

ROGÉRIO LEONE BUCHAIM

BIOCOMPATIBILIDADE DE MATRIZES DE COLÁGENO ANIÔNICO E SUA INFLUÊNCIA NA ORIENTAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR.

TESE APRESENTADA À FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR NO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: MEDICINA E CIÊNCIAS CORRELATAS.

ORIENTADOR: PROF. DR. GILBERTO GÓISSIS

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

2004

SUMÁRIO

Dedicatória.....	ii
Agradecimentos.....	iii
Lista de Figuras.....	iv
Lista de Tabelas e Quadros.....	vii
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	viii
Resumo.....	x
Abstract.....	xii
Introdução.....	1
Material e Método.....	18
Resultados.....	29
Discussão.....	55
Conclusões.....	65
Referências Bibliográficas.....	67
Apêndice.....	77

Dedicatória

Aos meus pais, Ângelo e Olinda e a minha esposa Daniela.

OFEREÇO

Ao Professor Gilberto, um exemplo de homem e de pesquisador, pela acolhida e pelo privilégio de ser seu orientado.

Ao Professor e amigo Jesus, pelos sábios ensinamentos e gigantesca humildade.

DEDICO

Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho e, particularmente:

- 1- A Deus, pela força, coragem e proteção.**
- 2- Aos amigos Domingos e Sidney, fiéis companheiros de todas as jornadas.**
- 3- Aos professores e funcionários da Famerp, muito obrigado.**
- 4- Aos amigos da UNIMAR: Élio Shinohara, Marcos Giroto, Antônio (Tom), Luis Rojo, Flávia Trazzi, Ademir, Marcelo e tantos que me ajudaram, muito obrigado.**
- 5- Ao Prof. Valdir Gouvêa, que com sua calma e dedicação, incentiva e fortalece.**
- 6- Aos alunos e companheiros da pós-graduação, em especial a Rosana e Agdamar.**
- 7- Ao Prof. Azoubel, exemplo de incansável trabalhador e lutador pela pós-graduação.**
- 10- A diretoria da Famerp e ao professor Braile, meus sinceros agradecimentos.**
- 11- Aos pró-reitores da Unimar, Prof. Sosígenes e Prof^a. Beatriz, obrigado pelo auxílio em todos os momentos.**

Lista de figuras

Figura nº – Legenda.....	Página
1. Colágeno.....	11
2. Níveis de organização para o colágeno do tipo I encontrado nos tecidos vivos.....	14
3. Esquema das lâminas.....	28
4. Tendão bovino submetido ao S1 por 24 horas: Análise térmica (calorimetria exploratória diferencial).....	30
5. Calorimetria exploratória diferencial de pericárdio nativo (a) e pericardio tratado quimicamente por 12 horas. Análise térmica (calorimetria exploratória diferencial).....	31
6. Microscopia eletrônica de varredura de tendão bovino tratado quimicamente para remoção celular por um período de 24h.....	32
7. Microscopia eletrônica de varredura de tendão bovino tratado quimicamente para remoção celular por um período de 24h.....	32
8. Microscopia eletrônica de transmissão de pericárdio bovino nativo.(140.000x).....	33
9. Microscopia eletrônica de transmissão de pericárdio bovino tratado quimicamente para remoção celular por um período de 12 horas. (140.000x).....	33
10. Grupo 1- 7 dias. Área cirúrgica superficial: fibrose superficial (esquerda, inferior) junto a osso cortical residual (superior, esquerda) em continuidade com neoformação óssea medular (central, direita) (HE,40X).....	36
11. Grupo 1- 7 dias. Região medular junto à área cirúrgica superficial: fibrose superficial (esquerda), neoformação óssea (central) e área de fibrose e sangramento recente (direita) (Tricrômico de Masson, 40X).....	36
12. Grupo 1- 15 dias. Área cirúrgica superficial: fibrose superficial (esquerda), cortical residual (superior) e osso neoformado (direita) (HE, 100X).....	37
13. Grupo 1- 15 dias. Área cirúrgica superficial: fibrose (esquerda, inferior), cortical residual (superior, esquerda) e neoformação óssea (direita). (Tricrômico de Masson, 100X).....	37

- 14.** Grupo 1- 30 dias. Área da incisão cirúrgica: transição entre a neocortical (esquerda, inferior) e a cortical residual (superior, esquerda) (HE, 100X).....38
- 15.** Grupo 1- 30 dias. Neocortical (esquerda) mostrando depósitos de material do tipo sais de cálcio (Tricrômico de Masson, 100X).....38
- 16.** Grupo 2- 7 dias. ACS: transição entre CR (esquerda, superior), pericárdio superficial (esquerda, inferior) e neoformação óssea (direita) (HE, 40X).....41
- 17.** Grupo 2- 7 dias. RM: medula óssea hematopoiética (superior) e pericárdio (inferior) (TM, 100X).....41
- 18.** Grupo 2- 15 dias. ACS: neocortical (esquerda), fibrose (esquerda, central), pericárdio (central, direita) com celularidade moderada e células inflamatórias mononucleares do tipo linfócitos, dissociando as fibras pericárdicas (HE, 100X).....42
- 19.** Grupo 2-15 dias. RM: ossificação primária (superior) em continuidade com o pericárdio (central, inferior) (TM, 100X).....42
- 20.** Grupo 2- 30 dias. ACS: neocortical (esquerda, inferior) em continuidade com CR (esquerda, superior). Área central contendo pericárdio, com neoformação óssea em seu interior, sobre as fibras colágenas do mesmo (HE, 40X).....43
- 21.** Grupo 2- 30 dias. RM: fibrose intrapericárdica (central) e neoformação óssea no interior do implante (esquerda) (TM, 100X).....43
- 22.** Grupo 3- 7 dias. RM: tendão (superior) junto a osteoclastos (inferior) (HE, 100X).....46
- 23.** Grupo 3- 7 dias. RM: transição entre tendão (superior) e células do tipo osteoblasto (inferior) (TM, 400X).....46
- 24.** Grupo 3- 15 dias. RM: tendão (esquerda) e fibrose (central), dissociados por infiltrado inflamatório mononuclear (direita) (HE, 40X).....47

- 25.** Grupo 3- 15 dias. RM: transição entre células do tipo osteoblasto (superior) e tendão (inferior). Presença de vasos (esquerda, central) penetrando entre as fibras colágenas do tendão (TM, 400X).....47
- 26.** Grupo 3- 30 dias. RM: Neoformação óssea no interior do implante (HE, 40X).....48
- 27.** Grupo 3- 30 dias. RM: transição entre a medula óssea hematopoiética (superior, direita) e o tendão (inferior, central). Presença de vasos sanguíneos aparentemente penetrando no tendão por entre as suas fibras colágenas (TM, 100X).....48
- 28.** Grupo 4- 7 dias. ACS: neoformação óssea (esquerda) e tendão (direita) (HE, 100X).....52
- 29.** Grupo 4- 7 dias. RM: transição entre células do tipo osteoblasto (superior) e fibras colágenas do tendão (central, inferior) (TM, 400X)..52
- 30.** Grupo 4- 15 dias. RM: Tecido ósseo neoformado no interior do tendão implantado (central) (HE, 100X).....53
- 31.** Grupo 4- 15 dias. RM: transição entre tendão (esquerda) e medula óssea hematopoiética (direita). (TM, 100X).....53
- 32.** Grupo 4- 30 dias. RM: Neoformação óssea no interior do tendão (áreas mais acidófilas) (HE, 100X).....54
- 33.** Grupo 4- 30 dias. RM: Neoformação óssea sobre as fibras colágenas tendíneas (TM, 400X).....54

Lista de Tabelas e Quadros

Quadro nº – Legenda.....	Página
1. Número de resíduos de aminoácidos presentes na tripla hélice do colágeno do tipo I.....	13
2. Resultados microscópicos do grupo controle (G1).....	78
3. Resultados microscópicos do grupo G2 (Pericárdio 12hs).....	79
4. Resultados microscópicos do Grupo G3 (Tendão paralelo 24 hs).....	80
5. Resultados microscópicos do Grupo G4 (Tendão perpendicular 24 hs)...	81

Lista de Abreviaturas e Símbolos

$^{\circ}\text{C}/\text{min}$	graus Celsius/minuto
ACOH	ácido acético
ACS	área cirúrgica superficial
Asn	asparagina
Asp	ácido aspártico
BMP	proteínas morfogenéticas ósseas
Ca	cálcio
Cm	centrímetro
CR	cortical residual
C-terminal	carboxila terminal
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
FOB – USP	Faculdade de Odontologia de Bauru-Universidade de São Paulo
Fig.	figura
G1	grupo um
G2	grupo dois
G3	grupo três
G4	grupo quatro
GHz	gigahertz
Gln	glutamina
Glu	ácido glutâmico
Gly	glicina
HA	hidroxiapatita
HE	hematoxilina eosina
Hyl	hidroxilisina
Hyp	hidroxiprolina
K	Kelvin
keV	Kilo eletron volts
M	molar
MEV	microscopia eletrônica de varredura
mg	miligrama
mg/kg	miligrama por quilo
ml/Kg	mililitros por quilo
mol.L	mol por litro
mol/g	mol por grama
N_2	nitrogênio
Na	sódio
NCP	proteínas não-colagênicas
nm	nanômetro

N-terminal.....	amino grupo terminal
°C.....	graus Celsius
P(VDF/TrFE).....	poly(vinylidene fluoride):trifluorethylene
pH.....	potencial de hidrogênio
PLLA.....	poli-L-lactídeos
Pro.....	prolina
RGD.....	seqüência Arg-Gly-Asp
RM.....	região medular
S1.....	tratamento para remoção celular
TB.....	tendão bovino
TCP.....	fosfato tricálcio
Td.....	temperatura de desnaturação
TM.....	tricroômio de Masson
Trp.....	triptofano
α	alfa
Å.....	angstrom
α_1	alfa um
α_2	alfa dois

Resumo

Este estudo apresentou como objetivo, examinar a biocompatibilidade de matrizes de colágeno aniônico, sua resposta óssea local após implantação em defeitos ósseos criados cirurgicamente e a influência da orientação das fibras colágenas no tecido ósseo neoformado. Foram utilizados 72 ratos (*Rattus norvegicus albinus*) divididos em 4 grupos experimentais de 18 animais cada: Grupo 1 (Controle), sem implante; Grupo 2, implante medular de pericárdio 12 horas; Grupo 3, implante medular de tendão 24 horas, com o maior eixo de suas fibras colágenas direcionados paralelamente ao maior eixo da tíbia e, Grupo 4, implante medular de tendão 24 horas, com o maior eixo de suas fibras colágenas direcionados perpendicularmente ao maior eixo da tíbia. A evolução do processo de reparo, após a cirurgia experimental, foi avaliada microscopicamente com 7, 15 e 30 dias pós-operatórios. Os resultados demonstraram que as matrizes implantadas são biocompatíveis e funcionam como uma matriz tridimensional induzindo a formação de osso, maior no grupo 4. A celularidade, inicialmente, acompanha o arranjo das fibras colágenas, adquirindo um arranjo multidirecional crescente, sugerindo que a direção

e a orientação estão relacionadas com a direção e a magnitude do stress aplicado sobre o osso.

Palavras-chaves: Rato; Osso; Tíbia; Pericárdio; Tendão.

Abstract

The present study was aimed at examining the biocompatibility of anionic collagen matrices, their local bone response following implantation in surgically-created bone defects and also the influence of the collagen fiber orientation in the neoformed bone tissue. Seventy two rats (*Rattus norvegicus albinus*) were used in this experiment. The animals were divided into four experimental groups: Group 1 (control), without implants; Group 2, pericardium medullar implants, 12 hours; Group 3, medullar implants of tendon, 24 hours, with the bigger axes of collagen fibers parallel to the bigger axes of the tibia; and Group 4, medullar implants of tendon, 24 hours, with the bigger axes of collagen fibers perpendicular to the bigger axes of the tibia. After the experimental surgery, the evolution of the repair process was microscopically evaluated in 7, 15 and 30 days post-surgery. The results demonstrated the implanted matrices to be biocompatible and to function as a scaffold inducing the formation of bone, mainly in Group 4. At first, the cellularity follows the arrangement of collagen fibers, obtaining a growing multidirectional arrangement, suggesting that the direction and the orientation are related to the direction and to the magnitude of the stress applied to the bone.

Keywords: Rat; Bone; Tibia; Pericardium; Tendon.

1- INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

A destruição do tecido ósseo devido a doenças e ineficiente reparo ósseo após injúrias traumáticas podem ser tratadas através de técnicas de engenharia de tecidos⁽¹⁾. Fatores de crescimento, proteínas extracelulares, e terapia genética foram desenvolvidos, os quais, em conjunto com carreadores adequados, podem regenerar defeitos ósseos ou ajudar em casos de reparação deficiente⁽¹⁾. O desenvolvimento da engenharia de tecidos na reconstrução de tecido ósseo impôs a necessidade do desenvolvimento de materiais com propriedades especiais para atender propriedades específicas do crescimento tecidual, principalmente a biocompatibilidade.

Os métodos biológicos tradicionais da reparação de defeito ósseo incluem osso de estrutura porosa de auto-enxerto e alo-enxerto, aplicando enxertos de crista ilíaca e outras técnicas de transporte ósseo. Embora esses sejam tratamentos padrões, falhas são encontradas com sua utilização. Uma vez que enxertos ósseos são avasculares e dependentes de difusão, o tamanho do defeito e a viabilidade do hospedeiro podem limitar suas aplicações. Em grandes defeitos os enxertos podem ser reabsorvidos pelo corpo antes que a osteogênese seja completa^(2,3). No auto-enxerto há

dificuldades no tempo operacional, região doadora escassa, morbidez do doador associado à infecção, dor e hematoma^(4,5).

A regeneração óssea requer quatro componentes: um sinal morfogenético, células hospedeiras suscetíveis que irão responder ao sinal, um transportador desse sinal que pode entregá-lo a locais específicos que servem como uma matriz tridimensional para o crescimento das células hospedeiras suscetíveis e um hospedeiro viável e bem vascularizado^(6,7).

A engenharia de tecido ósseo é o uso de uma matriz tridimensional para induzir a formação de osso a partir do tecido adjacente ou para agir como um carregador ou modelo para células ósseas implantadas ou outros agentes⁽⁸⁾.

Engenharia de tecidos

A perda ou a falência de um órgão ou tecido é um dos problemas de saúde mais severos para o homem ⁽⁹⁾. O tratamento de pacientes com estes problemas consome aproximadamente metade do total de gastos com a saúde nos EUA ⁽¹⁰⁾. Os transplantes de tecidos ou órgãos, a terapia-padrão para tratamento desses pacientes, é limitada severamente pela quantidade de doadores. Outras terapias disponíveis para o tratamento desses pacientes incluem reconstrução cirúrgica (por exemplo, coração), terapias com drogas (insulina para mau funcionamento pancreático),

próteses sintéticas (prótese vasculares) e os dispositivos biomédicos (dialisadores renais). Apesar dessas terapias não terem limites de suprimento, elas não repõem todas as funções de um tecido ou órgão perdido e ocasionalmente fracassam após um longo tempo de uso ⁽¹⁰⁾.

A engenharia de tecido surgiu como uma tecnologia promissora para tratar da perda ou má funcionamento de um tecido ou órgão ⁽¹¹⁾, sem as limitações das terapias atuais. Esta tecnologia é fundamentada na observação de que células isoladas se reagruparão in vitro em estruturas que se assemelham ao tecido original, quando colocadas em “meio apropriado”, como por exemplo, o caso das células endoteliais isoladas que são capazes de se organizar in vitro em estruturas tubulares tal como nos vasos sanguíneos ⁽¹²⁾. Este “meio apropriado” corresponde a matrizes extracelulares sintéticas, que têm como característica fundamental uma estrutura tridimensional biodegradável que serve como suporte, in vitro ou in vivo, para que, a partir de células isoladas ou por estímulos intrínsecos à matriz, desenvolvam-se em um novo tecido para restauração das funções biológicas naturais ^(13,14).

Essa nova tecnologia tem como virtude, minimizar as limitações das terapias convencionais, que incluem um suprimento limitado de doadores de tecidos e as limitações inerentes às próteses sintéticas e

outros tipos de implantes. Está baseada na evolução das Ciências dos Materiais, mas principalmente no maior conhecimento das interações biomateriais-tecido. Biomateriais modernos não devem apenas preencher espaço. Devem estar associados a uma resposta biológica específica, disparada por sinais que incluem: correntes elétricas, distribuição eletrônica, conformação molecular, estado de agregação ou propriedades físico-químicas locais particulares, características estas que podem ser introduzidas por arranjos especiais de grupos funcionais sobre uma estrutura polimérica, reações de reticulação, propriedades particulares de superfícies e arranjos macromoleculares^(15,16,17). Como exemplo, podem-se citar os suportes para a regeneração de tecido nervosos periféricos, que são caracterizados pelas propriedades elétricas superficiais, para a orientação do crescimento da fibra nervosa e, portanto, sua regeneração⁽¹⁸⁾.

Quanto à sua natureza química as matrizes extracelulares artificiais podem ser de natureza sintética ou natural e, independentemente da sua origem, devem ter as seguintes características:

- a- biocompatibilidade e a capacidade de sustentar o crescimento celular;
- b- propriedades mecânicas condizentes em relação ao tecido a ser reconstruído;

c - velocidade de degradação compatível com aquela de crescimento do tecido para o qual serve como suporte.

d - permitir a associação destas matrizes tridimensionais com fatores de crescimento celular específicos para indução de respostas celulares mais rápidas e mais específicas.

Embora vários polímeros tenham sido empregados, poliésteres do tipo ácido poliglicólico e polilático, individualmente ou na forma de copolímeros tem sido os mais utilizados, como exemplo na aplicação como suporte para crescimento de hepatócitos destinados à substituição da função hepática⁽¹⁹⁾.

Outro grande segmento corresponde à utilização de polímeros naturais presentes na matriz extracelular. As matrizes extracelulares são estruturas complexas formadas por proteoglicanas, colágeno e elastina, que por interação com receptores específicos na superfície celular também participam dos processos que regulam a expressão fenotípica da célula e, portanto, a manutenção não apenas da morfologia e função do tecido, mas também da sua remodelagem⁽²⁰⁾, onde o caso mais marcante é o tecido ósseo. Dentro deste conceito uma aproximação é a utilização de matrizes extracelulares formadas por colágeno e elastina, obtidas de matrizes homólogas ou heterólogas, dos

quais células e outros componentes responsáveis por respostas biológicas não desejáveis tenham sido convenientemente removidos ^(21,22).

Nesta direção a reprodução da estrutura da musculatura lisa funcional de parte de vesícula biliar foi alcançada com sucesso pela utilização de um suporte desvitalizado de vesícula formado essencialmente por colágeno e elastina ⁽²³⁾. Outros exemplos do uso de matrizes acelulares incluem o uso da derme para correções plásticas. Estes suportes, pós-implante, foram caracterizados por uma alta taxa de revascularização associada a uma repopulação celular isentas de resposta imunológica. Suas aplicações potenciais são em queimados, nas cirurgias bucomaxilofacial e cirurgias plásticas reconstrutivas com a finalidade de recompor perda extensiva de tecido mole ⁽²⁴⁾.

Matrizes utilizadas em engenharia do tecido ósseo

Na pesquisa de materiais com engenharia de tecido ósseo, destacam-se os sistemas acelulares, BMP e celulares.

No sistema acelar tem-se: Polímeros naturais, com destaque para a matriz óssea desmineralizada, que no início dos anos 60 Urist e colaboradores notaram a indução da matriz em formar osso em tecidos ectópicos ^(25,26,27); Polímeros sintéticos, como as membranas de poli-L-lactídeos (PLLA) ⁽²⁸⁾; Polímeros compostos, com associação de um

cimento ósseo biodegradável poli às cerâmicas de fosfato de cálcio (Hidroxiapatita-HA ou fosfato tricálcio-TCP)^(29,30,31,32,33) ; Cerâmicas, baseada nas cerâmicas de fosfato de cálcio, com forte apelo na sua biocompatibilidade uma vez que são livres de proteínas e com mínimas reações imunológicas e a corpo estranho, mas que não tem capacidade osteoindutiva, somente osteocondutiva e osteointegrável^(34,35,36,37).

No sistema BMP tem-se as proteínas morfogenéticas ósseas, um grupo de proteínas responsáveis por uma variedade de eventos osteoindutores em embriogênese e no esqueleto após o nascimento^(6,38,39,40,41).

No sistema celular tem-se: Polímeros naturais, onde os materiais de colágeno são aplicados como sistemas de armação celular^(8,42,43,44) ; Polímeros sintéticos, como a malha fibrosa não trançada de poliglicóide^(45,46,47) ; Cerâmicas, de fosfato de cálcio com alta porosidade que permitem boa distribuição celular⁽⁴⁸⁾.

O colágeno como biomaterial

O colágeno é a principal proteína estrutural dos mamíferos e constitui cerca de 90% da parte orgânica do tecido ósseo⁽⁴⁹⁾, sendo atualmente uma grande fonte de desenvolvimento dos biomateriais. O enorme uso do colágeno no campo dos biomateriais está associado às

propriedades naturais que incluem baixa resposta imune, mesmo de origem heteróloga, baixa toxicidade, habilidade em promover crescimento celular e adesão, homeostasia e a habilidade da solução de colágeno em reconstituir “in vitro” no interior da estrutura microfibrilar encontrada nos tecidos naturais⁽⁵⁰⁾. Ele é utilizado numa variedade de formas físicas como em lâminas, esponjas, pó como agente hemostático, para aumento de tecidos moles, queimaduras e ferimentos, suporte para crescimento de nervos periféricos e tratamento de doenças periodontais baseada em regeneração tecidual guiada.

O colágeno é amplamente utilizado como matéria-prima para a fabricação de biomateriais. Na maioria dos casos, modificações químicas são realizadas através de tratamentos de tecidos nativos ou materiais reconstituídos de gel de colágeno com reagentes de ligação cruzada para melhorar a biocompatibilidade e propriedades mecânicas.

Outras mudanças químicas resultam em materiais que são matrizes carregadas de colágeno usadas como suporte para o crescimento celular, como a caracterização de matrizes acelulares de colágeno, preparadas a partir de pericárdio, submucosa intestinal e tendão, todos de origem bovina, com variáveis níveis de deaminação através de hidrólises seletivas da cadeia carboxiamida de asparagina (Asn) e Glutamina (Gln)

residuais presentes no colágeno tipo I cadeia- α , dando condições para o desenvolvimento de materiais de colágeno polianiónicos, com várias propriedades físico-químicas e arranjos macromoleculares com respeito a formação de fibrilas^(51,52,53).

O colágeno aniônico obtido do tratamento alcalino possui propriedades piezoelétricas, poros heterogêneos e a completa remoção de células intersticiais, gerando uma matriz biocompatível cujos resultados histológicos apresentam uma baixa resposta inflamatória e formação óssea dentro de um curto período de tempo. O baixo custo de produção, associado a biocompatibilidade e osteocondutibilidade, fazem da matriz de colágeno aniônica uma alternativa promissora para o tratamento de defeitos ósseos⁽⁴²⁾.

Entretanto, dentre os materiais utilizados na confecção das matrizes, existem diferenças quanto ao posicionamento das fibras de colágeno. Após o tratamento de hidrólise, a matriz piezoelétrica, rica em colágeno e elastina, apresentam disposição fibrilar diferente. No pericárdio as fibras caracterizam-se por um desarranjo, com entrelaçamento do colágeno, enquanto que no tendão, pela própria característica natural, as fibras colágenas são paralelas.

Química e a estrutura do colágeno

Química

Na definição moderna colágeno é toda proteína formada por três cadeias polipeptídicas caracterizadas pela repetição de um triplete Gly-X-Y onde X é geralmente uma prolina e Y é uma hidroxiprolina (Figura 1) e que organizam após sua biosíntese no espaço extracelular em estruturas fibrilares supramoleculares (Figura 2).

Nas cadeias alfa, a distância entre dois resíduos consecutivos de Gly é 8,7 Å e no eixo maior da tripla hélice cada resíduo de aminoácido contribui na descendência em cerca de 2,8 Å. As posições X e Y, além da Pro ou Hyp respectivamente, podem ser ocupadas por outros aminoácidos naturais. E para os aminoácidos mais significativos do ponto de vista quantitativo, para o colágeno do tipo I, o mais abundante, a Gly está presente em cerca de 33%, Pro, 12% e Hyp 11%.

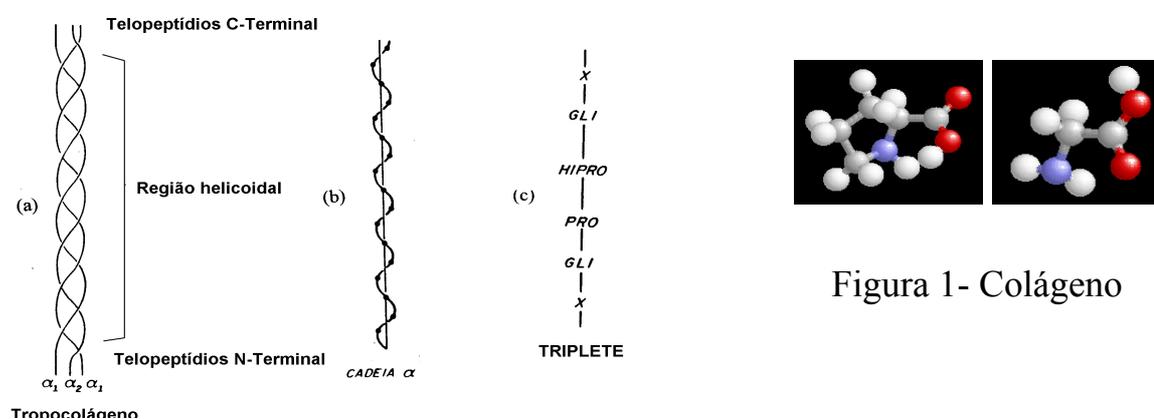


Figura 1- Colágeno

Uma avaliação em relação às propriedades gerais de aminoácidos o colágeno do tipo I apresenta:

a - 0,7% de hidroxilisina (Hyl);

b – não possui triptofano (Trp) e os resíduos de tirosina encontram-se exclusivamente nas regiões não helicoidais (nas extremidades da estrutura helicoidal);

c – os aminoácidos polares constituem quase 40% da molécula, dos quais 11% são básicos e 9% ácidos, os outros 17% correspondem a aminoácidos hidroxilados (Quadro 1);

d - Cerca de 4% dos resíduos correspondem a amidas de ácido aspártico (Asp) e glutâmico (Glu) (Quadro 1).

Quadro 1: Número de resíduos de aminoácidos presentes na tripla hélice do colágeno do tipo I.

<i>Aminoácido.</i>	<i>Cadeia</i>		<i>Aminoácido</i>	<i>Cadeia</i>	
	α_1	α_2		α_1	α_2
<u>Estruturais</u>			<u>Hidrofóbicos</u>		
<i>Glicina</i>	345	346	<i>Leucina</i>	9	18
<i>Hidroxiprolina</i>	114	99	<i>Isoleucina</i>	22	33
<i>Prolina</i>	127	108	<i>Metionina</i>	7	4
<u>Básicos</u>			<i>Fenilalanina</i>	13	15
<i>Lisina</i>	34	21	<i>Tirosina</i>	5	4
<i>Arginina</i>	53	56	<i>Valina</i>	17	34
<i>Histidina</i>	3	8			
<i>Hidroxilisina</i>	4	9	<u>Outros</u>		
<u>Ácidos/Amidas</u>			<i>Alanina</i>	124	111
<i>Ácido aspártico</i>	33	24	<i>Treonina</i>	17	20
<i>Asparagina</i>	13	23	<i>Serina</i>	37	35
<i>Ácido glutâmico</i>	52	46			
<i>Glutamina</i>	27	24			

A organização supramolecular do colágeno

Cada cadeia alfa apresenta uma massa molecular de cerca de 100.000 mol/g, e para o caso do colágeno do tipo I, a cadeia α_1 contem 1056 resíduos de aminoácidos e a α_2 1038 resíduos, dando origem a uma tripla hélice com cerca de 300 nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro. O passo desta estrutura é de 29-30 Å (Figura 2). Além da região helicoidal, tem nas extremidades seqüências que não fazem parte desta estrutura, denominadas de telopeptídeos N-terminal com 16 resíduos de aminoácidos e C-terminal com 26 resíduos de aminoácidos.

Como já mencionado, em pH fisiológico formam estruturas supramoleculares na forma de fibras insolúveis (Figura 2) por um processo chamado fibrilogênese, responsável pelo crescimento longitudinal e transversal da estrutura fibrilar.

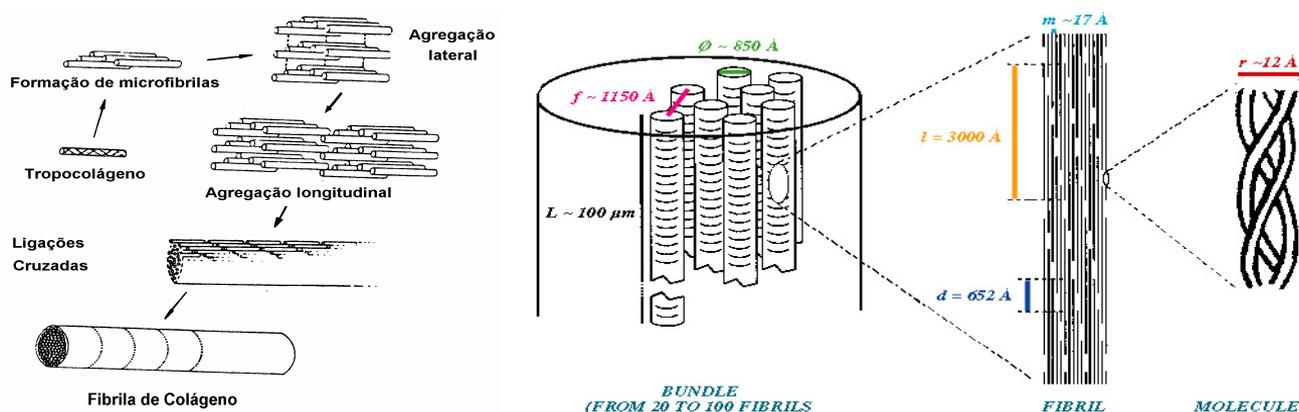


Figura 2. Níveis de organização para o colágeno do tipo I encontrado nos tecidos vivos.

O tratamento alcalino proporciona uma matriz tridimensional com as características:

a – aumento das propriedades dielétricas para materiais de colágeno polianiónico obtidos por hidrólise parcial seletiva de grupos carboxamidas de resíduos de asparagina e glutamina presentes na matriz colagênica, particularmente na forma de compósitos com poly(vinylidene fluoride):trifluorethylene cujos coeficientes piroelétricos são superiores àqueles descritos para colágeno nativo e P(VDF/TrFE) e de respectivamente $0.37 \times 10^{-4} \text{Cm}^{-2}\text{K}^{-1}$ e $17 \times 10^{-6} \text{Cm}^{-2}\text{K}^{-1}$.

b – o comportamento in vivo destes materiais que além de altamente biocompatíveis, quando na forma de membrana no tecido muscular induzem á metaplasia ósseo, isto é formação de tecido ósseo sobre o tecido muscular em resposta á alterações da expressão do genótipo celular ou então a partir de células totipotentes (células mesenquimais);

c - quando implantados no tecido ósseo são incorporados pelo tecido sem serem reabsorvidos e são utilizados pelos fibroblastos para deposição de sais de fosfato de cálcio;

d – a mineralização observada “in vitro” de acordo com a estrutura da microfibrila, e que do ponto de vista morfológico se assemelha ao processo de mineralização observado “in vivo”.

Orientação das fibras colágenas

A determinação da orientação das fibras colágenas em tecidos humanos, como os ossos, é indispensável quando se estuda a relação entre propriedades físicas e as estruturas. Do ponto de vista de biomecânica ortopédica, tal determinação pode ser vantajosa quando se quer estimar a ação do estresse mecânico sobre os ossos humanos, compostos de fibras colágenas e cristais de hidroxiapatita. Entretanto, diversos métodos utilizados para esse estudo apresentam imperfeições, com dificuldades em isolar as propriedades físicas das fibras colágenas.

Estudos recentes, como Osaki et al.⁽⁵⁴⁾, utilizaram a transmissão de microondas de 12 GHz em cortes sucessivos do osso calcâneo humano, em direções perpendicular e paralela ao longo eixo do membro inferior humano, enquanto Bromage et al.⁽⁵⁵⁾ utilizou luz polarizada circular, realizando cortes semi-seriados para avaliação histológica, de amostras de ossos de mamíferos humanos e não-humanos, para estudo da orientação das fibras colágenas.

OBJETIVO

Sendo assim, este estudo foi realizado com o objetivo de examinar:

- 1- A biocompatibilidade de matrizes de colágeno aniônico.
- 2- Sua resposta óssea local após implantação em defeitos ósseos criados cirurgicamente.
- 3- Sua influência na orientação das fibras colágenas do tecido ósseo neoformado.

2 - MATERIAL E MÉTODO

2 - MATERIAL E MÉTODO

2.1 – Preparação das matrizes

2.1.1 - Pericárdio e tendão bovino frescos foram selecionados e usados neste estudo. O tempo de hidrólise usado foi de 12 horas para o pericárdio e 24 horas para o tendão.

O tendão bovino (TB) foi adquirido em estabelecimentos comerciais convencionais e corresponde ao tendão calcâneo comum. O material foi limpo, lavado com salina exaustivamente para remoção do sangue residual e, em seguida, armazenado na temperatura de -20°C até seu uso. Imediatamente antes do uso o tendão foi seccionado em fragmentos de 2,5 a 3,0 cm de comprimento e 1,0 cm de diâmetro, resfriado a -180°C e liofilizado. Este material foi expandido em solução de ácido acético (ACOH) 0,5M por 5 dias com troca da solução a cada 24hs. Após esse período o tendão foi novamente liofilizado e submetido ao tratamento alcalino como descrito a seguir. ($\text{pH}=7,4$ $0,14 \text{ mol.L}^{-1}$).

No pericárdio removeu-se a gordura e outros materiais biológicos e, em seguida foi colocado inteiro (com mais ou menos 15 centímetros de diâmetro) no bastidor, estando pronto para o tratamento químico.

2.1.2 - Processos de desvitalização: As amostras foram tratadas a 20°C por 12 horas no caso do pericárdio e 24h no tendão, com uma solução alcalina contendo sulfatos e cloretos de K^+ , Ca^+ e Na^+ . Após a estabilização dos materiais com uma solução neutra, também contendo cloretos e sulfatos dos cátions acima citados, por um período de 6 horas, o excesso de sais residuais ainda presentes foram removidos por lavagens sucessivas com ácido bórico a 3% (3x,6h), EDTA 0,3% a pH 11 (3x,6h) e água destilada (6x,2h), seguido da estabilização do material em tampão fosfato 0,14 mol.L⁻¹, pH 7,4. Após esse procedimento as peças foram lavadas 3x15 minutos com água destilada, equilibradas em tampão fosfato pH 7,4, 0,14 mol.L⁻¹, novamente lavado com água e após congelamento em nitrogênio líquido, foi submetido à liofilização em um equipamento da EDWARDS modelo FREEZER DRYER Modulyo, até peso constante e mantido na geladeira na forma seca⁽⁴²⁾.

2.1.3 - Caracterização do material

2.1.3.1 - Estabilidade térmica: Medidas de estabilidade térmica foram determinadas com os materiais preparados acima exceto que, antes das determinações foram embebidos em tampão fosfato com auxílio de vácuo intermitente. O parâmetro determinado foi Td (temperatura de desnaturação) por calorimetria exploratória diferencial.

Estes valores foram determinados em amostras preparadas como descritas acima, com massas de aproximadamente 10 mg, em um equipamento Du Pont DSC-910, calibrado com padrão de índio. A taxa de aquecimento foi de 5^oC/min, no intervalo de temperatura entre 20 a 120 ° C, sob atmosfera de N₂. Neste caso foi realizada apenas uma determinação.

2.1.3.2 - Técnica de microscopia:

a- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV): As fotomicrografias foram obtidas de amostras de tendão bovino tratadas por 24 horas, liofilizadas e coladas a suportes de alumínio apropriados, com condutividade elétrica assegurada pela aplicação nas suas bordas inferiores de uma camada de prata condutora. Em seguida, todas as amostras foram previamente recobertas com uma camada de ouro de 5nm e as micrografias obtidas em um equipamento da ZEISS DSM 960, operando com feixe de elétrons entre 10 e 20 keV.

b- Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET): As fotomicrografias foram obtidas de amostras de pericárdio bovino nativo e tratadas por 12 horas em um aparelho Zeiss PQ 2300 TEM, depois de coradas negativamente com acetato de urânio e citrato de chumbo.

2.2 – Biocompatibilidade das matrizes e resposta do tecido ósseo

O estudo da biocompatibilidade e da resposta do tecido ósseo foi realizada em defeitos criados cirurgicamente em tibia de ratos. Foram utilizados 72 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*), adultos, da linhagem Wistar, pesando entre 220 e 260 g, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – Campus de Bauru (FOB – USP).

Para a cirurgia experimental os ratos foram submetidos à anestesia geral pela injeção intramuscular de Ketamina 50 (75 mg/kg) + Rompun (1,5 ml/Kg).

Os animais foram tricotomizados na região ventral do membro posterior e se realizou desinfecção do campo operatório com solução de iodo tópica a 10% .

A seguir, com uma lâmina de bisturi nº 15, foi realizada uma incisão linear de 20 mm. de extensão, no sentido longitudinal do membro posterior, na pele e fáscia muscular do animal, para exposição e divulsão do tecido muscular que envolve a tibia esquerda.

Estendeu-se a incisão até o periósteo, permitindo seu deslocamento, afastando-o no sentido ântero-posterior, obtendo-se assim uma ampla área de trabalho.

Com broca esférica de aço nº 8, montada em micromotor de baixa rotação, foi preparada uma cavidade de aproximadamente 2,2 mm. de diâmetro e, em profundidade, atingindo a medula óssea. A cavidade foi realizada na porção proximal da tíbia com abundante irrigação de solução estéril de Cloreto de Sódio a 0,9%.

Os ratos foram divididos em 4 grupos experimentais de 6 animais cada:

- Grupo 1 : Grupo Controle, com cavidade cirúrgica sem implante, preenchida somente de coágulo.
- Grupo 2 : Implante medular de Pericárdio 12 horas.
- Grupo 3 : Implante medular de Tendão 24 horas, com o maior eixo de suas fibras colágenas direcionados paralelamente ao maior eixo da tíbia.
- Grupo 4 : Implante medular de Tendão 24 horas, com o maior eixo de suas fibras colágenas direcionados perpendicularmente ao maior eixo da tíbia.

Nos distintos grupos experimentais cada animal recebeu a matriz implantar, hidratada com solução salina estéril 0,9%, exceto no Grupo 1.

Após a colocação das matrizes ou execução do defeito vazio, os tecidos foram reposicionados e a sutura realizada com pontos interrompidos empregando fio de Seda 4-0.

Durante o período pós-operatório os animais foram mantidos em gaiolas individuais com ração apropriada e água *ad libitum*.

Os ratos foram sacrificados, por injeção excessiva do anestésico citado anteriormente, em períodos de 7, 15 e 30 dias contados a partir do dia da cirurgia experimental.

Quando do sacrifício, a porção da tíbia que compreende a cavidade foi removida, tomando-se os devidos cuidados na dissecação para não tocar o tecido ósseo no local da perfuração.

As peças foram fixadas em solução de formalina a 10% durante 24 horas, lavadas em água corrente por 12 horas e, descalcificadas em solução de E.D.T.A. (Ácido etileno diamino tetracético) a 20%, durante 5 semanas . A solução descalcificadora que continha as peças era trocada uma vez por semana.

Em seguida, as peças passaram pelo processo laboratorial de rotina para sua inclusão em parafina.

Obtidos os blocos, foram realizados cortes longitudinais semi-seriados com espessura de 6 micrômetros em um micrótomo rotativo,

que foram submetidos à coloração pela hematoxilina e eosina e pelo tricrômico de Masson, para estudo histomorfológico em microscopia de luz.

Os cortes histológicos foram analisados na área de incisão cirúrgica, aonde se removeu fragmento da cortical, e na região medular (RM). A área cruenta de onde foi removida parte da cortical foi denominada de “área cirúrgica superficial” (ACS), e as suas margens cirúrgicas de “cortical residual” (CR). A cortical da face oposta à cirúrgica, foi chamada de cortical contra-lateral.

Foram analisados os seguintes itens na microscopia de luz, para cada grupo de animal e para cada tempo de implante (figura 3):

- Na ACS, presença ou ausência de:
 - o Sangue
 - o Fibrose superficial
 - o Neocortical
- Nas bordas laterais da CR, presença ou ausência de:
 - o Calo fibro-ósseo, com predomínio de:
 - Fibrose
 - Neoformação óssea
- Na RM (adjacente a ACS), presença ou ausência de:

- Fibrose
 - Reabsorção óssea, das trabéculas ósseas pré-existente.
 - Vasos congestos
 - Osso neoformado ou tecido ósseo imaturo oriundo de manuseio cirúrgico da RM ou envolvendo o material biológico implantado.
 - Osteoblastos
 - Osteoclastos
 - Lise do osso neoformado
- No material biológico implantado (pericárdio ou tendão), a presença ou ausência de:
- Orientação de suas fibras colágenas
 - Celularidade do tecido
 - Degeneração das fibras colágenas
 - Neoformação óssea sobre as fibras colágenas do tecido biológico implantado
 - Infiltrado inflamatório no interior do material implantado
 - Sangue ou fibrose, dissociando as fibras colágenas do material implantado.

Os achados microscópicos foram graduados da seguinte maneira:

- : ausente

1+/5: presente, mas raro.

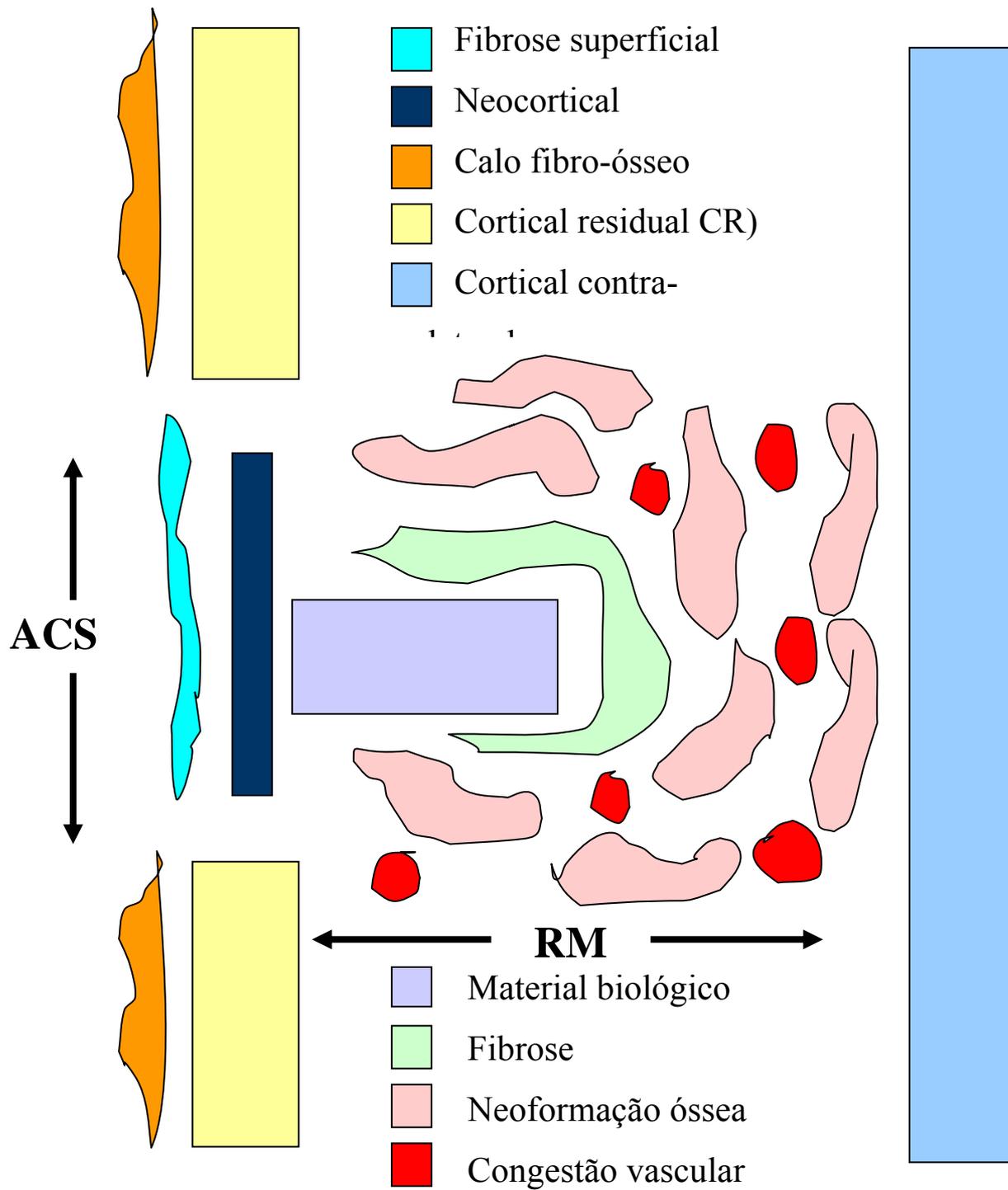
2+/5: presente e escasso

3+/5: presente e em quantidade moderada

4+/5: presente e em maneira moderada a acentuada

5+/5: presente e de forma acentuada.

Esquema das lâminas (Figura 3)



3 – RESULTADOS

3 – RESULTADOS

3.1 – Caracterização morfológica das matrizes

3.1.1 - Dados referentes à caracterização do tendão bovino submetido ao S1 (tratamento para remoção celular) por 24 horas : Análise térmica (calorimetria exploratória diferencial).

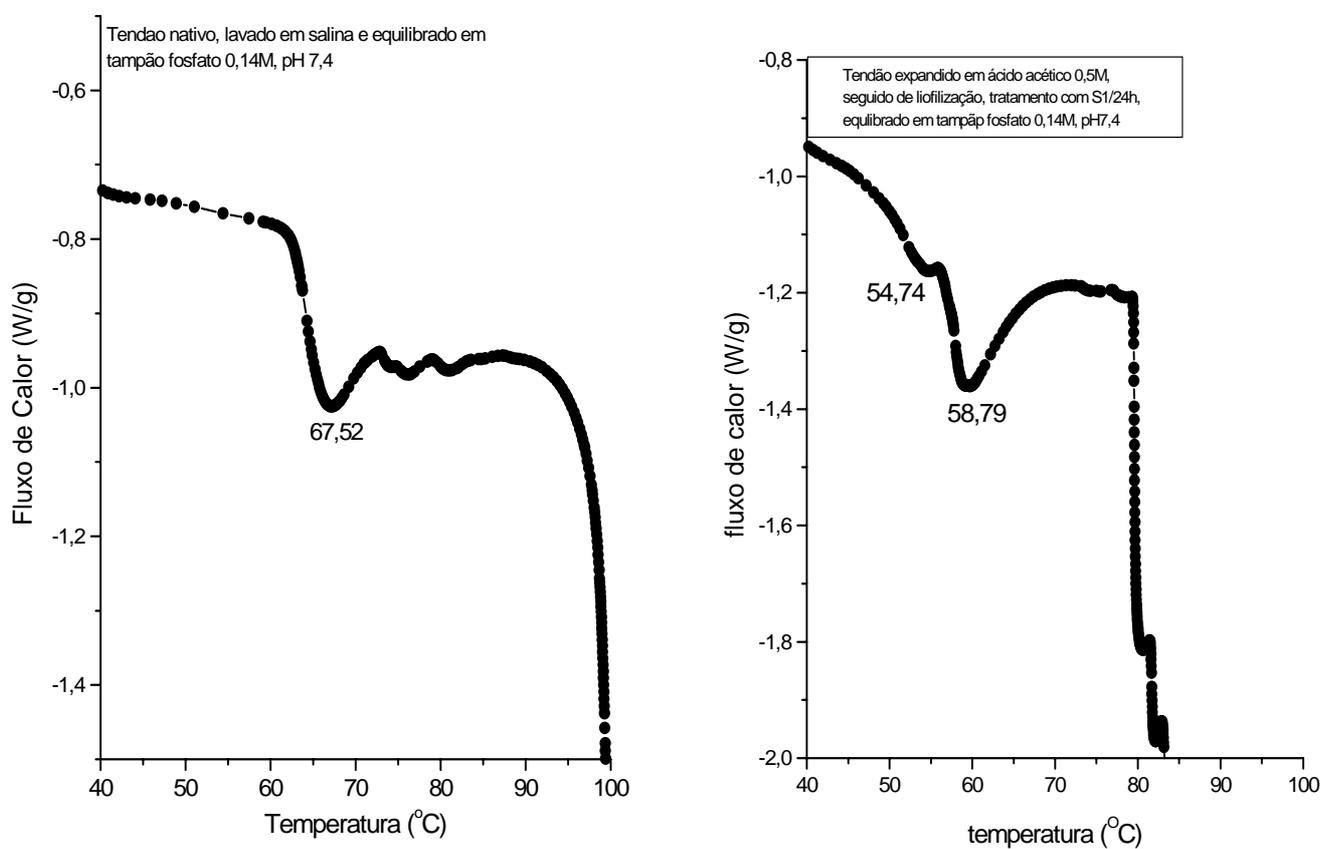


Figura 4 - Tendão bovino submetido ao S1 por 24 horas : Análise térmica (calorimetria exploratória diferencial).

3.1.2 - Dados referentes à caracterização do pericárdio bovino nativo e submetido ao S1 (tratamento para remoção celular) por 12 horas: Análise térmica (calorimetria exploratória diferencial).

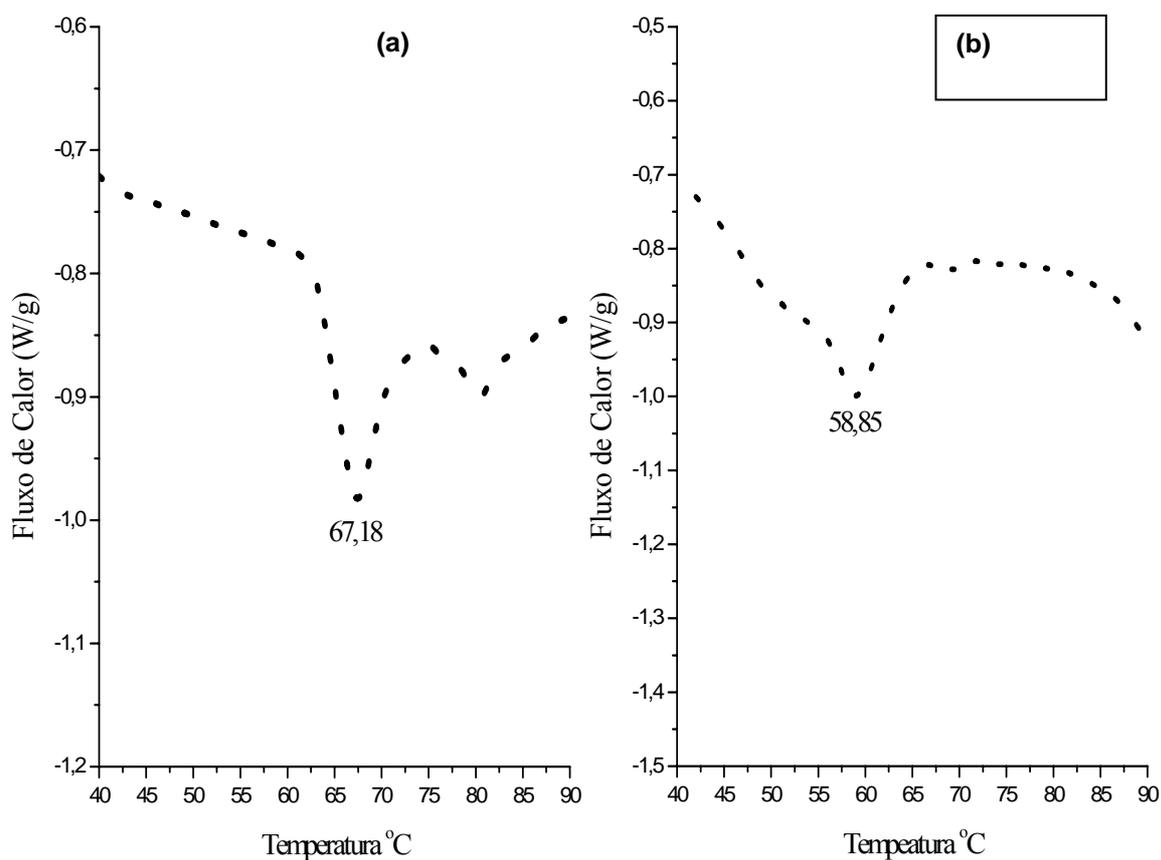


Figura 5 - Calorimetria exploratória diferencial de pericárdio nativo (a) e pericardio tratado quimicamente por 12 horas. Análise térmica (calorimetria exploratória diferencial).

3.1.3 – Microscopia Eletrônica de Varredura

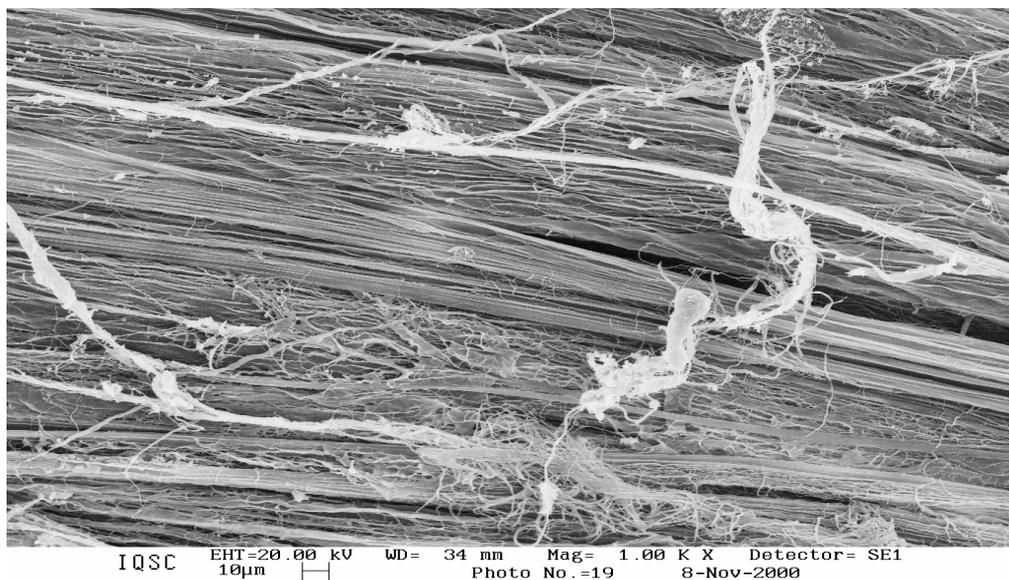


Figura 6 - Microscopia eletrônica de varredura de tendão bovino tratado quimicamente para remoção celular por um período de 24h.

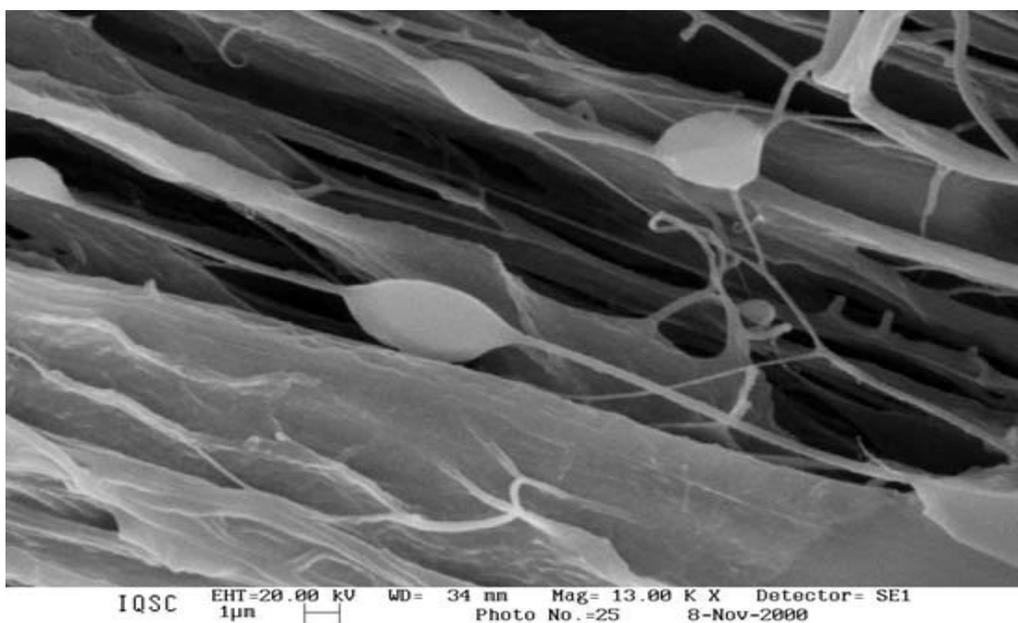


Figura 7 - Microscopia eletrônica de varredura de tendão bovino tratado quimicamente para remoção celular por um período de 24h.

3.1.4 – Microscopia Eletrônica de Transmissão

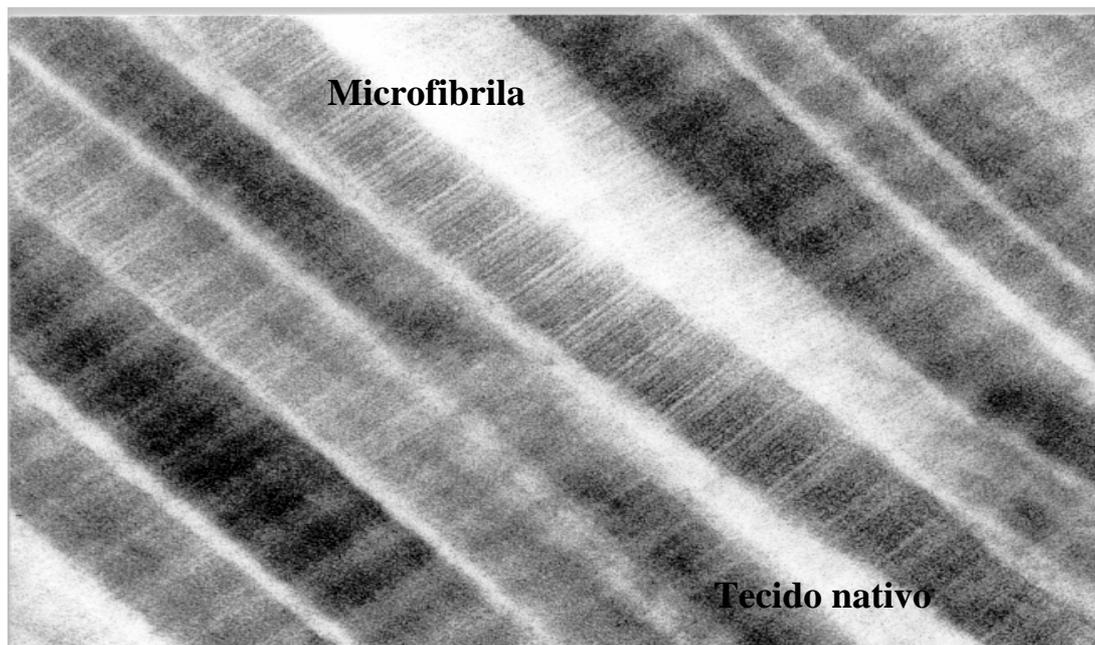


Figura 8 - Microscopia eletrônica de transmissão de pericárdio bovino nativo.(140.000x).

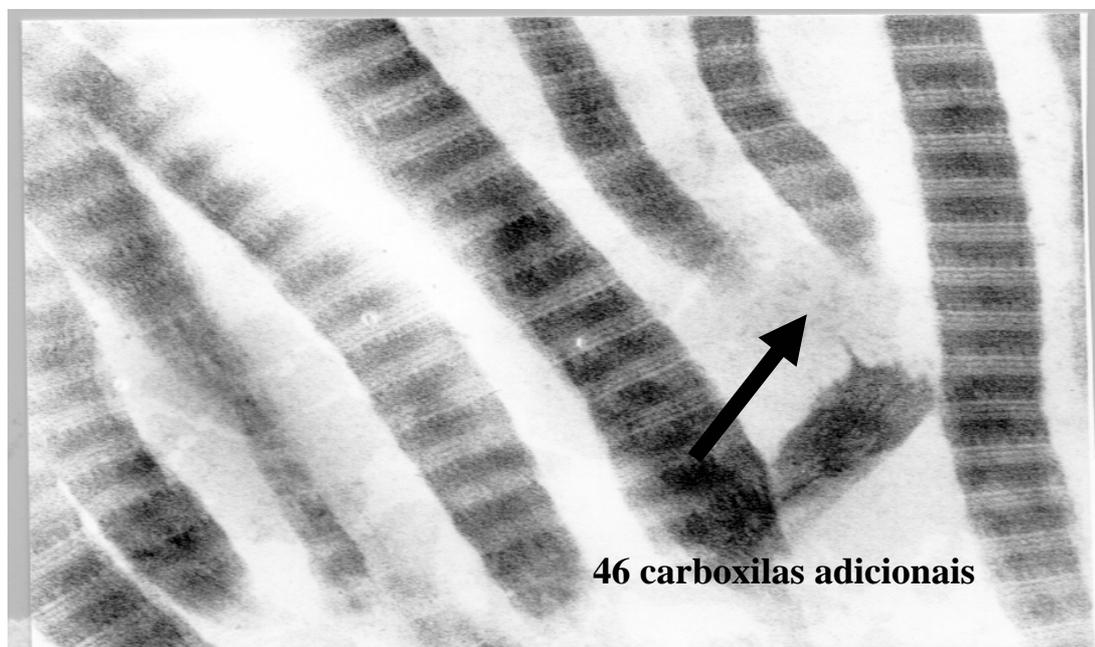


Figura 9 - Microscopia eletrônica de transmissão de pericárdio bovino tratado quimicamente para remoção celular por um período de 12 horas.(140.000x).

3.2 – Microscopia óptica segundo os grupos estudados

3.2.1 - Grupo controle (G1)

O estudo histológico da ACS evidenciou uma faixa de fibrose superficial, presente de maneira acentuada nos tempos de 7 (fig. 10 e 11) e 15 dias (fig. 12 e 13) e reduzida no de 30 dias (fig. 14 e 15). Subjacente a faixa fibrosa, em contato com a RM, constatou-se a partir de 15 dias (fig. 12 e 13) a presença de tecido ósseo primário, formando uma neocortical rudimentar, imatura, a qual com o período de 30 dias (fig. 14 e 15), mostrou-se mais espessa e mais organizada, de aspecto mais maduro. Não foi constatado um periósteo definido, recobrando a neocortical.

No periósteo da CR, adjacente a ACS, foi observada neoformação fibro-óssea, semelhante a calo de fratura, denominada de calo fibro-ósseo. Essa alteração junto à área cirúrgica mostrou-se de maneira exuberante nos tempos de 7 (fig. 10 e 11) e 15 dias (fig. 12 e 13) e com discreta diminuição de intensidade aos 30 dias (fig. 14 e 15), principalmente as custas de redução da fibrose.

Presença na RM, adjacente a ACS, de fibrose delimitando área de sangramento recente no sub-grupo de 7 dias (fig. 10 e 11) e ausente nos tempos de 15 (fig. 12 e 13) e 30 dias (fig. 14 e 15).

Na RM, foram observados ainda:

Neoformação óssea acentuada no tempo de 7 dias (fig. 10 e 11), envolvendo a área de fibrose e sangue, com diminuição de intensidade nos tempos de 15 (fig. 12 e 13) e 30 dias (fig. 14 e 15).

Infiltrado inflamatório mononuclear junto a neoformação óssea e que aumentou em intensidade, proporcional ao maior tempo cirúrgico.

Reabsorção de trabéculas ósseas no tempo de 7 dias (fig. 10 e 11) e de lise do osso neoformado nos tempos de 15 (fig. 12 e 13) e de 30 dias (fig. 14 e 15).

Congestões vasculares, presentes entre as trabéculas ósseas imaturas, predominando no tempo de 15 dias (fig. 12 e 13).

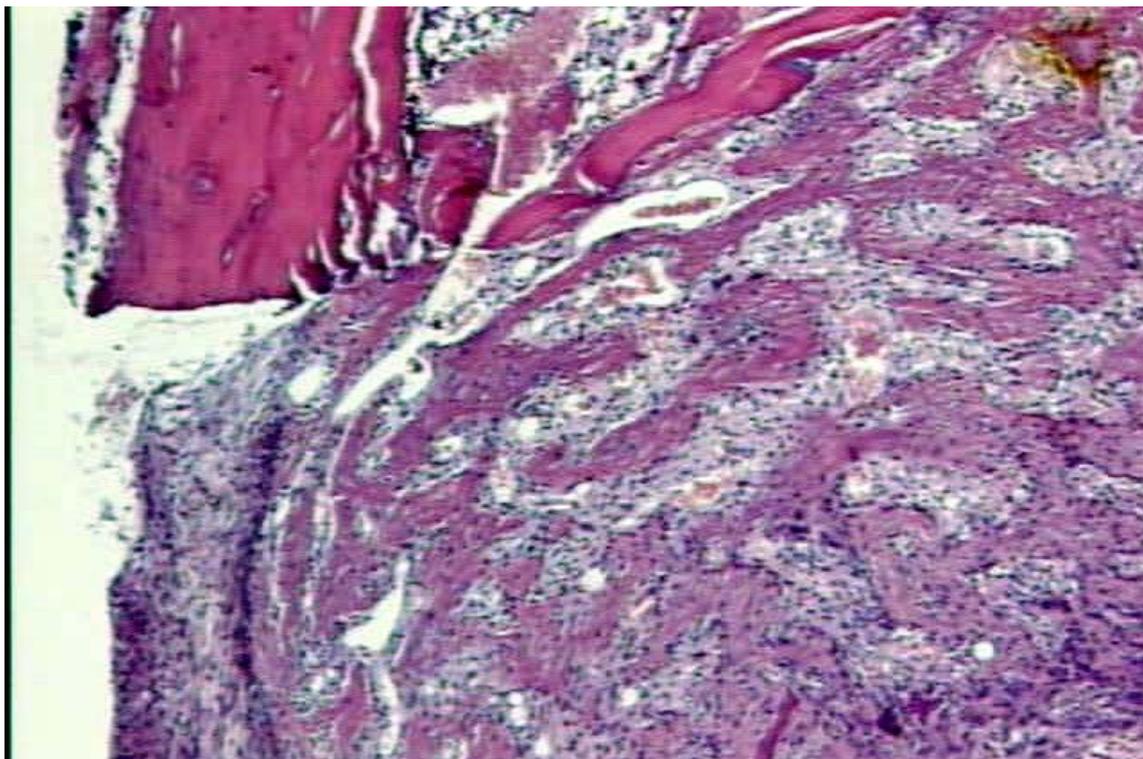


Figura 10 -Grupo 1- 7 dias. Área cirúrgica superficial: fibrose superficial (esquerda, inferior) junto a osso cortical residual (superior, esquerda) em continuidade com neoformação óssea medular (central, direita) (HE, 40X).

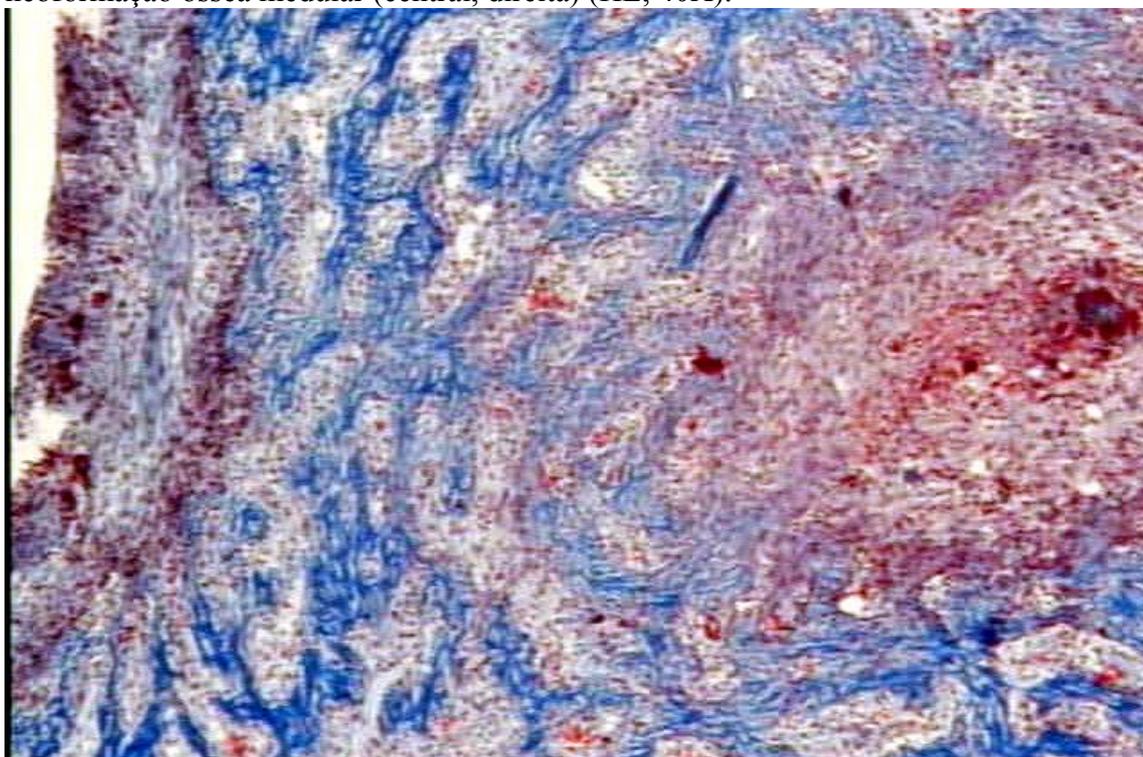


Figura 11 -Grupo 1- 7 dias. Região medular junto à área cirúrgica superficial: fibrose superficial (esquerda), neoformação óssea (central) e área de fibrose e sangramento recente (direita) (Tricrômico de Masson, 40X).

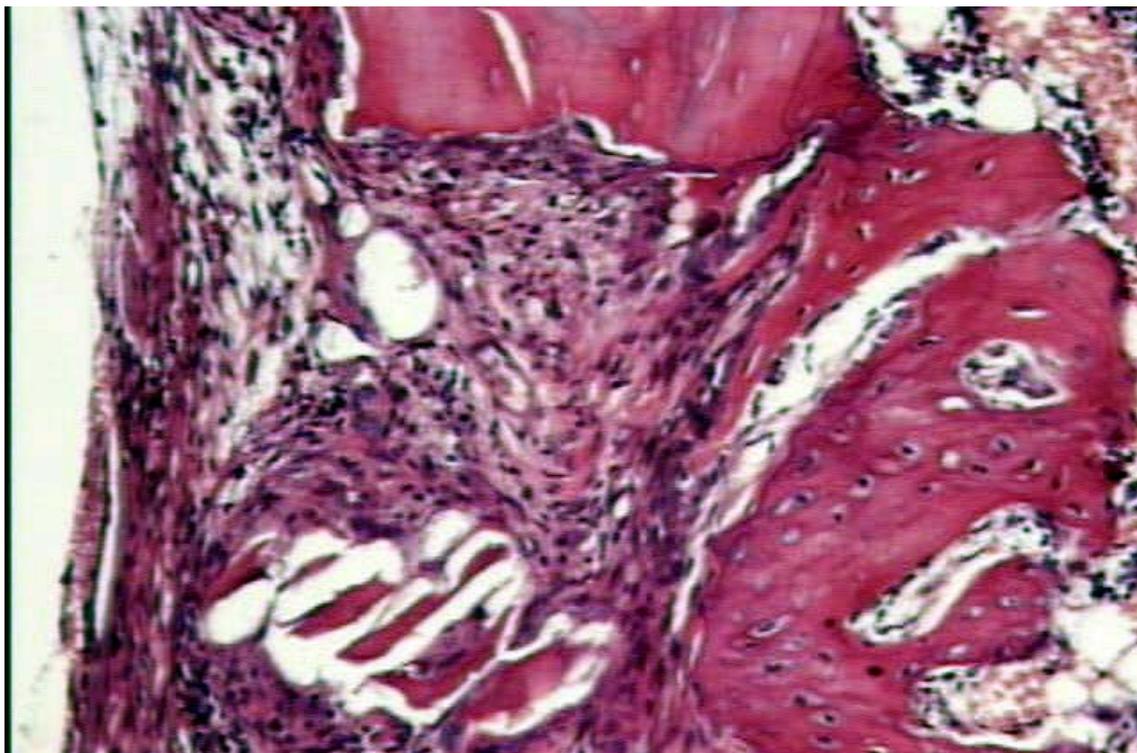


Figura 12 -Grupo 1- 15 dias. Área cirúrgica superficial: fibrose superficial (esquerda), cortical residual (superior) e osso neoformado (direita) (HE, 100X).

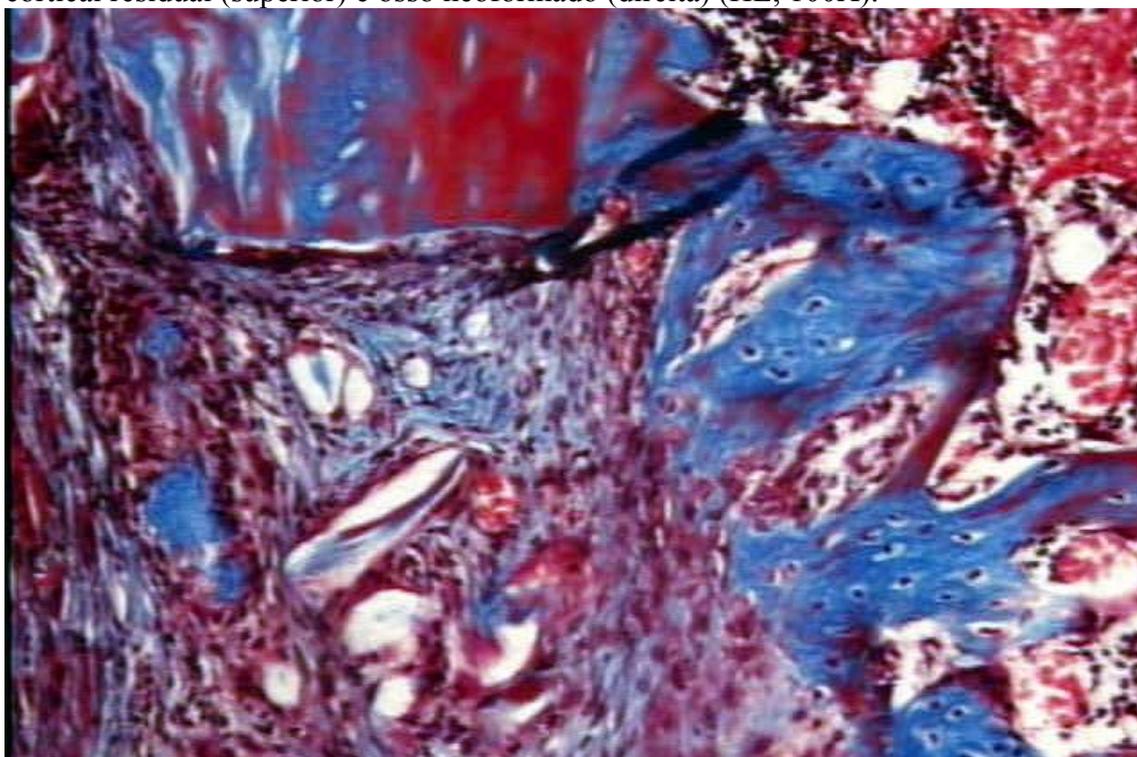


Figura 13 -Grupo 1- 15 dias. Área cirúrgica superficial: fibrose (esquerda, inferior), cortical residual (superior, esquerda) e neoformação óssea (direita). (Tricômico de Masson, 100X).

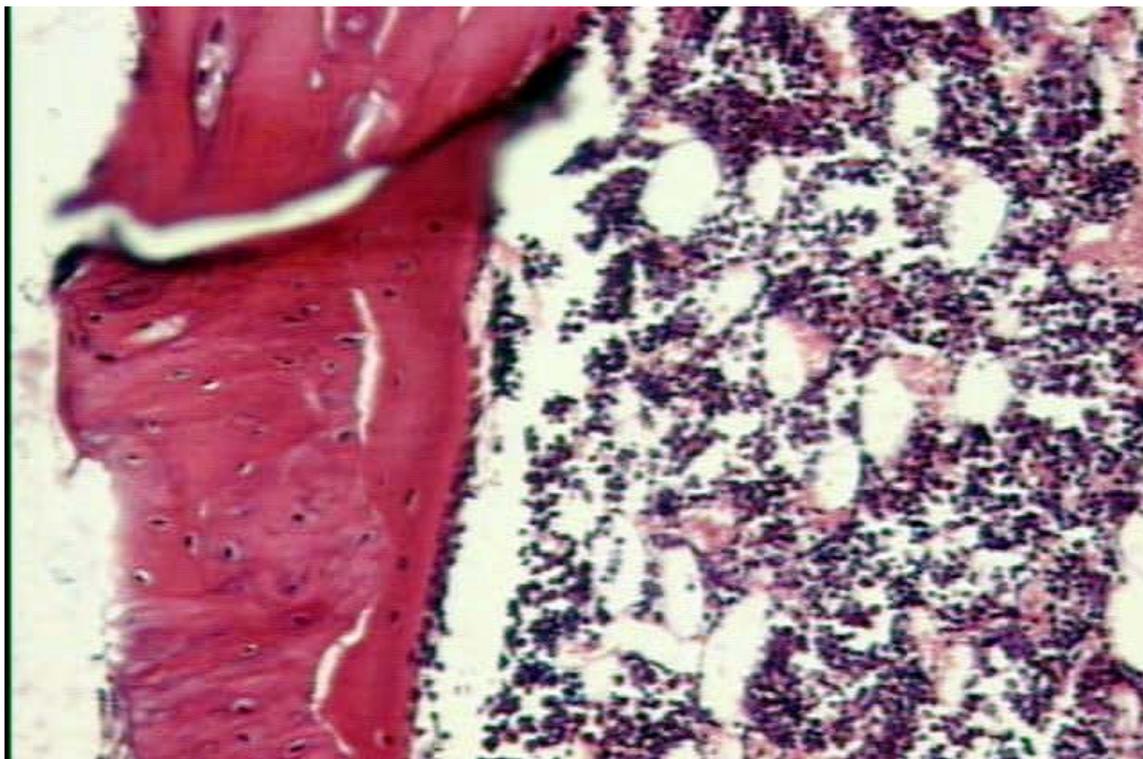


Figura 14 -Grupo 1- 30 dias. Área da incisão cirúrgica: transição entre a neocortical (esquerda, inferior) e a cortical residual (superior, esquerda) (HE, 100X).

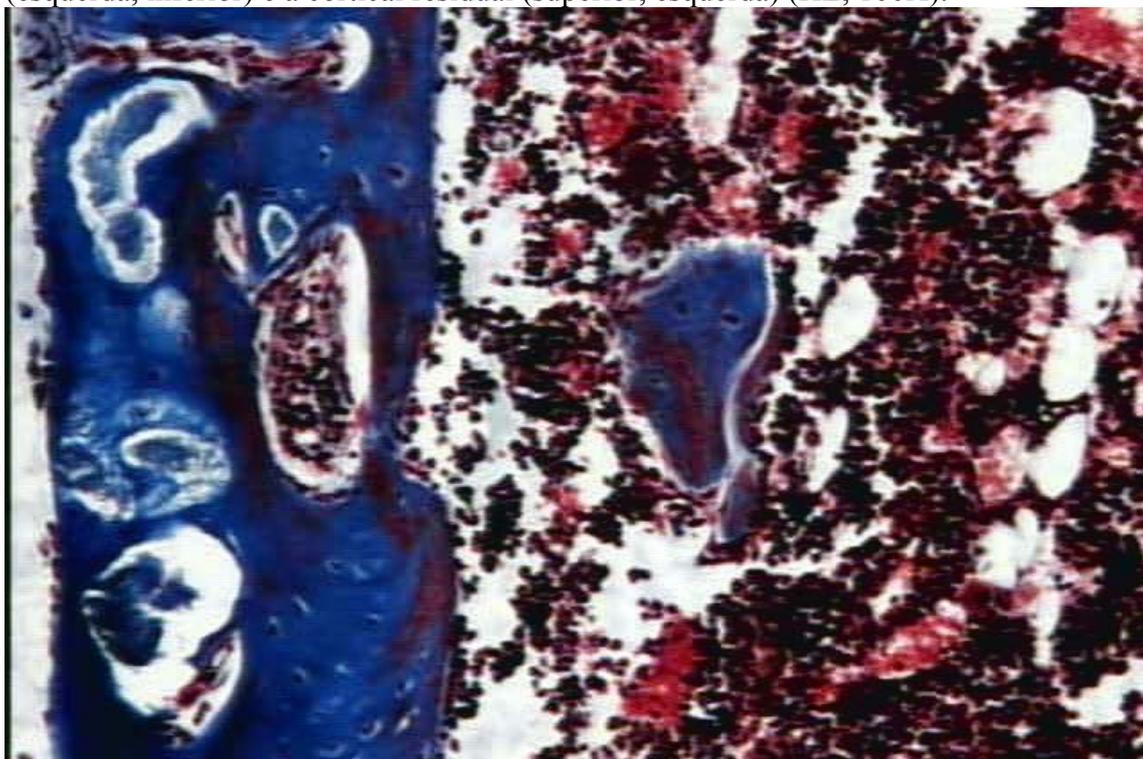


Figura 15 -Grupo 1- 30 dias. Neocortical (esquerda) mostrando depósitos de material do tipo sais de cálcio (Tricrômico de Masson, 100X).

3.2.2 - Grupo G2 (Pericárdio 12 hs)

O estudo à microscopia de luz da ACS, mostrou presença de fibrose superficial mais discreta do que a observada no grupo G1 e aparentemente mais acentuada com 15 dias (fig. 18 e 19).

Presença de neocortical na ACS, a partir do tempo de 15 dias (fig. 18 e 19) e com uma maior maturação óssea desta neocortical no tempo de 30 dias (fig. 20 e 21), de intensidade semelhante à observada no grupo G1.

O calo fibro-ósseo foi observado no periósteo da CR, e de maneira mais acentuada do que no grupo G1.

Na RM adjacente ao pericárdio implantando, presença de fibrose do tipo reacional, apenas no tempo de 7 dias (fig. 16 e 17) e de neoformação óssea peri-pericárdio, em todos os tempos de implante, porém, menos acentuada do que no grupo G1. A congestão vascular junto ao osso neoformado, ainda que menos exuberante que a do grupo G1, mostrou-se também mais acentuada com 15 dias (fig. 18 e 19).

Presença nas extremidades distais do pericárdio, de acúmulos de células do tipo osteoblasto e osteoclasto, de intensidade maior com 7 dias (fig. 16 e 17).

A celularidade pericárdica mostrou-se de aspecto e intensidade usuais ⁽⁵⁶⁾ independentemente do tempo de implante.

As fibras colágenas pericárdicas mostraram orientação multidirecional dentro da RM e moderadas alterações degenerativas, de intensidade semelhante nos 3 tempos de implante.

A partir do tempo de 15 dias (fig. 18 e 19), presença de discreta neoformação óssea, no interior do pericárdio, aparentemente sobre as suas fibras colágenas e com aumento de intensidade no tempo de 30 dias (fig. 20 e 21). Presença de infiltrado inflamatório mononuclear intersticial e de fibrose intrapericárdica, a partir do tempo de 15 dias (fig. 18 e 19), mostrando ambos um aumento crescente de intensidade, proporcional ao tempo de implante.

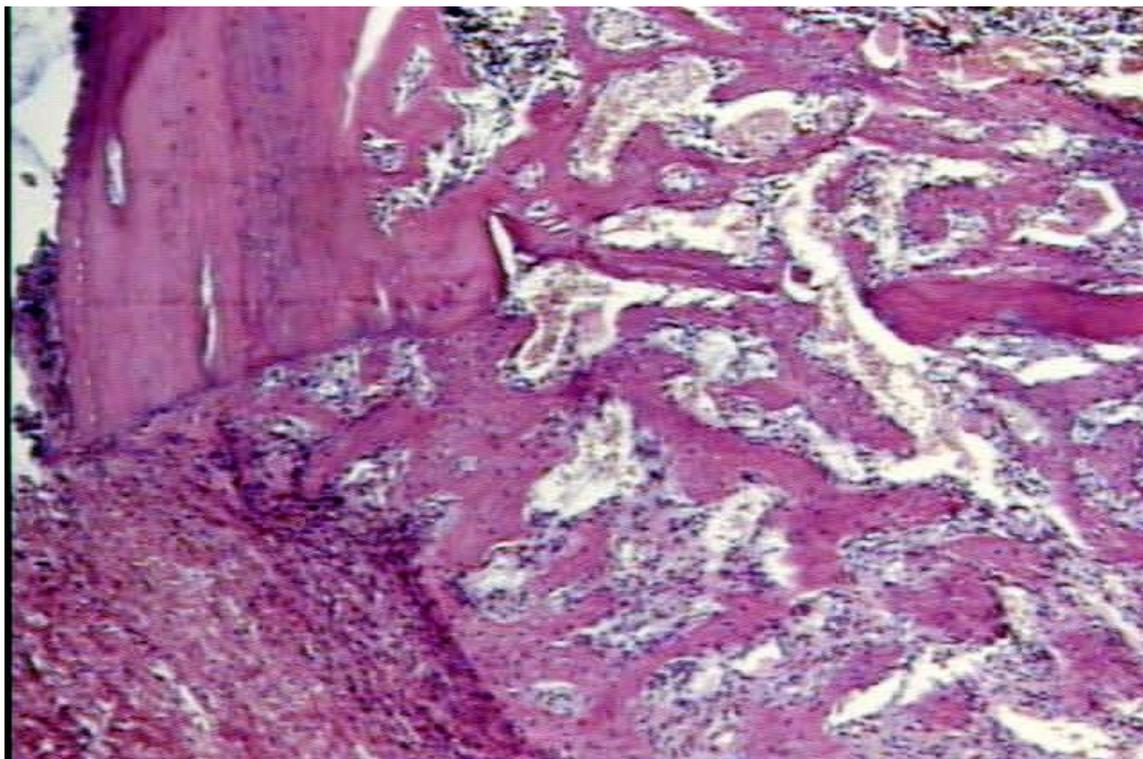


Figura 16 -Grupo 2- 7 dias. ACS: transição entre CR (esquerda, superior), pericárdio superficial (esquerda, inferior) e neoformação óssea (direita) (HE, 40X).

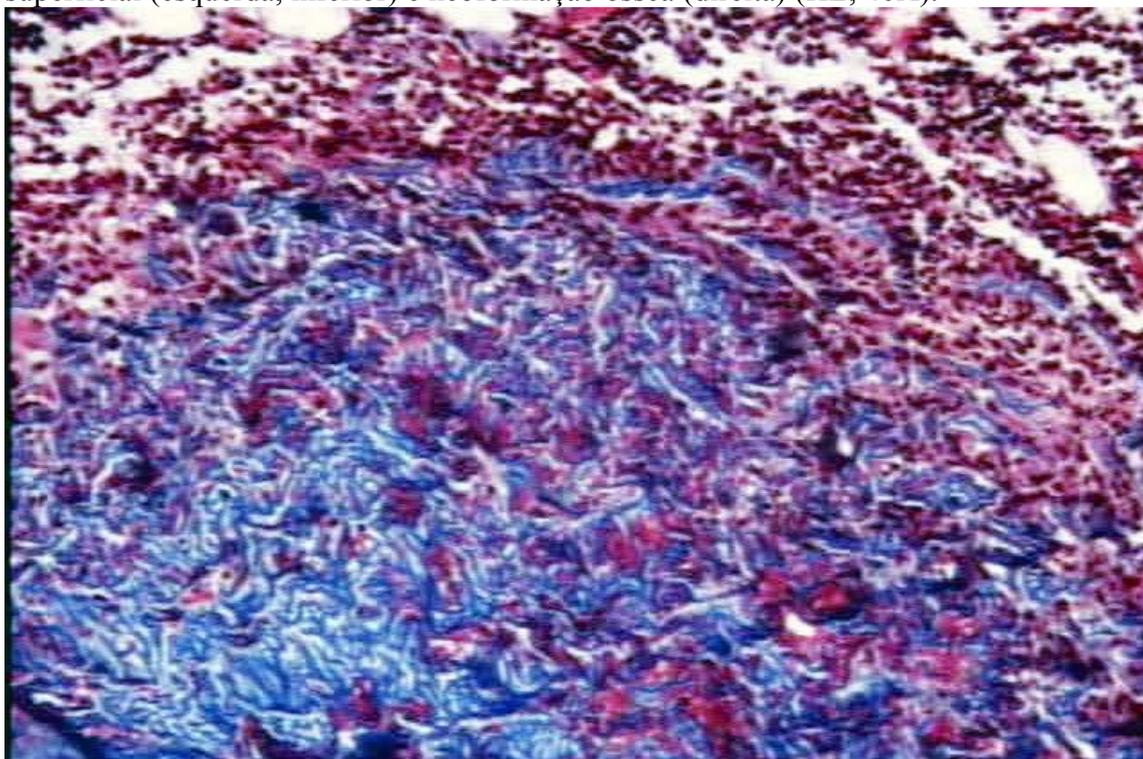


Figura 17 -Grupo 2- 7 dias. RM: medula óssea hematopoiética (superior) e pericárdio (inferior) (TM, 100X).

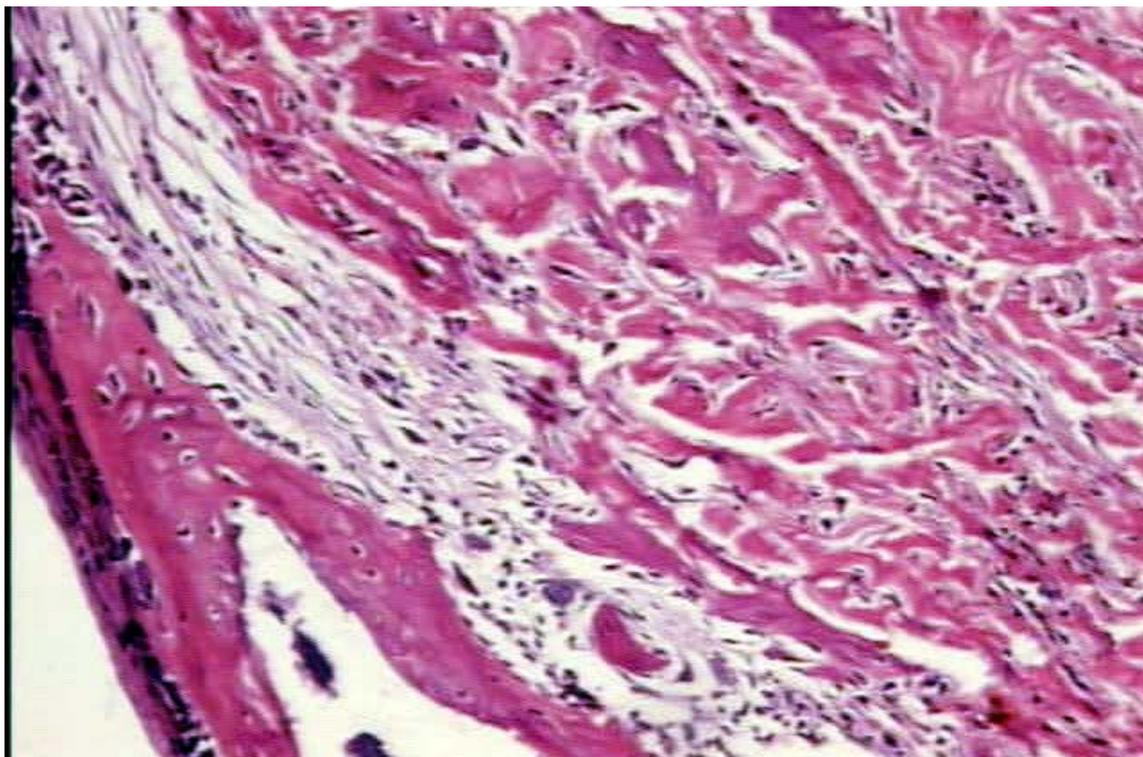


Figura 18 -Grupo 2- 15 dias. ACS: neocortical (esquerda), fibrose (esquerda, central), pericárdio (central, direita) com celularidade moderada e células inflamatórias mononucleares do tipo linfócitos, dissociando as fibras pericárdicas (HE, 100X).

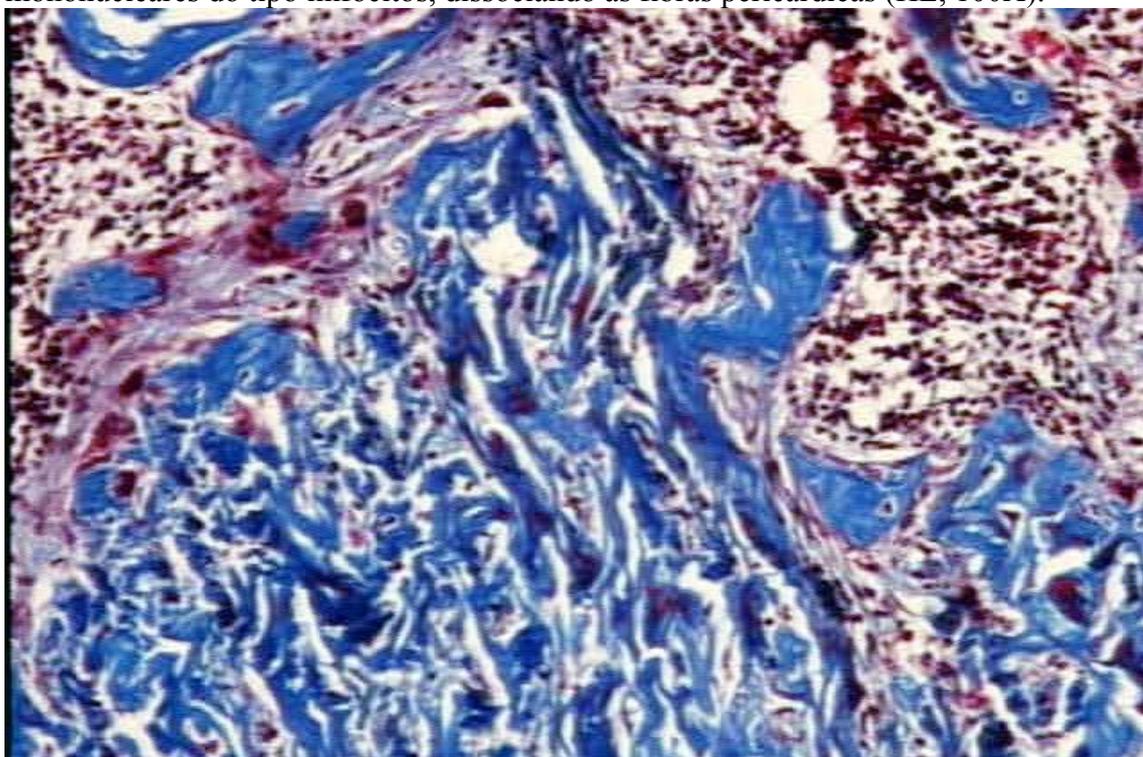


Figura 19 -Grupo2-15 dias. RM: ossificação primária (superior) em continuidade com o pericárdio (central, inferior) (TM, 100X).

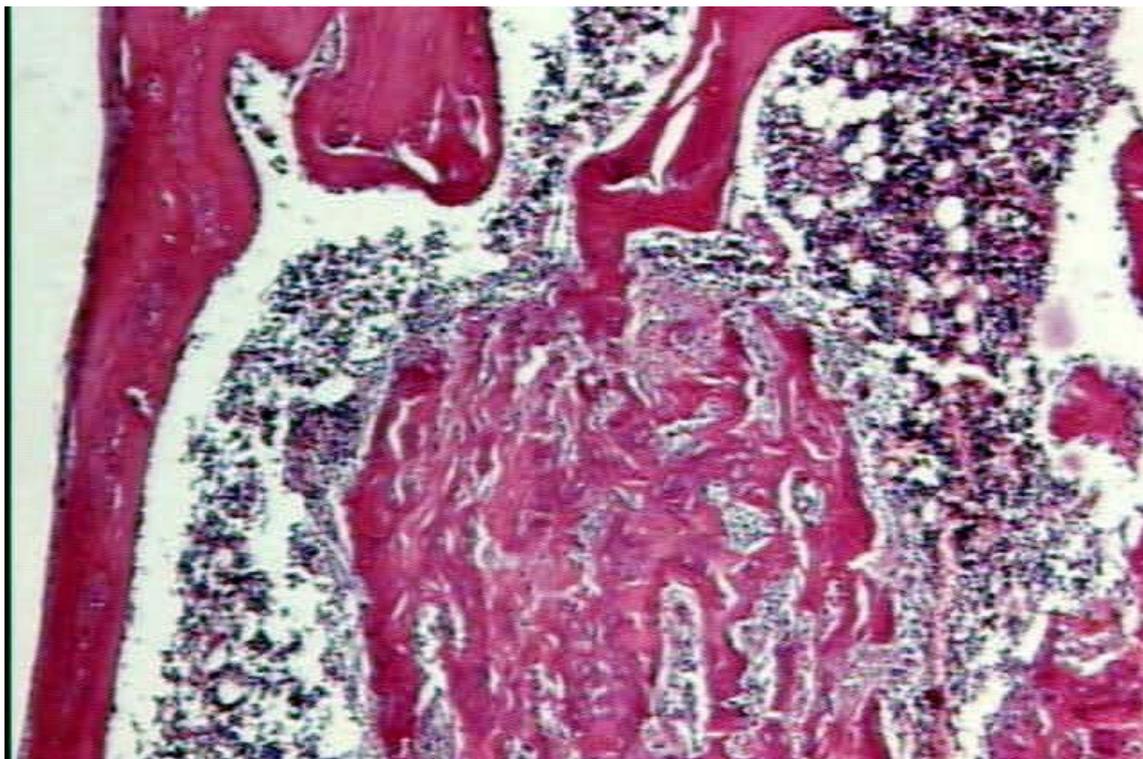


Figura 20 -Grupo 2- 30 dias. ACS: neocortical (esquerda, inferior) em continuidade com CR (esquerda, superior). Área central contendo pericárdio, com neoformação óssea em seu interior, sobre as fibras colágenas do mesmo (HE, 40X).

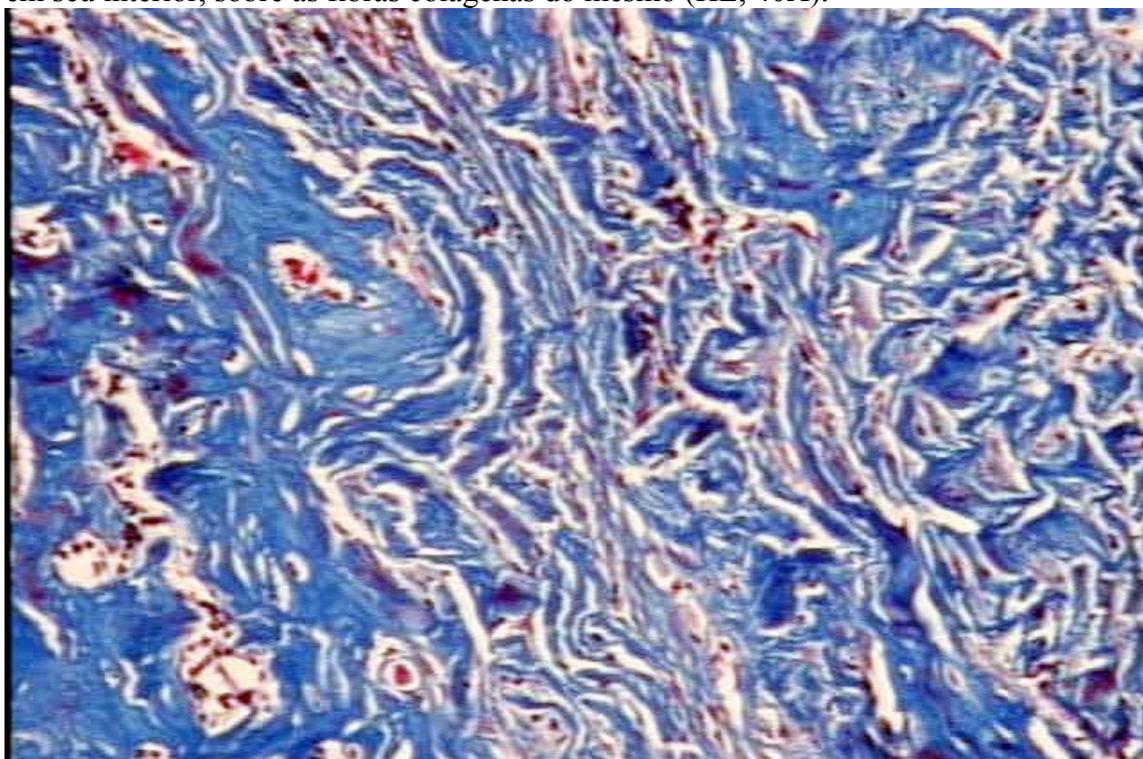


Figura 21 -Grupo 2- 30 dias. RM: fibrose intrapericárdica (central) e neoformação óssea no interior do implante (esquerda) (TM, 100X).

3.2.3 - Grupo G3 (Tendão paralelo 24 hs)

O estudo microscópico da ACS mostrou fibrose superficial mais discreta do que a observada no grupo G1, porém, algo mais acentuada que no grupo G2 e também mais proeminente com 15 dias (fig. 24 e 25).

Presença de neocortical na ACS, a partir do tempo de 15 dias (fig. 24 e 25) e com uma maior maturação óssea desta neocortical no tempo de 30 dias (fig. 26 e 27), de intensidade menor do que a observada nos grupos G1 e G2.

Calo fibro-ósseo mais discreto que no grupo G2 e semelhante ao grupo G1.

Observada moderada fibrose reacional na RM, com 15 dias (fig. 24 e 25). Neoformação óssea e congestão vascular peri-implante semelhantes ao grupo G2. Lise de osso neoformado presente nos tempos de 7 (fig. 22 e 23) e 15 dias (fig. 24 e 25) e mais intensa neste último.

Presença nas extremidades distais do tendão, de acúmulos de células do tipo osteoblasto e osteoclasto, de intensidade decrescente com maior tempo de implante.

As fibras colágenas tendíneas mostraram orientação paralela ao maior eixo do osso, somente com o tempo de 7 dias (fig. 22 e 23) e arranjo multidirecional crescente, com o aumento do tempo de implante. As fibras colágenas tendíneas apresentaram moderadas alterações degenerativas e algo mais acentuada aos 30 dias (fig. 26 e 27). Presença de sangue intra-tendíneo aos 7 dias (fig. 22 e 23).

A neoformação óssea sobre as fibras colágenas do tendão foi encontrada já aos 7 dias de implante (fig. 22 e 23) e com aumento crescente de intensidade, proporcional ao tempo de implante. Presença de infiltrado inflamatório mononuclear e de fibrose intersticial intra-tendíneos em intensidade crescente com um maior tempo de implante.

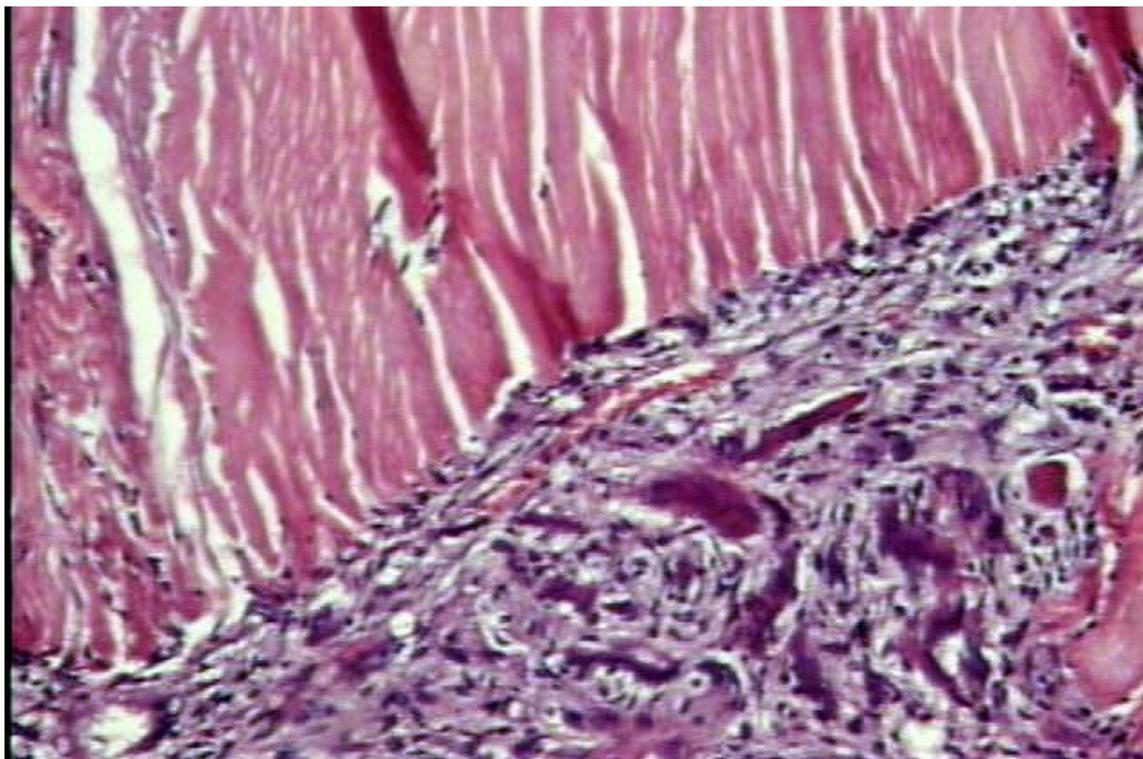


Figura 22 -Grupo 3- 7 dias. RM: tendão (superior) junto a osteoclastos (inferior) (HE, 100X).

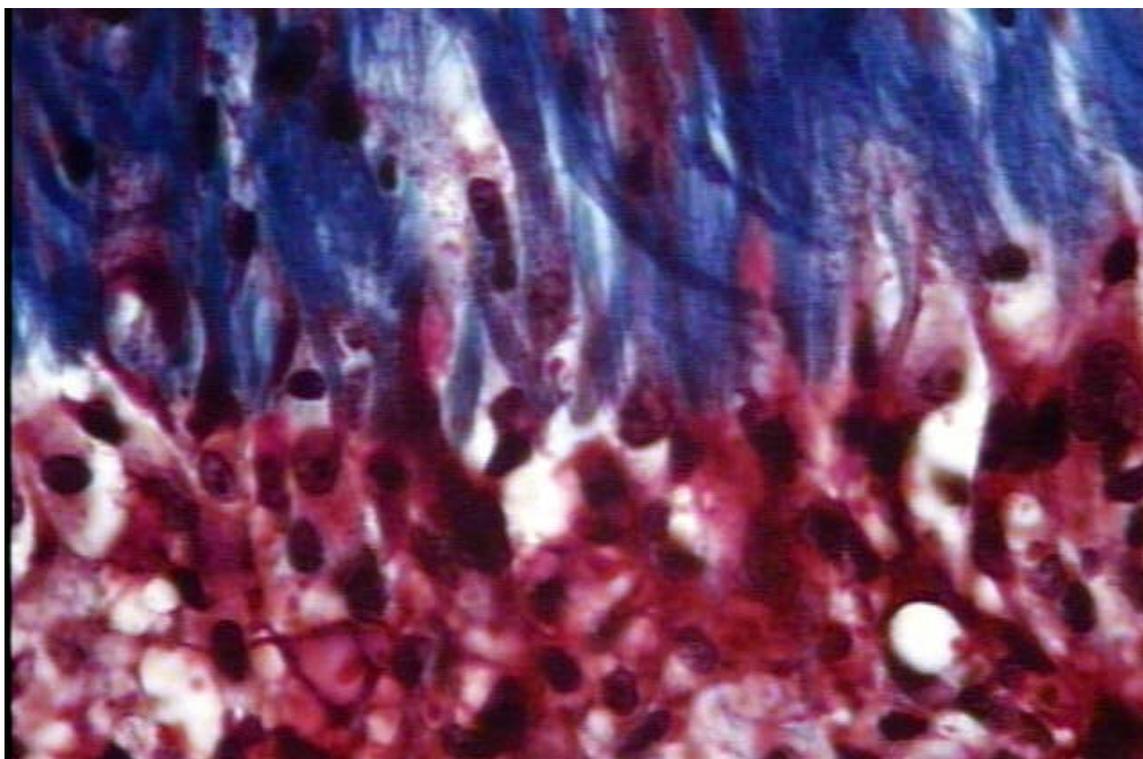


Figura 23 -Grupo 3- 7 dias. RM: transição entre tendão (superior) e células do tipo osteoblasto (inferior) (TM, 400X).

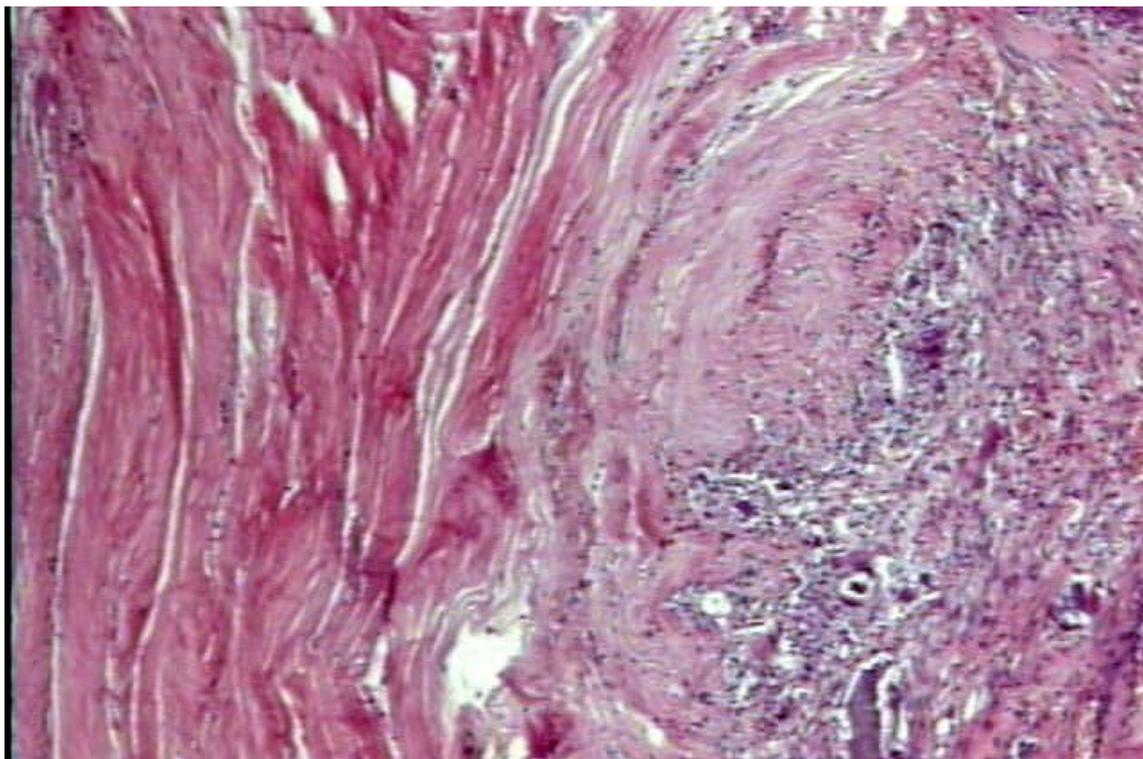


Figura 24 -Grupo 3- 15 dias. RM: tendão (esquerda) e fibrose (central), dissociados por infiltrado inflamatório mononuclear (direita) (HE, 40X).

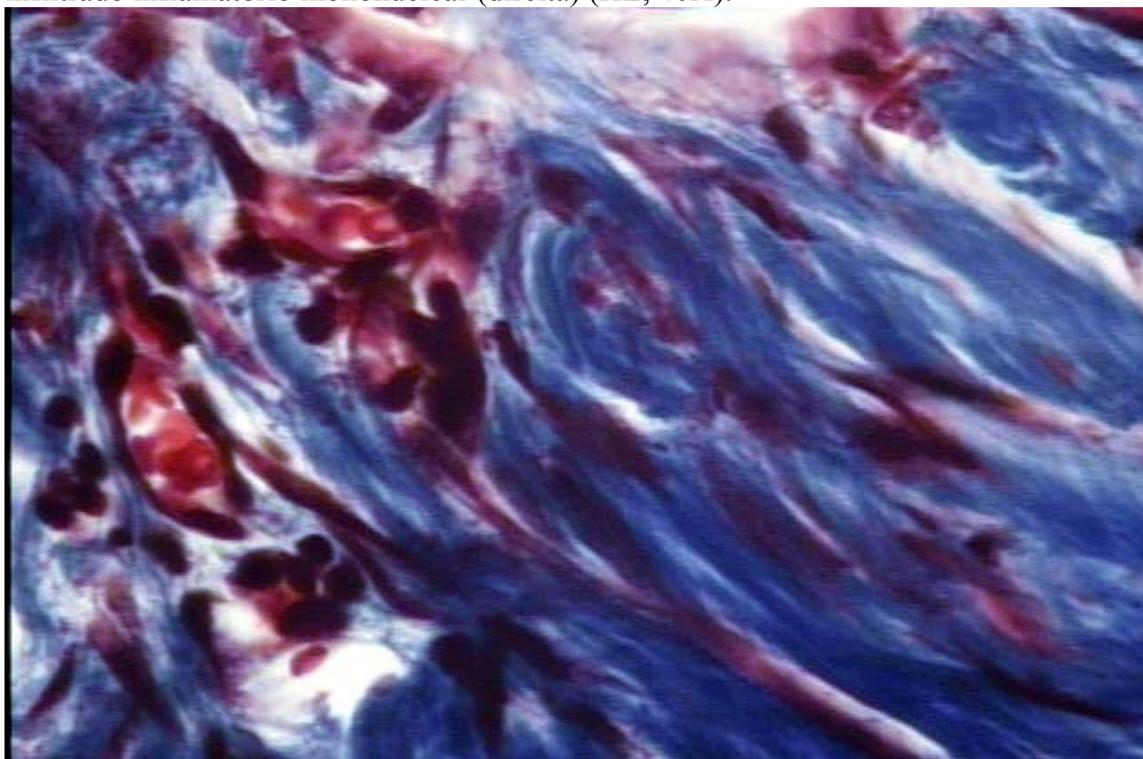


Figura 25 –Grupo 3- 15 dias. RM: transição entre células do tipo osteoblasto (superior) e tendão (inferior). Presença de vasos (esquerda, central) penetrando entre as fibras colágenas do tendão (TM, 400X).

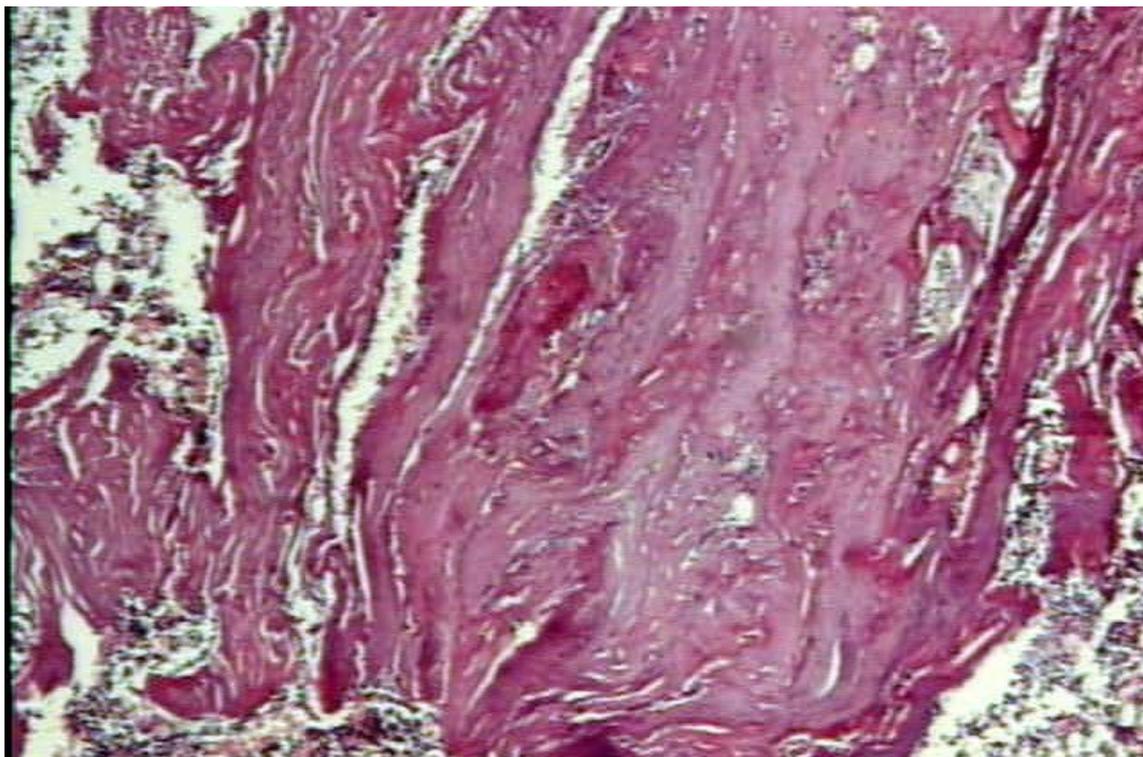


Figura 26 -Grupo 3- 30 dias. RM: Neoformação óssea no interior do implante (HE, 40X).

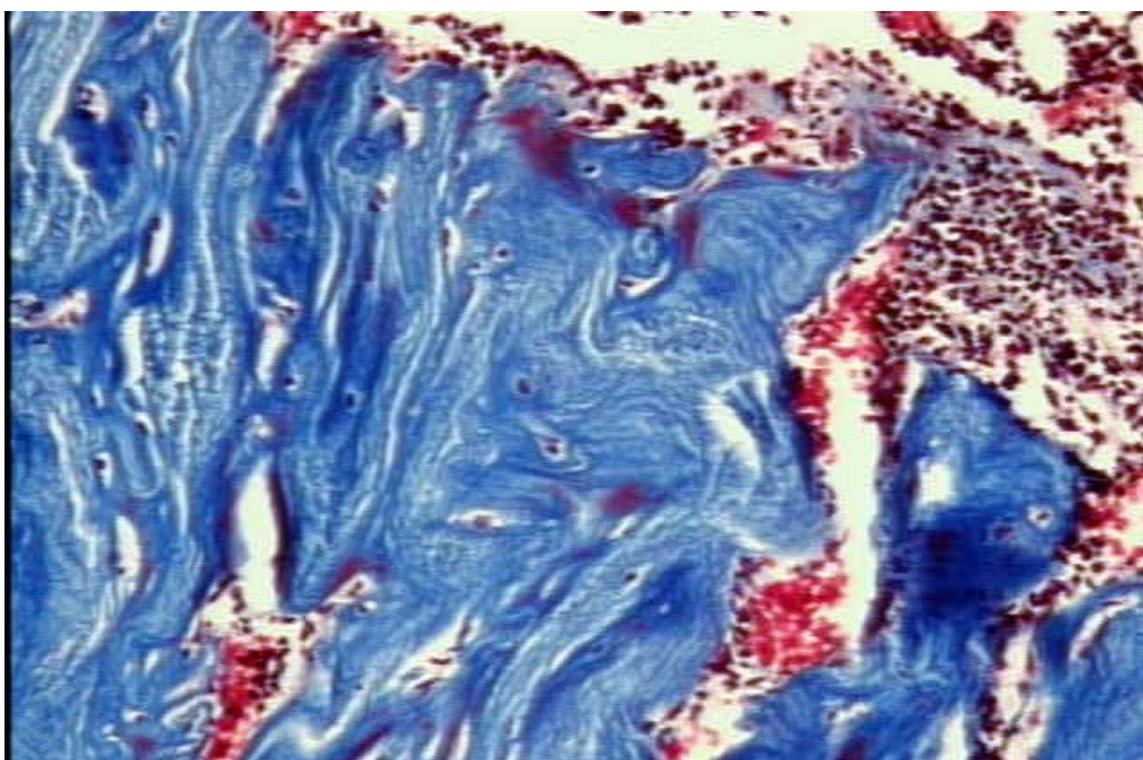


Figura 27 -Grupo 3- 30 dias. RM: transição entre a medula óssea hematopoiética (superior, direita) e o tendão (inferior, central). Presença de vasos sanguíneos aparentemente penetrando no tendão por entre as suas fibras colágenas (TM, 100X).

3.2.4 - Grupo G4 (Tendão perpendicular 24 hs)

O estudo microscópico da ACS mostrou presença de fibrose superficial mais discreta do que a observada nos grupos G1 e G3, porém, semelhante ao grupo G2 e também mais proeminente com 15 dias (fig. 30 e 31).

Presença de neocortical na ACS, a partir do tempo de 15 dias (fig. 30 e 31) e com uma maior maturação óssea desta neocortical no tempo de 30 dias (fig. 32 e 33); de intensidade semelhante à observada nos grupos G1 e G2.

Calo fibro-ósseo de aspecto semelhante aos grupos G1 e G3.

Presença de fibrose reacional na RM, nos tempos de 7 (fig. 28 e 29) e 15 dias (fig. 30 e 31), e neste último, semelhante em intensidade ao grupo G3. Reabsorção óssea discreta aos 7 dias (fig. 28 e 29).

Neoformação óssea peri-tendínea maior que o grupo G3 aos 7 dias (fig. 28 e 29) e em quantidade decrescente com o aumento do tempo de implante. Congestão vascular moderada e sem alteração de intensidade com o aumento do tempo de implante.

Lise do osso neoformado menos exuberante que no grupo G3 e presente apenas no tempo de 15 dias (fig. 30 e 31).

Osteoblastos e osteoclastos em número semelhante ao grupo G3 e margeando predominantemente as extremidades distais do tendão.

O tendão implantado mostrou orientação multidirecional de suas fibras já a partir de 7 dias de implante (fig. 28 e 29), sendo pouco observado o arranjo perpendicular das mesmas com relação ao maior eixo do osso de quando do procedimento cirúrgico.

Celularidade tendínea usual e discretamente diminuída apenas aos 30 dias (fig. 32 e 33). Fibras colágenas do tendão mais degeneradas do que no grupo G3 e com aumento de intensidade proporcional ao tempo de implante.

Neoformação óssea sobre as fibras colágenas tendíneas a partir de 15 dias (fig. 30 e 31) e mais proeminente aos 30 dias (fig. 32 e 33) do que no grupo G3.

O infiltrado inflamatório mononuclear e a fibrose intersticiais intrapericárdicos mostraram-se presentes nos 3 tempos de implante, sendo mais exuberantes que no grupo G3 e em maior intensidade aos 15 dias (fig. 30 e 31).

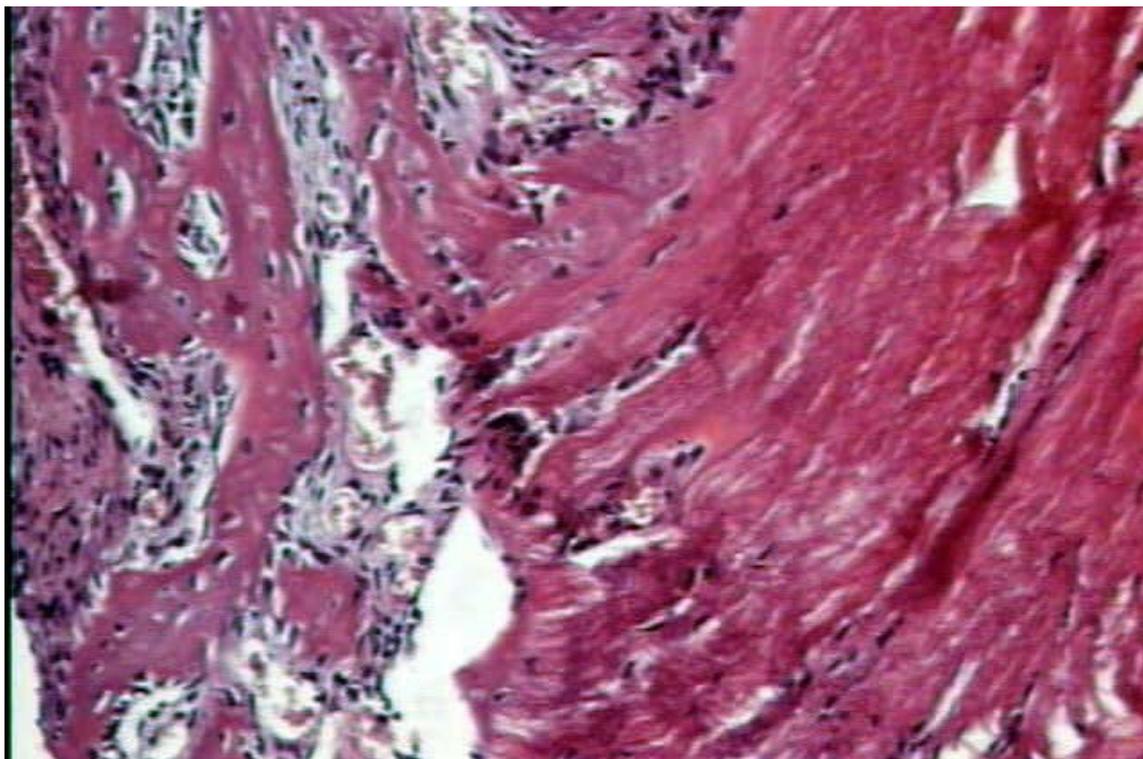


Figura 28 -Grupo 4- 7 dias. ACS: neof ormation óssea (esquerda) e tendão (direita) (HE, 100X).

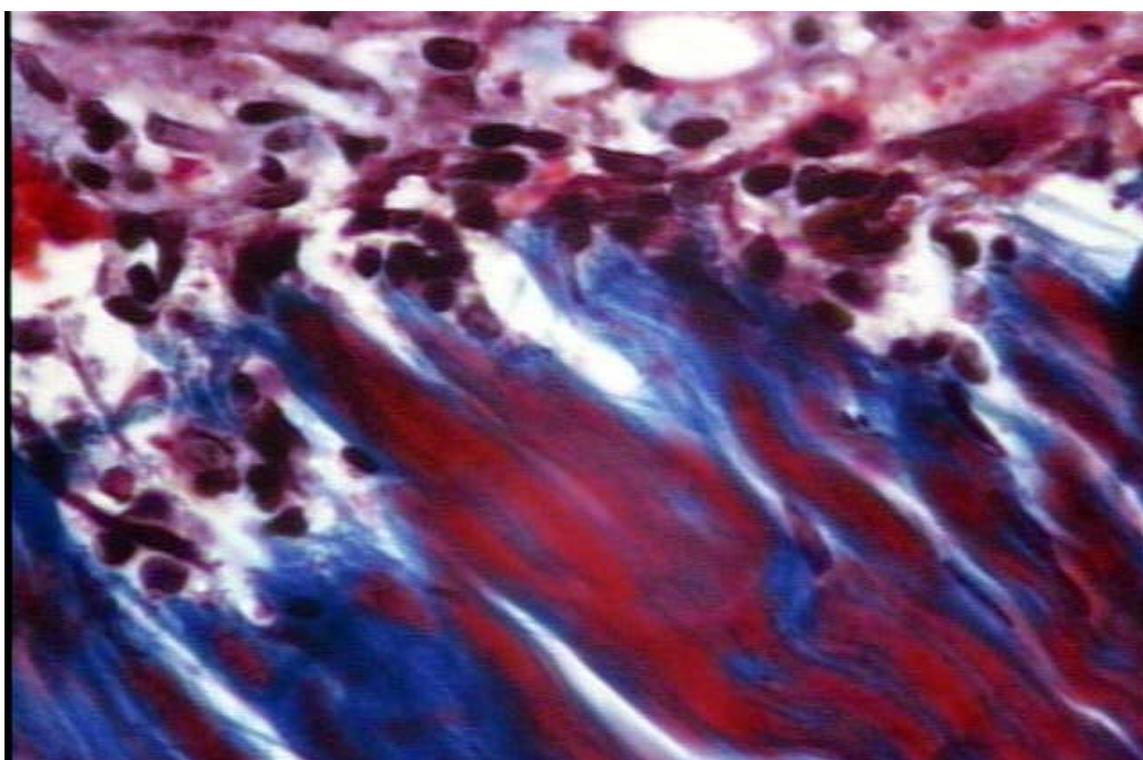


Figura 29 -Grupo 4- 7 dias. RM: transição entre células do tipo osteoblasto (superior) e fibras colágenas do tendão (central, inferior) (TM, 400X).

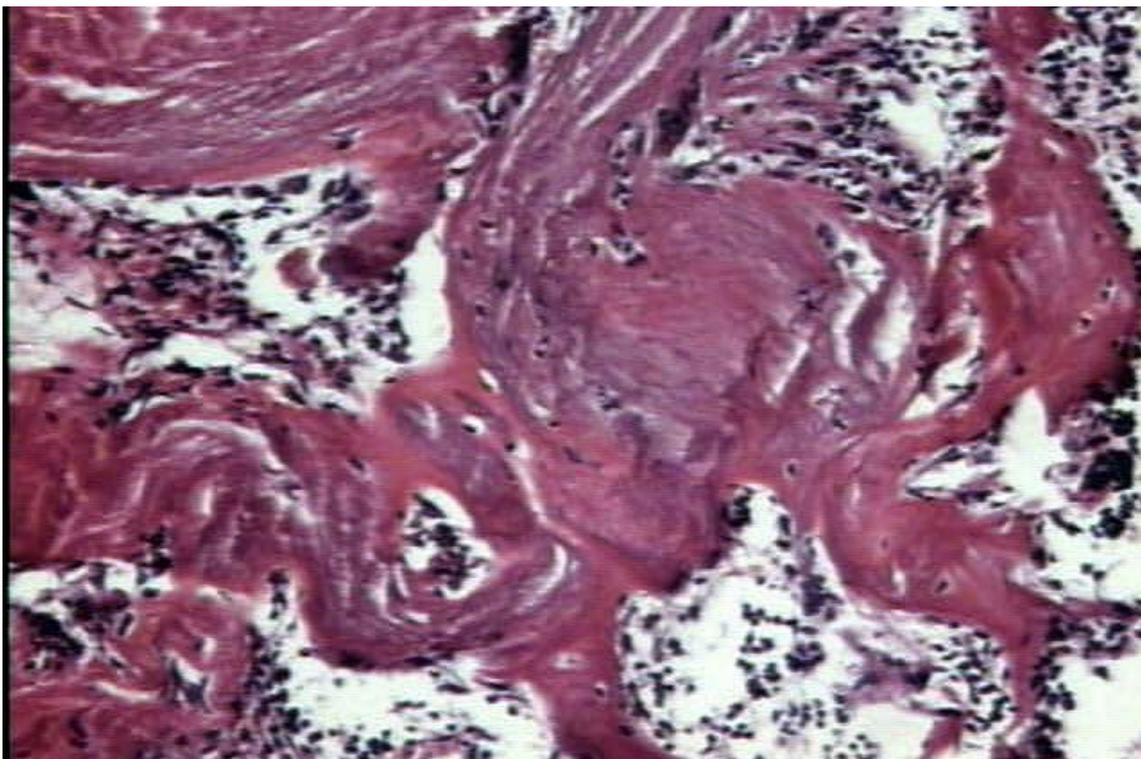


Figura 30 -Grupo 4- 15 dias. RM: Tecido ósseo neoformado no interior do tendão implantado (central) (HE, 100X).

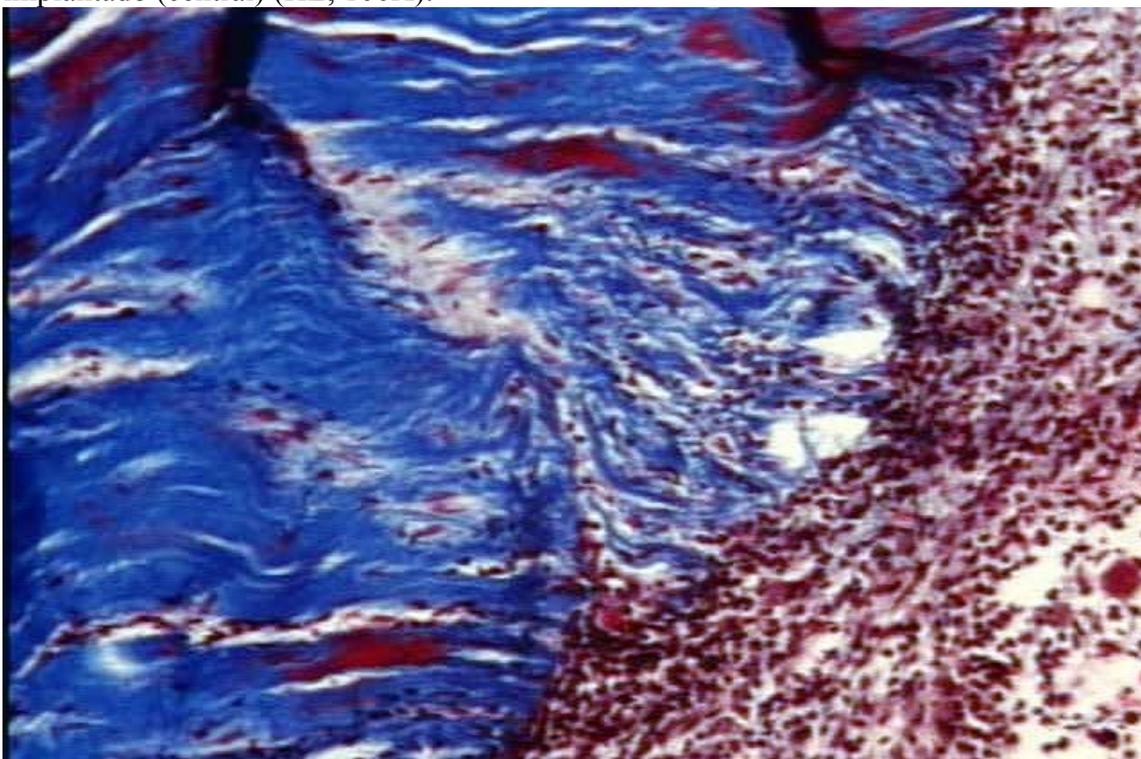


Figura 31 -Grupo 4- 15 dias. RM: transição entre tendão (esquerda) e medula óssea hematopoiética (direita). (TM, 100X).

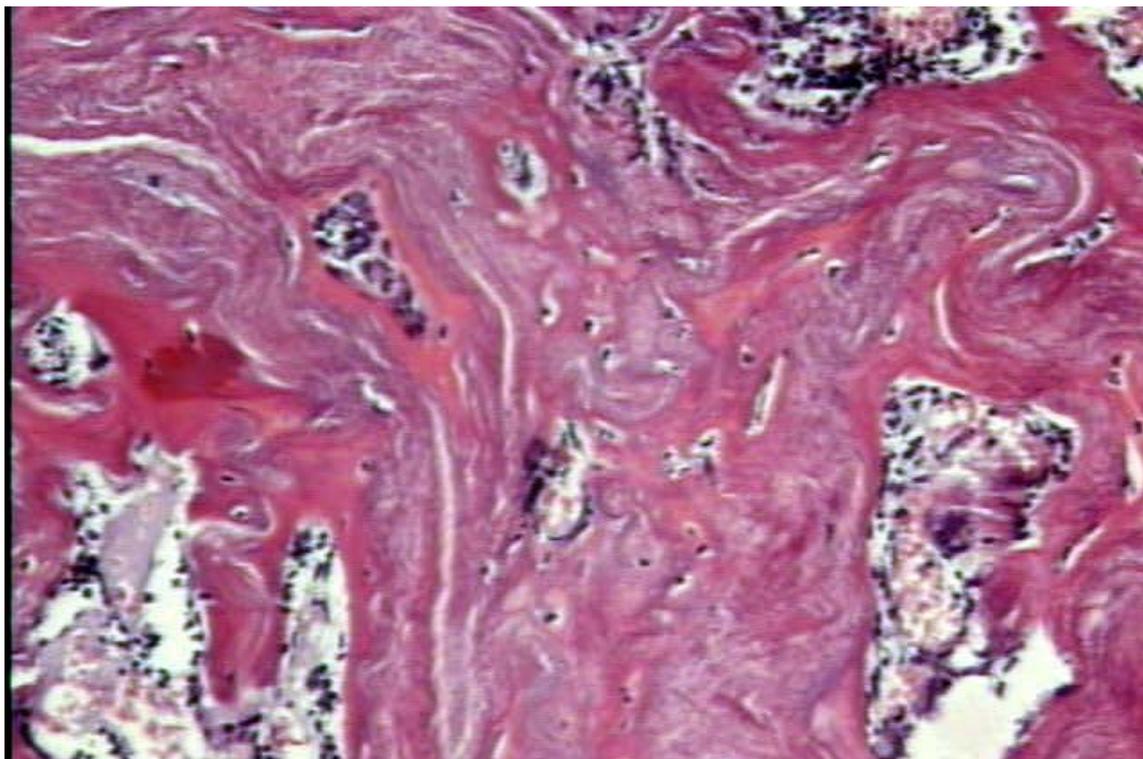


Figura 32 -Grupo 4- 30 dias. RM: Neof ormação óssea no interior do tendão (áreas mais acidófilas) (HE, 100X).

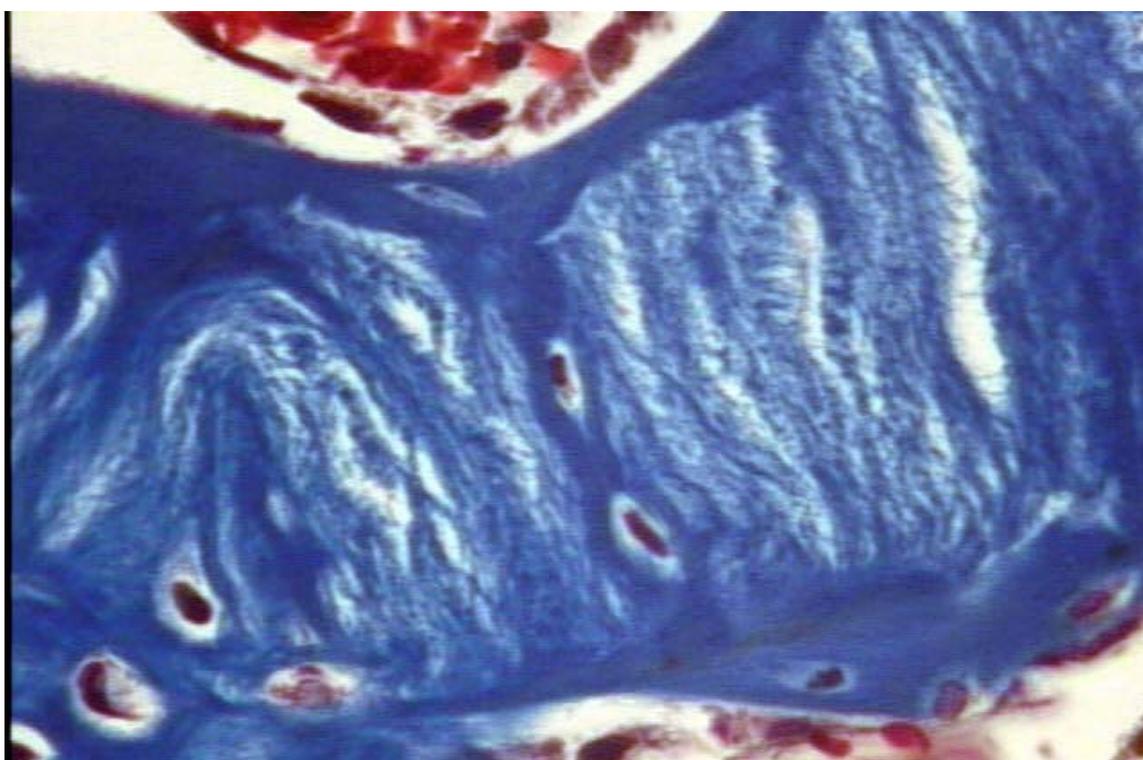


Figura 33 -Grupo 4- 30 dias. RM: Neof ormação óssea sobre as fibras colágenas tendíneas (TM, 400X).

4- DISCUSSÃO

4- DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram claramente a neoformação óssea dentro de uma matriz tridimensional de colágeno aniônico, obtido através de hidrólise de pericárdio e tendão bovino fresco. Com isso, o biomaterial concorda com o princípio de que as matrizes artificiais, de natureza sintética ou derivada de materiais naturais, independentemente da sua origem, possuem a capacidade de sustentar o crescimento celular^(13,14).

O colágeno é reconhecido como um biomaterial de destaque no campo das matrizes utilizadas em engenharia do tecido ósseo, por ser vantajoso nas suas propriedades físicas, químicas e biológicas, melhoradas através de modificações químicas^(8,42,43,44).

O processo de hidrólise proporcionou completa remoção de células das matrizes. A presença das células é uma das principais causas de insucessos de sua aplicação, gerando calcificação distrófica, intensa resposta inflamatória e reação de corpo estranho. Os resultados demonstraram ausência de calcificação distrófica e reação de corpo estranho, além de baixa resposta inflamatória inicial, confirmando a remoção de células através de hidrólise⁽⁴²⁾.

Essas reações poderiam gerar uma cicatriz tecidual ou aumento do defeito ósseo. A eventual presença de mineralização distrófica é associada com a atividade de células gigantes, causa freqüente de fracassos no uso clínico de próteses de valvas cardíacas, vindas de pericárdio bovino pré-tratado com glutaraldeído^(21,22,53).

Além disso, a hidrólise proporciona a abertura de espaços, criação de canais e poros, que transformam a densa estrutura do colágeno bovino numa estrutura tipo esponja, favorecendo a migração celular, observada nesse estudo, concordando com pesquisas que utilizaram o tratamento^(14,42,51,52). O material compacto retarda o processo de reparo porque precisa ser reabsorvido primeiramente. O tamanho dos poros usualmente está associado com a interconexões entre eles, os quais poderão ser aumentados com poros maiores, permitindo migração do tecido para o interior do implante.

As matrizes usadas nesse estudo, independente do tamanho dos poros, têm uma contínua e interconectada rede de poros, que proporcionou a migração celular de eritrócitos e osteoblastos para o interior do implante, como observado por Rocha et al.⁽⁴²⁾. Como os enxertos ósseos são avasculares e dependem de difusão, essa repopulação celular, vista já com 7 dias de implante, impede que em grandes defeitos o enxerto possa

ser reabsorvido antes que a osteogênese estivesse completa^(2,3), sendo uma das características primordiais do enxerto que a sua velocidade de degradação seja compatível com aquela de crescimento do tecido para o qual serve de suporte^(1,6,7,8).

Além disso, a resposta inflamatória observada no Grupo 1, onde a cavidade cirúrgica foi preenchida apenas de coágulo, foi similar aos Grupos 2, 3 e 4, que receberam implante de colágeno aniônico. Todo biomaterial gera uma resposta inflamatória no hospedeiro. Essa resposta geralmente estende por um período de tempo maior do que aquela vista num reparo de cavidade preenchida somente de coágulo, que utilizada nesse estudo, proporcionou a determinação do papel das matrizes de colágeno na fase inflamatória do processo de cicatrização^(31,42).

A rápida osteogênese, com a integração do enxerto ao leito receptor, num curto período de tempo, é uma clara vantagem do colágeno aniônico em relação a outros biomateriais, concordando com Rocha et al.⁽⁴²⁾ e Rosa et al.⁽⁵³⁾.

Outro fato favorável ao colágeno aniônico, como relatado pelos autores acima, foi de que aos 30 dias, apesar de uma moderada degeneração das fibras colágenas do enxerto, não se encontrou evidência de reabsorção do implante, sugerindo incorporação do material pelos tecidos

ao redor, e uma eventual reabsorção deve estar associada com a remodelação durante o processo de reparo.

O processo de hidrólise aplicado ao colágeno de pericárdio e tendão bovino produz colágeno aniônico: matrizes de elastina com diferentes densidades de carga negativa como um resultado da hidrólise de carboxamida para grupo carboxílico. Esses materiais são caracterizados pela valorização das propriedades dielétricas as quais são conhecidas para promover a osteogênese^(51,52,53).

O processo de hidrólise da asparagina e glutamina causa modificações no tendão e pericárdio nativos, tornando as matrizes acelulares e com habilidade para permitir o crescimento ósseo. Os osteoblastos, depositados na própria matriz do sistema de armação, demonstram a vantagem do colágeno aniônico sobre outros biomateriais, que precisam ser antes reabsorvidos, para posterior crescimento ósseo. Essa migração celular acompanhou o arranjo das fibras colágenas de início, adquirindo uma arquitetura multidirecional crescente. Provavelmente o osteoblasto é atraído pela densidade de cargas negativas e inclusão de fatores de crescimento^(42,49).

A biocompatibilidade de biomateriais está intimamente relacionada com o comportamento celular em contato com ele e

particularmente com a adesão celular sobre a superfície. Características da superfície do material, em relação a sua topografia, química e energia, formam uma parte essencial na adesão dos osteoblastos sobre os biomateriais. É essencial para a eficácia de um implante ortopédico ou dental a estabilização através de uma interface mecânica sólida com fusão completa entre a superfície do material e o tecido ósseo, sem tecido fibroso entre eles. A matriz extracelular do osso é composta 90% de proteínas colagênicas (colágeno tipo I 97% e tipo V 3%) e de 10% de proteínas não-colagênicas (NCP). Todas essas proteínas são sintetizadas através dos osteoblastos e a maioria delas envolvidas na adesão. Algumas dessas proteínas possuem propriedades quimiotáticas ou adesivas, principalmente por conterem a seqüência Arg-Gly-Asp (RGD), que é específica para a fixação de receptores da membrana celular⁽⁴⁹⁾.

A nova carga elétrica do colágeno poderia afetar o comportamento das células e a distribuição dos componentes extracelulares do tecido. Primeiramente, as cargas modificam a montagem das fibras colágenas, alterando o modo de amarração nos locais que são expostos ao meio tecidual. Os osteoblastos são conhecidos por atacarem diretamente o colágeno através do sítio de interação RGD (Arg-Gly-Asp). É possível que o rearranjo tridimensional do colágeno poderia ter afetado a distribuição

dos locais de RGD na nova configuração macromolecular das matrizes. Em segundo, o contato com essas cargas pode causar nas células uma série de modificações eletrostáticas, afetando assim o metabolismo das células em contato com as moléculas de colágeno aniônico.

Já tem sido visto que osteoblastos em cultura sobre um substrato de cargas negativas misturadas com cargas positivas mostrarem características morfológicas compatíveis com metabolismo ativo quando em contato com cargas negativas e um aspecto inativo quando em contato com cargas positivas. Além disso, é conhecido que o substrato de cultura celular precisa de um certo número de cargas negativas para permitir adequada adesão celular e propagação.

A presença de grupos carboxílicos é controversa, desde que culturas celulares sobre substrato com esse grupo têm mostrado uma pequena difusão e um aspecto inativo. Entretanto, proteoglicanas que fazem parte da interação das matrizes celular-extracelular, são carregadas negativamente na presença dos grupos sulfato e carboxílico. Mas o que deveria ser considerado quando implantados materiais carregados eletricamente é o papel molecular, não somente o grupo isolado contendo cargas elétricas, especialmente quando implantado uma molécula complexa como o colágeno.

Além disso, interações “in vivo” são mais complexas do que “in vitro”. Além do mais, polímeros carregados podem agir como uma matriz provisória, admitindo fatores de crescimento e adesão citoquímica. O gradiente apoptótico dessas substâncias é formado através da ligação em locais de proteoglicanas negativas. Isso pode ser assumido na presença de cargas negativas previamente a síntese da matriz extracelular que poderia permitir a ligação com fatores de crescimento, além de promover migração e diferenciação celular^(42,49).

Nesse estudo observou-se a migração dos osteoblastos para o interior do enxerto, obedecendo inicialmente ao arranjo das fibras colágenas, que se apresentam entrelaçadas na matriz de pericárdio bovino e com disposição paralela no tendão. Com o aumento da formação óssea no interior da matriz, o arranjo passa a ser multidirecional em ambos materiais. No grupo 4, onde o enxerto foi posicionado perpendicular ao longo eixo da tíbia do rato, observou-se já aos 7 dias a mudança no direcionamento do material, já com início de neoformação óssea. Osaki et al.⁽⁵⁴⁾ demonstra uma distribuição bidimensional de orientação das fibras colágenas no calcâneo humano, e sugere que a direção e o grau de orientação estão intimamente relacionadas com a direção e a magnitude do estresse aplicado ao osso, respectivamente.

No estudo realizado por Bromage et al.⁽⁵⁵⁾ utilizou-se osso humano e não-humano, aonde foi possível observar diferenças quanto ao posicionamento do animal em relação ao solo. Em animais de posicionamento semelhante ao rato, ocorre a predominância da deposição do colágeno em orientação longitudinal, tanto nos tecidos primários depositados durante o crescimento, como no osso secundário e remodelado. Provavelmente a orientação longitudinal do colágeno é uma adaptação à tensão e esforços aplicados. O fêmur humano demonstrou uma distribuição preferencial de orientação das fibras colágenas com orientação transversal em áreas correspondentes a alta compressão e longitudinal em áreas de alta tensão. Muitos fatores podem influenciar a orientação das fibras colágenas, como raça, sexo, idade, trajetória do crescimento, estado metabólico e nutricional, estado de saúde ou doença, posicionamento, etc.

Independente do posicionamento do enxerto, os biomateriais utilizados nesse estudo são biocompatíveis e apresentaram intensa formação óssea no seu interior.

A neocortical imatura apresentou formação mais rápida, aos 15 dias pós-operatórios, no grupo 2 (pericárdio), sugerindo sua utilização clínica no recobrimento final de implantes de biomateriais ou mesmo sua única utilização pois, apresentou-se como um material com

potencial de neoformação óssea. A limitação clínica é a sua utilização em grandes defeitos ortopédicos, porque originalmente o pericárdio apresenta pequena espessura.

Nesse caso indica-se o tendão, que apresenta um ótimo padrão nos sentidos de comprimento e espessura, podendo ainda ser obtido em diversas formas e de várias fontes de origem. O tendão, utilizado nos grupos 3 e 4, demonstrou neoformação mais rápida e mais intensa no grupo 4. De acordo com o observado nas lâminas, isso se deve provavelmente a sua forma de inserção no defeito criado cirurgicamente. Quando colocado no sentido perpendicular ao longo eixo da tíbia, as extremidades livres do tendão ficam abertas para o perióstio e para a medular, fontes de elementos celulares indiferenciados, que estimulados diferenciam-se em osteoblastos e promovem a neoformação. Essa forma de colocação do material facilita o acesso das células, inclusive as neovasculares, para o interior do enxerto.

Portanto, as matrizes desse estudo demonstram um grande potencial de utilização clínico, sendo biocompatíveis, promovendo formação óssea e possibilidade de utilização tanto em pequenos defeitos como em grandes defeitos ortopédicos.

5- CONCLUSÕES

5- CONCLUSÕES

Dentro das condições estabelecidas no presente trabalho, é possível concluir que:

- 1- As matrizes implantadas são biocompatíveis.
- 2- Os implantes funcionam como uma matriz tridimensional induzindo a formação de osso, sendo o tendão implantado com orientação das fibras perpendicular ao maior eixo do osso, com maior neoformação óssea.
- 3- A celularidade, inicialmente, acompanha o arranjo das fibras colágenas, adquirindo um arranjo multidirecional crescente, sugerindo que a direção e a orientação estão relacionadas com a direção e a magnitude do stress aplicado sobre o osso.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Braddock M, Houston P, Campbell C, Ashcroft P. Born again bone: Tissue engineering for bone repair. *News Physiol Sci* 2001;16(5):208-13.
- (2) Brown KLB, Cruess RL. Bone and cartilage transplantation surgery. *J Bone Jt Surg Am* 1982;64-A:270-9.
- (3) Enneking WF, Eady JL, Burchardt H. Autogenous cortical bone grafts in the reconstruction of segmental skeletal defects. *J Bone Jt Surg Am* 1980;62-A:1039-58.
- (4) Tiedeman JJ, Garvin KL, Kile TA, Connolly JF. The role of a composite, demineralized bone matrix and bone marrow in the treatment of osseous defects. *Orthopaedics* 1995;18:1153-8.
- (5) Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor site. *J Orthop Trauma* 1989;3:192-5.
- (6) Croteau S, Rauch F, Silvestri A, Hamdy RC. Bone morphogenetic proteins in orthopaedics: from basic science to clinical practice. *Orthopaedics* 1999;22:686-95.
- (7) Harakas NK. Demineralized bone-matrix-induced osteogenesis. *Clin Orthop Rel Res* 1984:239-51.
- (8) Burg KJL, Porter S, Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2000;21:2347-59.
- (9) Deuel TF. In: Lanza RP, Langer R, Chick WL, editors. Principles of

Tissue Engineering. Academic Press; 1997. p.133-49.

(10) Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260:920-926.

(11) Kim BS, Mooney DJ. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends Biotechnol* 1998;16:224-29.

(12) Folkman J, Haudenschild C. Angiogenesis in vitro. *Nature* 1980; 288: 551-56,1980.

(13) Hench LL. Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials* 1998; 19:1419-23.

(14) Widmer MS, Gupta PK, Lu L, Meszlenyi RK, Evans GR, Brandt K, et al. Manufacture of porous biodegradable polymer conduits by an extrusion process for guided tissue regeneration. *Biomaterials* 1998;19: 1945-55.

(15) Langer R, Cima LG, Tamada JA, Wintermantel E. Future directions in biomaterials. *Biomaterials* 1990;11:738-45.

(16) Calvert P. Biomimetic mineralization: processes and prospects. *Mater*

Sci Engineering 1994;69-74.

(17) Shenoy V, Roseblatt J. Diffusion of macromolecules in collagen and in hyaluronic acid, rigid-rod-flexible polymer, composite matrices.

Macromolecules 1995;29:8751-58.

(18) Williams RL, Doherty PJ. A preliminary assessment of poly(pyrrole) in nerve guide studies. J of Materials Science: Materials in Medicine 1994;5:429-33.

(19) Mooney DJ, Sano K, Kaufmann PM, Majahod K, Schloo B, Vacanti JP, et al. Long-term engraftment of hepatocytes transplanted on biodegradable polymer sponges. J Biomed Mater Res 1997;37:413-20.

(20) Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing 1994;971-95.

(21) Delustro F, Dasch J, Keefe J, Ellingsworth L. Immune responses to allogeneic and xenogeneic implants of collagen and collagen derivatives. Clin Orthop 1990;260:263-79.

(22) Valente M, Ius P, Bortolotti U, Talenti E, Bottio T, Thiene G.

Pathology of the Pericarbon bovine pericardial xenograft implanted in humans. *J Heart Valve Dis* 1998;7:180-9.

(23) Probst M, Dahiya R, Carrier S, Tanagho EA. Reproduction of functional smooth muscle tissue and partial bladder replacement. *Br J Urol* 1997;79:505-15.

(24) Achauer BM, Vanderkam VM, Celikoz B, Jacobson DG. Augmentation of facial soft-tissue defects with Alloderm dermal graft. *Ann Plast Surg* 1998;41:503-7.

(25) Van de Putte KA, Urist MR. Experimental mineralization of collagen sponge and decalcified bone. *Clin Orthop Rel Res* 1965;40:48-56.

(26) Urist MR, Wallace TH, Adams T. The function of fibrocartilaginous fracture callus. *JBJS* 1965;47B:304-18.

(27) Urist MR, Silverman BF, Buring K, Dubuc FL, Rosenberg JM. The bone induction principle. *Clin Orthop Rel Res* 1967;53:243-83.

(28) Meinig RP, Rahn B, Perren SM, Gogolewski S. Bone regeneration with resorbable polymeric membranes: treatment of diaphyseal bone defects in the rabbit radius with poly(L-lactide) membrane. A pilot study. *J Orthop Trauma* 1996;10:178-90.

- (29) Crane GM, Ishaug SL, Mikos AG. Bone tissue engineering. *Nat Med* 1995;1:1322-4.
- (30) Peter SJ, Suggs LJ, Yaszemski MJ, Engel PS, Mikos AG. Synthesis of poly(propylene fumarate) by acylation of propylene glycol in the presence of a proton scavenger. *J Biomater Sci Polym Ed* 1999;10:363-73.
- (31) Bennett S, Connolly K, Lee DR, Jiang Y, Buck D, Hollinger JO, et al. Initial biocompatibility studies of a novel degradable polymeric bone substitute that hardens in situ. *Bone* 1996;19:101S-7S.
- (32) Zhang R, Ma PX. Porous poly(L-lactic acid)/apatite composites created by biomimetic process. *J Biomed Mater Res* 1999;45:285-93.
- (33) Zhang R, Ma PX. Poly(α -hydroxyl acids)/hydroxyapatite porous composites for bone-tissue engineering.1. Preparation and morphology. *J Biomed Mater Res* 1999;44:446-55.
- (34) Buchaim RL, Roque DD, Roque JS, Toledo Filho JL, Andreo JC, Okamoto T. Gen-Phos implant in surgical cavities performed in the tibia of rats submitted to experimental chronic alcoholism. A microscopic study. *Rev FOB* 2002;10(1):17-22.
- (35) Granjeiro JM, Taga EM, Fonseca M, Maeda L, Taga MSL, Trebacchetti CR, et al. Características físico-químicas de hidroxiapatita para uso clínico. *Rev Gaúcha Odontol* 1992;40(2):130-4.

- (36) Gregghi SLA, Campos Junior A. Estudo comparativo da biocompatibilidade de materiais cerâmicos diversos em tecido subcutâneo de ratos. *Rev FOB* 1994;2(4):73-81.
- (37) Oliveira DT, Granjeiro JM, Maeda L, Chacon M, Fonseca MA, Taga EM, et al. Hidroxiapatita microgranular: comportamento biológico em tecido subcutâneo de ratos. *Rev Odontol UNESP* 1993;22(2):197-202.
- (38) Urist MR, Mikulski A, Lietze A. Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. *Proc Nat Acad Sci USA* 1979;76:1828-32.
- (39) Urist MR, Mikulski AJ. A soluble bone morphogenetic protein extracted from bone matrix with a mixed aqueous and nonaqueous solvent. *Proc Soc Exp Biol Med* 1979;162:48-53.
- (40) Urist MR, Strates BS. Bone morphogenetic protein. *J Dent Res* 1971;50:1392-406.
- (41) Ripamonti U, Duneas N. Tissue morphogenesis and regeneration by bone morphogenetic proteins. *Plast Reconstr Surg* 1998;101:227-39.
- (42) Rocha LB, Goissis G, Rossi MA. Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. *Biomaterials* 2002;23(2):449-56.
- (43) Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 2000;21:2529-43.

- (44) Du C, Cui FZ, Zhu XD, de Groot K. Three-dimensional nanoHAp/collagen matrix loading with osteogenic cells in organ culture. *J Biomed Mater Res* 1999;44:407-15.
- (45) Puelacher WC, Vacanti JP, Ferraro NF, Schloo B, Vacanti CA. Femoral shaft reconstruction using tissue-engineered growth of bone. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1996;25:223-8.
- (46) Holder Jr. WD, Gruber HE, Roland WD, Moore AL, Culberson CR, Loeb sack AB, et al. Increased vascularization and heterogeneity of vascular structures occurring in poly-glycolide matrices containing aortic endothelial cells implanted in the rat. *Tissue Eng* 1997;3:149-60.
- (47) Mooney DJ, Mazzoni CL, Breuer C, McNamara K, Hern D, Vacanti JP, et al. Stabilized polyglycolic acid fibre-based tubes for tissue engineering. *Biomater* 1996;17:115-24.
- (48) Solchaga LA, Dennis JE, Goldberg VM, Caplan AI. Hyaluronic acid-based polymers as cell carriers for tissue-engineered repair of bone and cartilage. *J Orthop Res* 1999;17:205-13.
- (49) Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 2000;21(7):667-81.

- (50) Alberius P. Role of osteopromotion in experimental bone grafting to the skull: a study in adult rats using a membrane technique. *J Oral Maxillofac Surg* 1992;50:829-34.
- (51) Bet MR, Goissis G, Vargas S, Selistre-de-Araujo HS. Cell adhesion and cytotoxicity studies over polyanionic collagen surfaces with variable negative charge and wettability. *Biomaterials* 2003;24(1):131-7.
- (52) Bet MR, Goissis G, Lacerda CA. Characterization of polyanionic collagen prepared by selective hydrolysis of asparagines and glutamine carboxyamide side chains. *Biomacromolecules* 2001;2(4):1074-9.
- (53) Rosa FP, Lia RCC, Souza KOF, Goissis G, Marcantonio Jr E. Tissue response to polyanionic collagen: elastin matrices implanted in rat calvária. *Biomaterials* 2003;24(2):207-12.
- (54) Osaki S, Tohno S, Tohno Y, Takakura Y. Determination of the orientation of collagen fibers in human bone. *Anat Rec.* 2002 Feb 1;266(2):103-7.
- (55) Bromage TG, Goldman HM, McFarlin SC, Warshaw J, Boyde A, Riggs CM. Circularly polarized light standards for investigations of collagen fiber orientation in bone. *Anat Rec.* 2003 Sep;274B(1): 157-68.

(56) Suzigan S. Alterações anatomopatológicas em biopróteses valvulares cardíacas de pericárdio bovino pós-implante. [Dissertação de mestrado em Ciências da Saúde]. São José do Rio Preto (SP): Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP; 1993.

APÊNDICE

APÊNDICE

Quadro 2 - Resultados microscópicos do grupo controle (G1)

Ratos		7 dias	15 dias	30 dias
Área cirúrgica superficial (ACS)	Área central superficial cruenta	Sangue 2+/5	Sangue -	Sangue -
		Fibrose superficial 4+/5	Fibrose superficial 4+/5	Fibrose superficial 1+/5
		Neocortical -	Neocortical imatura 2+/5	Neocortical madura 3+/5
	Bordas laterais contendo cortical residual (CR)	Calo fibro-ósseo 3+/5 ↓ Fibrose 3+/5 Neoformação óssea 2+/5	Calo fibro-ósseo 3+/5 ↓ Fibrose 2+/5 Neoformação óssea 3+/5	Calo fibro-ósseo 2+/5 ↓ Fibrose 1+/5 Neoformação óssea 2+/5
Região medular (RM) adjacente a ACS	Fibrose	2+/5	-	-
	Reabsorção Óssea	1+/5	-	-
	Infiltrado inflamatório mononuclear	1+/5	1+/5	3+/5
	Vasos congestos	3+/5	5+/5	1+/5
	Osso neoformado	5+/5	4+/5	1+/5
	Lise do osso neoformado	-	1+/5	3+/5
	Osteoblastos	5+/5	3+/5	1+/5
	Osteoclastos	1+/5	2+/5	2+/5

Graduação dos achados microscópicos:

- : ausente

1+/5: raro

2+/5: escasso

3+/5: moderado

4+/5: moderado/acentuado

5+/5: acentuado

Quadro 3 - Resultados microscópicos do Grupo G2 (Pericárdio 12hs)

Ratos		7 dias	15 dias	30 dias
Área cirúrgica superficial (ACS)	Área central superficial cruenta	Sangue -	Sangue -	Sangue -
		Fibrose superficial 1+/5	Fibrose superficial 2+/5	Fibrose superficial 1+/5
		Neocortical -	Neocortical imatura 2+/5	Neocortical madura 3+/5
	Bordas laterais contendo cortical residual (CR)	Calo fibro-ósseo 3+/5 ↓ Fibrose 1+/5 Neoformação óssea 3+/5	Calo fibro-ósseo 4+/5 ↓ Fibrose 4+/5 Neoformação cartilágena- óssea 4+/5	Calo fibro-ósseo 3+/5 ↓ Fibrose 2+/5 Neoformação óssea 3+/5
Região medular (RM) adjacente ao pericárdio implantado	Fibrose	3+/5	-	-
	Reabsorção Óssea	1+/5	-	-
	Vasos congestos	1+/5	3+/5	1+/5
	Osso neoformado ao redor do pericárdio	2+/5 (1+ a 3+)	2+/5 (1+ a 2+)	2+/5
	Lise do osso neoformado	1+/5	-	-
	Osteoblastos	3+/5	2+/5	2+/5
	Osteoclastos	3+/5	2+/5	2+/5
Pericárdio Implantado	Orientação das fibras X maior eixo do osso	Multidirecional	Multidirecional	Multidirecional
	Celularidade (fibrócitos)	2+/5	2+/5	2+/5
	Degeneração das fibras colágenas	3+/5	2+/5	3+/5
	Neoformação óssea nas fibras colágenas	-	1+/5	3+/5
	Infiltrado inflamatório mononuclear	1+/5	3+/5	4+/5
	Sangue entre fibras colágenas	4+/5	-	-
	Fibrose entre as fibras colágenas	-	2+/5	3+/5

Gradação dos achados microscópicos:

- : ausente

1+/5: raro

2+/5: escasso

3+/5: moderado

4+/5: moderado/acentuado

5+/5: acentuado

Quadro 4 - Resultados microscópicos do Grupo G3 (Tendão paralelo 24 hs)

Ratos		7 dias	15 dias	30 dias
Área cirúrgica superficial (ACS)	Área central superficial cruenta	Sangue -	Sangue -	Sangue -
		Fibrose superficial 2+/5	Fibrose superficial 3+/5	Fibrose superficial 1+/5
		Neocortical -	Neocortical imatura 1+/5	Neocortical madura 2+/5
	Bordas laterais contendo cortical residual (CR)	Calo fibro-ósseo 2+/5 ↓ Fibrose 1+/5 Neoformação óssea 2+/5	Calo fibro-ósseo 3+/5 ↓ Fibrose 3+/5 Neoformação óssea 2+/5	Calo fibro-ósseo 2+/5 ↓ Fibrose 2+/5 Neoformação óssea 2+/5
Região medular (RM) adjacente ao tendão implantado	Fibrose	-	2+/5	-
	Reabsorção óssea	-	-	-
	Vasos congestos	2+/5	3+/5	1+/5
	Osso neoformado ao redor do tendão	2+/5	3+/5	2+/5
	Lise do osso neoformado	1+/5	3+/5	-
	Osteoblastos	3+/5	2+/5	1+/5
	Osteoclastos	3+/5	3+/5	2+/5
Tendão implantado com orientação das fibras paralela ao maior eixo do osso	Orientação das fibras X maior eixo do osso	Paralela	Paralela ou multidirecional	Multidirecional
	Celularidade	3+/5	3+/5	3+/5
	Degeneração das fibras colágenas	2+/5	2+/5	3+/5
	Neoformação óssea nas fibras colágenas	1+/5 periférica	2+/5 central	3+/5 anárquica
	Infiltrado inflamatório Mononuclear	1+/5 + LPN	2+/5	3+/5
	Sangue entre as fibras colágenas	- a 2+/5	-	- (c/ vasos congestos)
	Fibrose entre as fibras colágenas	1+/5	1+/5	2+/5

Gradação dos achados microscópicos:

- : ausente
- 1+/5: raro
- 2+/5: escasso
- 3+/5: moderado
- 4+/5: moderado/acentuado
- 5+/5: acentuado

Quadro 5 - Resultados microscópicos do Grupo G4 (Tendão perpendicular 24 hs)

Ratos		7 dias	15 dias	30 dias
Área cirúrgica superficial (ACS)	Área central superficial cruenta	Sangue 1+/5	Sangue -	Sangue -
		Fibrose superficial 1+/5	Fibrose superficial 2+/5	Fibrose superficial 1+/5
		Neocortical -	Neocortical imatura 1+/5	Neocortical madura 3+/5
	Bordas laterais contendo cortical residual (CR)	Calo fibro-ósseo 2+/5 ↓ Fibrose 1+/5 Neoformação óssea 2+/5	Calo fibro-ósseo 3+/5 ↓ Fibrose 3+/5 Neoformação óssea 3+/5	Calo fibro-ósseo 3+/5 ↓ Fibrose 2+/5 Neoformação óssea 3+/5
Região medular (RM) adjacente ao tendão implantado	Fibrose	1+/5	2+/5	-
	Reabsorção óssea	1+/5	-	-
	Vasos congestos	2+/5	2+/5	2+/5
	Osso neoformado ao redor do tendão	3+/5 a 4+/5	2+/5	1+/5
	Lise do osso neoformado	-	2+/5	-
	Osteoblastos	3+/5	3+/5	1+/5
	Osteoclastos	3+/5	3+/5	2+/5
Tendão implantado com orientação das fibras perpendicular ao maior eixo do osso	Orientação das fibras X maior eixo do osso	Multidirecional	Multidirecional	Multidirecional ou paralela
	Celularidade	3+/5	3+/5	2+/5
	Degeneração das fibras colágenas	2+/5	3+/5	4+/5
	Neoformação óssea nas fibras colágenas	- a 4+/5	1+/5	4+/5
	Infiltrado inflamatório mononuclear	2+/5	4+/5 e LPN	2+/5
	Sangue entre as fibras colágenas	-	-	-
	Fibrose entre as fibras colágenas	1+/5	3+/5	2+/5

Gradação dos achados microscópicos:

- : ausente
- 1+/5: raro
- 2+/5: escasso
- 3+/5: moderado
- 4+/5: moderado/acentuado
- 5+/5: acentuado