto entre os períodos de 7 e 14 dias ($P=0,03$) e entre 14 e 28 dias ($P=0,03$), ambos estatisticamente significantes ($P<0,05$). No grupo de trabalho, a variação no número de células entre 7 e 14 dias ($P=0,92$) e entre 14 e 28 dias ($P=0,64$) não foram significantes ($P<0,05$).

A comparação entre os grupos, em cada período, mostrou um menor número de PMN no grupo de trabalho, em todos os tempos analisados ($P<0,05$).

3.2 ANÁLISE DE BIRREFRINGÊNCIA

Os cortes histológicos do tecido conjuntivo dos períodos de 7, 14 e 28 dias, de todos os grupos, foram corado solução de Picosirius Red para que as imagens provenientes da região da membrana fossem capturadas posteriormente sob luz polarizada. Foram obtidas imagens de 4 campos de cada espécime, por meio de um microscópio invertido binocular Leica® (DM IRB/E) do Centro Integrado de Pesquisa da FOB/USP, considerando um aumento de 10x. As regiões contendo tecido conjuntivo não relacionado ao reparo ao redor da membrana, foram excluídas da região de interesse com o software Adobe Photoshop (versão CS6). A quantificação da intensidade do brilho de birrefringência foi posteriormente realizada utilizando o programa KS 300/400 com AxioVision (versão 4.8, CarlZeiss), sendo definidos os espectros para cor verde, amarela e vermelha, seguindo valores de RGB (Red, Green e Blue). As imagens foram então binarizadas para cada espectro de cor, e a quantidade em pixels² de cada cor correspondente à área total delimitada para região da membrana foi mensurada.

Os valores das médias obtidas para cada tipo de fibra, bem como do total referente à soma de fibras verdes, amarelas e vermelhas, foram submetidos a análise estatística. Para tanto, foi aplicado o teste Shapiro Wilk para analisar a distribuição dos dados, os quais apresentaram-se fora da distribuição de normalidade. Posteriormente, para analisar as diferenças entre os grupos para fibras verdes (G), amarelas (Y), vermelhas (R) e totais (T), foram aplicados o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis test seguido de Dunn's. Todos os testes estatísticos foram realizados com o programa GraphPad Prism 5.0 softwares (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Os grupos diferentes entre si, dentro de cada tipo de fibra (G, Y, R e T), estão identificados com letras minúsculas iguais ($P < 0,05$) (Figura 6).

Assim, as diferenças entre as fibras foram observadas somente no período de 7 dias, nas fibras verdes e amarelas (maiores no grupo trabalho) ($P < 0,05$), mostrando que neste período, no grupo de trabalho, houve uma maior produção de fibras colágenas. Esta maior quantidade tornou-se similar ao grupo controle nos

períodos seguintes. Nos demais períodos não foram observadas diferenças significativas.

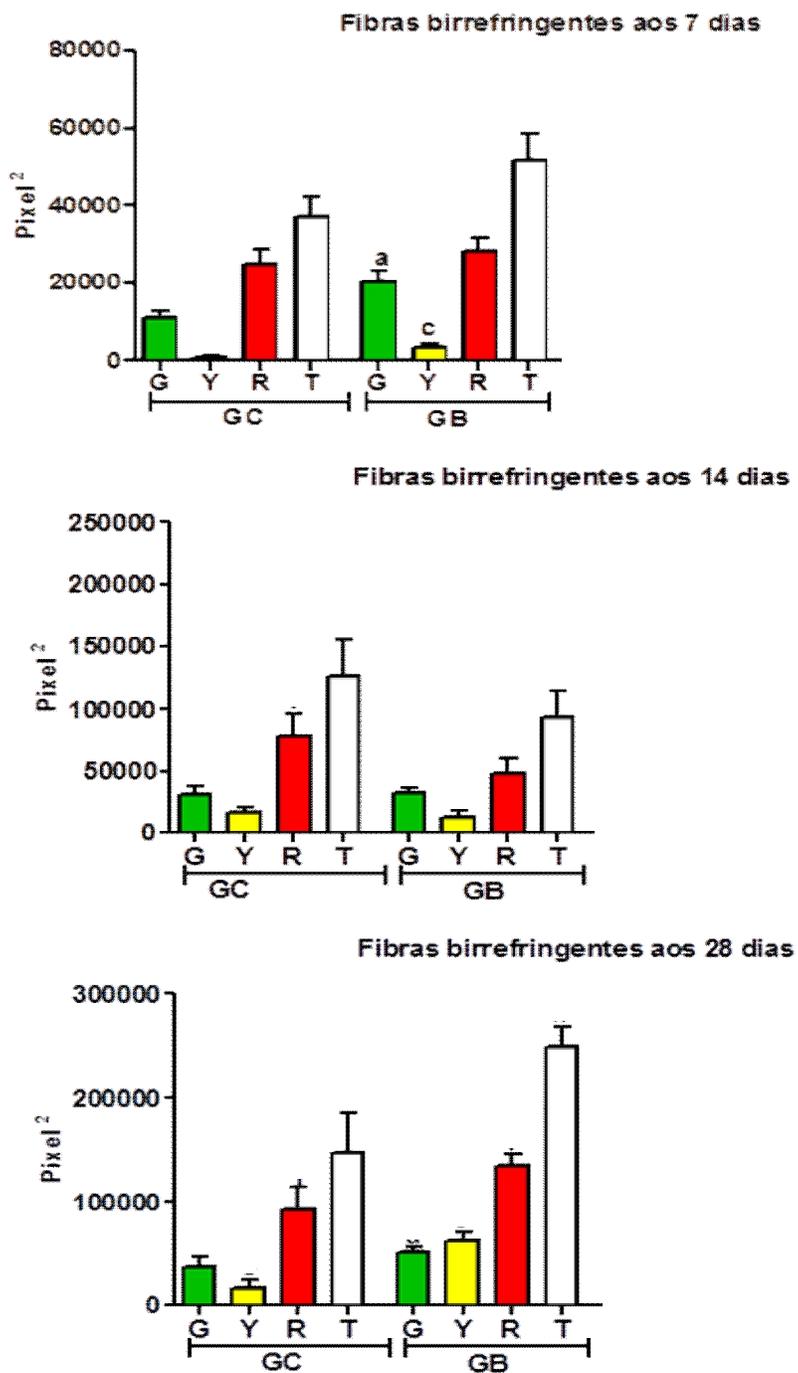


FIG.6 – Análise de birrefringência aos 7, 14 e 28 dias. Para relevância estatística, grupos diferentes entre si, dentro de cada tipo de fibra (G, Y, R e T), estão identificados com letras minúsculas iguais ($P < 0,05$).

4 CONCLUSÃO

O desenvolvimento de novos materiais para confecção de membranas, visando um melhor resultado na área utilizada tem sido alvo de diversos estudos. A proposta deste trabalho foi avaliar o Lumina Porous®, um material para xenoenxerto, lançado recentemente no mercado.

Os biomateriais oriundos de animais são denominados de xenoenxertos e têm sido amplamente estudados como alternativa ao enxerto autógeno. Quando adequadamente processados e livres de patógenos, apresentam-se biocompatíveis e osteocondutores, com a vantagem da grande disponibilidade, ocupando um papel de destaque no auxílio ao reparo ósseo (CASTRO-SILVA et al., 2009). Portanto, nosso objetivo foi verificar a biocompatibilidade, formação de tecido fibroso, e indução de diferenciação de células mesenquimais, com consequente formação óssea ectópica da membrana estudada.

Na avaliação da biocompatibilidade, notou-se que o material possui uma ótima resposta inflamatória. A quantidade de células inflamatórias MNs presentes na área do material foi maior que a do controle, aos 7 dias, e tornou-se menor que o controle aos 14 e 28 dias. Houve predominância, nos três períodos analisados de células MNs, em relação aos PMNs. O mesmo tipo de células foi encontrado por Gasque et al. (2008), em seu grupo controle, mostrando um infiltrado com predomínio de macrófagos.

A presença de um infiltrado inflamatório mais intenso no grupo controle que no grupo que utilizou o material já tinha sido observado anteriormente por Rezende Neto (2011) em sua tese de doutorado, trabalhando com uma membrana colágena. Embora os materiais utilizados tenham sido diferentes, nessa ocasião este autor atribui o acontecimento a proteção mecânica da ferida, e não à composição físico-química do material que utilizou em seu estudo. O fato é que em nosso estudo também foi observado a reação inflamatória mais intensa no controle, aos 14 e 28 dias, que no grupo que utilizou o material. Portanto, há necessidade de melhor avaliação da resposta inflamatória deste material.

A presença de uma reação inflamatória mais branda no grupo tratado com a membrana forneça melhores condições para que o processo cicatricial evolua.

Sabe-se que a inflamação é absolutamente necessária ao processo de reparo, embora, quando se manifeste em elevada intensidade ou se mantenha por tempo demasiado, este fenômeno seja o principal agente retardador da cicatrização (PEREIRA PINTO et al., 1997).

Ao longo do tempo também se percebe que as células MNs predominam, mas vão diminuindo seu número com o decorrer do tempo. Isso demonstra que o processo inflamatório é mais intenso nos períodos iniciais, mas vai entrando em remissão com o passar do tempo, característica de um processo inflamatório normal. Resultados semelhantes foram observados por Zhao et al., 2000, que também encontrou uma reação inflamatória inicial causada pelo trauma da implantação e resolvida em 10 dias.

Na análise de birrefringência pudemos notar que aos 7 dias há uma maior formação inicial de fibras colágenas em relação ao controle. Após este período inicial, a formação de todos os tipos de fibras torna-se semelhante ao grupo controle ($p > 0,05$). Ao mesmo tempo em que podemos inferir que a produção de colágeno semelhante ao controle contribuiria para não ocorrer fibrose, com prejuízo à formação óssea, a colagenização, por sua vez, representa um fator de suma importância durante o processo de cicatrização, uma vez que o colágeno é o principal componente dérmico responsável pelo restabelecimento da pele após injúria (DIELGEMAN & EVANS, 2004). Assim, outros estudos que avaliem o tempo de cicatrização são necessários, principalmente quando o material for utilizado diretamente em tecido ósseo, para verificar o processo de regeneração.

Além da avaliação da biocompatibilidade de biomateriais, o tecido subcutâneo também permite investigar a ocorrência de calcificação destes dispositivos, evento indesejável em alguns casos (CHANDY et al., 1996). O material testado neste estudo também mostrou ausência de calcificação, sendo uma característica favorável às suas propriedades.

Portanto, o Lumina Porous®, um material para xenoenxerto, possui características de biocompatibilidade, sem apresentar alterações relacionadas à sua

calcificação, mas que atua na deposição de colágeno de forma inibitória. Maiores esclarecimentos de seu comportamento biológico na regeneração do tecido ósseo são necessários.

REFERÊNCIAS

AL-SAFFAR, N.; REVELL, P.A. Differential expression of transforming growth factor-alpha and macrophage colony-stimulating factor/colony-stimulating factor-1R (c-fins) by multinucleated giant cells involved in pathological bone resorption at the site of orthopaedic implants. **J Orthop Res**, v.18, p.800-807, 2000.

BARRADAS, A.M.; YUAN, H.; VAN BLITTERSWIJK, C.A.; HABIBO-VIC, P. Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms. **Eur Cell Mater**, v.21, p.407-429, 2011.

BER, S.; TORUN, K.G.; HASIRCI, V. Bone tissue engineering on patterned collagen films: an in vitro study. **Biomaterials**, v.26, p.1977-1986, 2005.

BLOKHUIS, T.J.; ARTS, J.J. Bioactive and osteoinductive bone graft substitutes: definitions, facts and myths. **Injury**, v.42, p.S26–S29, 2011.

BURG, K.J.L.; PARTER, S.; KELLAN, J.F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v.21, p.2347-2359, 2000.

CASTRO-SILVA I.I; ZAMBUZZI, W. F.; GRANJEIRO, J. M. Panorama atual do uso de xenoenxertos na prática odontológica. **Innov Implant J, Biomater Esthet**, v. 4, p.70-75, 2009.

CHANDY, T.; MOHANTY, M.; JOHN, A.; RAO, S.B.; SIVAKUMAR, R.; SHARMA, C.P., et al. Structural studies on bovine bioprosthesis tissues and their in vivo calcification: prevention via drug delivery. **Biomaterials**, v.17, p.577-85, 1996.

CHEUNG, D.; BROWN, L.; SAMPATH, R. Localized inferior orbital fibrosis associated with porcine dermal collagen xenograft orbital floor implant. **Ophthal Plast Reconstr Surg**, v.20, p.257-259, 2004.

DEVELIOGLU, H.; SARAYDIN, S.; KARTAL, U.; TANER, L. Evaluation of the long-term results of rat cranial bone repair using a particular xenograft. **J Oral Implantol**, v.36, p.167-173, 2010.

DIEGELMANN, R.F.; EVANS, C.M. Wound healing an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Frontiers in Bioscience**. v.9, p.283-89, 2004.

FISCHER, C.R.; CASSILLY, R.; CANTOR, W.; EDUSEI, E.; HAMMOURI, Q.; ERRICO, T. A systematic review of comparative studies on bone graft alternatives for common spine fusion procedures. **Eur Spine J**, v.22, p.1423-1435, 2013.

GASQUE, K.C.S.; OLIVEIRA, R.C.; CEOLIN, D.; CESTARI, T.M.; TAGA, R.; TAGA, E.M., et al. Avaliação da biocompatibilidade de uma membrana de pericárdio bovino acelular e seu potencial como carreador de osteoblastos. **Cienc Odontol Bras**, v.11, p.58-66, 1996.

GRIFFITH, L.G.; NAUGHTON, G. Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. **Science**, v.8; p.1009-1014, 2002.

GUNDERSEN HJ, BAGGER P, BENDTSEN TF, EVANS SM, KORBO L, MARCUSSEN N, MØLLER A, NIELSEN K, NYENGAARD JR, PAKKENBERG B, The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. **APMIS.**, v. 96, n. 10, p. 857-81 1988.

HUBBELL, J.A. Bioactive biomaterials. **Curr Opin Biotechnol**, 1999 Apr;10(2):123-9, 1999.

KAGAMI, H.; AGATA, H.; TOJO, A. Bone marrow stromal cells (bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells) for bone tissue engineering: basic science to clinical translation. **Int J Biochem Cell Biol**, v.43, p.286–289, 2011.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**.12^a ed. Rio de Janeiro:Ed. Guanabara Koogan, 2013.

LEDFORD, C.K.; NUNLEY, J.A. 2ND; VIENS, N.A.; LARK, R.K. Bovine xenograft failures in pediatric foot reconstructive surgery. **J Pediatr Orthop**, v.33, p.458-463, 2013.

LYNCH, S.; GENCO, R.; MARX, R. Grafting materials in repair and restoration. Tissue engineering application in maxillofacial surgery and periodontics. **Quintecense Int**, v.5, p.93-112, 1999.

MISCH, C.E.; MISCH-DIETSH, F.; SILC, J.; BARBOZA, E.; CIANCIOLA, L.J.; KAZOR, C. Posterior implant single-tooth replacement and status of adjacent teeth during a 10-year period: a retrospective report. **J Periodontol**, v.79, p.2378-2382, 2008.

NEIVA, R.; PAGNI, G.; DUARTE, F.; PARK, C.H.; YI, E.; HOLMAN, L.A.; GIANNOBILE, W.V. Analysis of tissue neogenesis in extraction sockets treated with guided bone regeneration: clinical, histologic, and micro-CT results. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v.31, p.457-469, 2011.

PEREIRA-PINTO, L.; SOUZA, L. B.; FREITAS, R. A., GALVÃO, H. C.; CÂMARA, M. L.A. S.; QUEIROZ, L. M. G., COSTA, A. L. L. **Patologia Básica – Sinopse**. 1 ed. Editora da UFRN, Natal, 1997.

REZENDE NETO, J.M. Caracterização de membranas de colágeno modificado com extrato de frutos de Genipa americana L. e avaliação histomorfológica do efeito sobre o processo de reparo cicatricial por segunda intenção em ratos. Aracaju:UNIT, 2011. Tese de doutorado, Universidade Federal de Sergipe, curso de Biotecnologia. Sergipe, 2011.

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

SPANGBERG, L. Biological effects of root canal filling materials. 7. Reactions of bony tissue to implanted root canal filling material in guineapigs. **Odontol. Tidsk., Stockholm**, v.77, n. 2, p.133-159, 1969.

SPIEKERMANN, H. et al. Implantologia. In: Spiekermann H. **Classificação dos biomateriais para enxerto**. 1.ed. Porto Alegre: Ed Artmed. 2000. p.89-97.

TAPETY, F.I.; AMIZUKA, N.; UOSHIMA, K.; NOMURA, S.H.; MAEDA, T. A histological evaluation of the involvement of Bio-Oss in osteoblastic differentiation and matrix synthesis. **Clinic Oral Impl Res**, v.15, p.315-3, 2004.

WILLIAMS, D.F. Definition in biomaterials: proceedings of a consensus conference of the european society for biomaterials. In: Williams DF, **Progress in biomedical engineering**. 4.ed. New York: Ed Elsevier. 1987.p.67-72.

WISE, G.E. Cellular and molecular basis of tooth eruption. **Orthod Craniofac Res**, v.12, p.67-73, 2009.

WORTH, A.; MUCALO, M.; HORNE, G.; BRUCE, W; BURBIDGE, H. The evaluation of processed cancellous bovine bone as a bone graft substitute. **Clin Oral Implants Res**, v.16, p.379-386, 2005.

ZHAO S. et al. Histological evaluation of different biodegradable and non biodegradable membranes implanted subcutaneously in rats. **Journal of CranioMaxillofacial Surgery**, v.28, p.116-122, 2000.



PRÓ-REITORIA DE
PESQUISA E
PÓS-GRADUAÇÃO

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "UTILIZAÇÃO DO FISIOGRAFT COMO CARREADOR PARA BMP-2 NO PROCESSO DE REPARAÇÃO ÓSSEA EM CALVÁRIA DE RATOS. ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DO RANKL e OPG", protocolado sob o CEUA nº 8224140515, sob a responsabilidade de **Patricia Pinto Saraiva e equipe; Bárbara Maciel Braga; Patricia Pinto Saraiva; Maira Couto** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Sagrado Coração (CEUA/USC) em reunião de 16/06/2015.

We certify that the proposal "FISIOGRAFT AS CARRIER USE FOR BMP -2 IN THE PROCESS OF BONE REPAIR IN RATS CALVARY. ANALYSIS IMMUNOHISTOCHEMISTRY OF RANKL AND OPG", utilizing 45 Heterogenics rats (45 males), protocol number CEUA 8224140515, under the responsibility of **Patricia Pinto Saraiva and team; Bárbara Maciel Braga; Patricia Pinto Saraiva; Maira Couto** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Sagrado Coração University (CEUA/USC) in the meeting of 06/16/2015.

Vigência da Proposta: de 06/2015 a 05/2016

Área: Ciências Da Saúde/odontologia

Procedência: Biotério Externo

Espécie: Ratos heterogênicos

Gênero: Machos

Idade: 3 a 4 meses N: 45

Linhagem: Wistar

Peso: 250 a 300g

Nota: Defeitos ósseos extensos em região maxilo-facial podem ser corrigidos com enxerto autólogo, no entanto as desvantagens desta modalidade terapêutica levam à pesquisa por novos substitutos ósseos. Com isso, a aplicação dos conhecimentos da biologia molecular e o uso de fatores osteoindutores, como as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), ganham popularidade no campo da odontologia. As BMPs são produzidas por osteoblastos e apresentam uma possibilidade de regeneração tecidual. Entretanto, carreadores e arcabouços são essenciais para manter a capacidade osteoindutora das BMPs, pois tem grande importância na retenção e liberação destas. O metabolismo do tecido ósseo pode ser avaliado por meio da marcação de proteínas ativadas durante o processo de reparo, como o receptor ativador do ligante do fator nuclear kappa-B (RANKL) e a osteoprotegerina (OPG). Estas duas proteínas atuam competitivamente para a ativação dos osteoclastos, determinando, assim, o processo de remodelação óssea. Portanto, este estudo tem o objetivo de avaliar a ativação de proteínas relacionadas ao metabolismo ósseo (RANKL e OPG), quando utilizado o fisiograft (copolímero de ácido polilático poliglicólico) como carreador para BMP-2, no processo de reparação óssea em calvária de ratos. Para o presente estudo serão utilizados 45 ratos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar) adultos machos. Defeitos críticos de 5 mm de diâmetro serão preparados com broca trefina, com motor baixa rotação sob irrigação abundante, em cada animal. Os animais serão divididos em 3 grupos: no Grupo I - o defeito será preenchido por coágulo; Grupo II - defeito preenchido com copolímero de ácido polilático e poliglicólico (PLA/PGA); Grupo III - defeito preenchido com copolímero de ácido polilático e poliglicólico (PLA/PGA) e BMP-2. Os animais serão eutanasiados aos 5, 15 e 30 dias pós-operatório. A análise da ativação das proteínas envolvidas no processo de reparo ósseo será realizada por imunohistoquímica, por meio da marcação de RANKL e OPG.

Bauri, 31 de agosto de 2015

Prof. Dra. Dulce Helena Jardim Constantino
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Sagrado Coração