

## MEMBRANA DE ELASTINA DERIVADA DA CARTILAGEM AURICULAR EM TERAPIAS DE REGENERAÇÃO ÓSSEA

E. A. Galdeano\*, M. R. Cunha\*, A. M. G. Plepis\*\*, V. C. A. Martins\*\*, D. L. Nascimento\*\*, G. R. Santos\*\*\*, M. S. Pettian\*\*\*

\*Laboratório de Anatomia do Centro Universitário Padre Anchieta (Unianchieta), Jundiá/SP, Brasil.

\*\*Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP), São Carlos/SP, Brasil.

\*\*\*Depto. Morfologia e Patologia Básica da Faculdade de Medicina de Jundiá (FMJ), Jundiá/SP, Brasil.

e-mail: eagaldeano@yahoo.com.br

**Resumo:** A pesquisa analisou a regeneração óssea *in vivo*, utilizando membrana de elastina derivada da cartilagem auricular bovina, tratada e mineralizada com fosfato de cálcio. Foram utilizados 24 ratos *Wistar*, submetidos à procedimento cirúrgico para criação de um defeito ósseo na calota craniana e enxertados com o biomaterial. Após 8 semanas, as áreas receptoras foram enviadas para análise laboratorial, obtendo resultados satisfatórios, quanto à osteoindução, osteocondução, sendo biocompatível e biodegradável, mostrando-se um promissor biomaterial em terapias de regeneração óssea.

**Palavras-chave:** cartilagem auricular, regeneração óssea, elastina.

**Abstract:** *The research examined the in vivo bone regeneration using elastin membrane derived from bovine auricular cartilage, treated and mineralized with calcium phosphate. 24 Wistar rats were subjected to surgical procedure to create a bone defect in the calvarial and the grafted biomaterial was used. After 8 weeks, the receptor sites were sent for laboratory analysis, obtaining good results, as the osteoinductive, osteoconductive, being biocompatible and biodegradable, being a promising biomaterial for bone regeneration therapies.*

**Keywords:** *auricular cartilage, bone regeneration, elastin.*

### Introdução

A bioengenharia de tecidos tem conquistado avanços tecnológicos, desenvolvendo biomateriais para enxertia, capazes de substituir tecidos lesados, conferindo suporte para a proliferação celular, estabilidade mecânica e gerar respostas fisiológicas para promover uma adequada regeneração tecidual. Enxertos autógenos são amplamente utilizados em casos de perda de massa óssea, causadas por traumas e patologias. Apesar de possuir células osteoprogenitoras capazes de estimular a formação óssea, este recurso apresenta algumas desvantagens, como morbidade, dor crônica do sítio doador, reabsorção óssea, necessidade de dois

procedimentos cirúrgicos e formação irregular do contorno ósseo na área receptora [1, 2, 3].

Neste contexto, a matriz de elastina derivada da cartilagem auricular bovina e mineralizada com fosfato de cálcio, pode ser uma alternativa promissora nas terapias de regeneração óssea [1]. A elastina é uma importante proteína da matriz extracelular que promove elasticidade a vários órgãos. Suas fibras são compostas por micro fibrilas, que agem como uma armação, onde a elastina amorfa é depositada através de ligações cruzadas, formando um arcabouço tridimensional [4,5].

A elastina presente na cartilagem auricular possui fibras orientadas em forma de favo, favorecendo a permeabilidade celular [4]. Entre os mamíferos, as sequências das cadeias moleculares da elastina foram altamente conservadas ao longo da evolução, portanto, se associadas aos processos de tratamento alcalino e mineralização, estas excluem efeitos deletérios do processo de enxertia e acionam a cascata correta de eventos biológicos necessários para a regeneração tecidual, contudo, a degradação da elastina, pode influenciar nas respostas celulares, devido sua capacidade de quimiotaxia, adesão celular, reduzir a formação de fibrose e evitar respostas inflamatórias [5].

Esta proteína possui a sequência de reconhecimento celular, composto pela sequência arginina - glicina - ácido aspártico, além de apresentar biodegradabilidade, permitindo a substituição do enxerto por osso neoformado. A regeneração ainda pode ser acelerada na presença de íons de fosfato de cálcio, exercendo importante papel de sítios de nucleação, aumentando a calcificação [5, 6]. Salienta-se que a mineralização deste biomaterial à base de elastina através da inclusão de fosfato de cálcio possa constituir uma interessante alternativa para a cicatrização do tecido ósseo em função da capacidade de estimular a expressão de proteínas marcadoras da neoformação óssea [6].

Este trabalho tem por objetivo analisar qualitativa e quantitativamente o processo de neoformação óssea, durante o reparo de defeitos ósseos criados em ratos e enxertados com membrana de elastina, derivada da cartilagem auricular bovina tratada e mineralizada com fosfato de cálcio.

## Material e Métodos

### Obtenção da membrana de elastina derivada da cartilagem auricular bovina:

A cartilagem auricular bovina foi lavada com solução de NaCl 0,9%, água, acetona e tratada em NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> à 80°C por 45 min. Ao término desse processo, a matriz obtida foi lavada com água até a neutralidade sendo então liofilizada, denominando-se a matriz de cartilagem auricular tratada (CAT).

A matriz CAT foi mineralizada por imersão alternada, da seguinte forma: **1** - imersa em 60 ml de uma solução 0,2 mol L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> em tampão Tris 0,05 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,4) a 37°C por 30 minutos; **2** - retirada da solução de Ca<sup>+2</sup> e lavada com água desionizada; **3** - imersa em solução 0,12 mol L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> em tampão Tris 0,05 mol L<sup>-1</sup> (pH 9,0) a 37°C por 30 minutos; **4** - retirada da solução de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e lavada com água desionizada. Este ciclo de imersão alternado foi repetido por 6 vezes para obtenção da matriz mineralizada, que após lavagem com água desionizada e liofilização, foi denominada de cartilagem auricular tratada e mineralizada (CATM).

As eletrofotomicrografias da Microscopia Eletrônica por Varredura, evidenciam que o procedimento cria poros na matriz de elastina tratada (CAT) (Figura 1A) e deposição homogênea de sais na superfície da matriz de elastina tratada e mineralizada (CATM) (Figura 1B) [1].

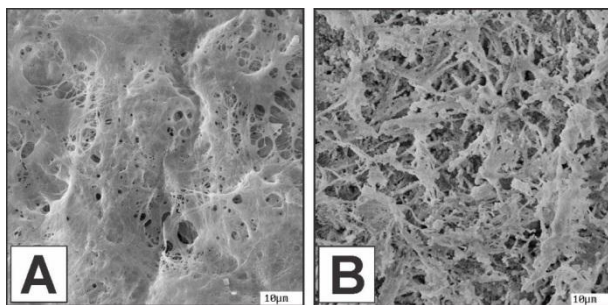


Figura 1: Eletrofotomicrografias da Microscopia Eletrônica por Varredura. A (matriz com porosidade após tratamento-CAT); B (matriz tratada e mineralizada com fosfato de cálcio-CATM). Aumento 1000X.

### Procedimento Experimental e Cirúrgico:

Utilizou-se 24 ratos (*Rattus norvegicus*, Wistar) machos, com 15 semanas de idade, peso médio de 330g e separados em caixas com 4 (quatro) animais, recebendo ração balanceada (Purina®) e água *ad libitum*. A temperatura foi controlada (23 ±1°C) com ciclo claro/escuro de 12/12 horas, respectivamente. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) do Centro Universitário Padre Anchieta, protocolo 002/2012.

Inicialmente, os animais foram anestesiados com a solução anestésica de Dopalen® (Ketamina) - anestésico geral; Coopazine® (Xylazina) - sedativo, analgésico e relaxante muscular, na proporção de 1:1 e

na dose de 0.010mg/10gramas de massa corpórea, via intramuscular [3]. Durante o procedimento cirúrgico, houve a aplicação de soro fisiológico a 0,9% nos olhos dos animais, para prevenir o ressecamento das córneas. Em seguida, foram posicionados em decúbito ventral, para a realização da tricotomia e assepsia da área cirúrgica. A pele foi seccionada sagitalmente e afastada para expor os ossos parietais. O periósteo foi descolado e com uma broca cirúrgica Trefina acoplada a um mini motor (ELTEC LB-100), criou-se um defeito (falha/lesão) de 5mm de diâmetro no osso parietal esquerdo da calota craniana dos ratos, para o implante da membrana (matriz) de elastina conforme Figura 2. Após a cirurgia, o periósteo e a pele foram reposicionados e suturados com fio de seda 6.0 (Ethicon, Johnson & Johnson®) e aplicado antibiótico local Rifamicina Spray® [7, 8].

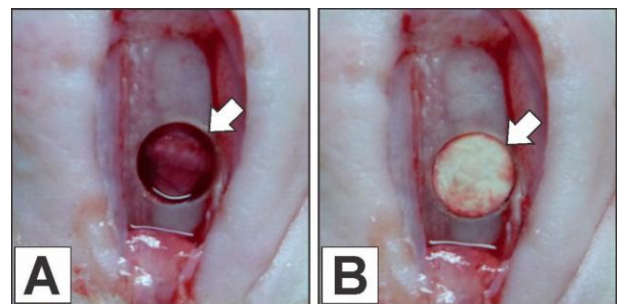


Figura 2: Procedimento cirúrgico para criação de defeito ósseo, na calota craniana de ratos. A (Falha óssea de 5mm de diâmetro, indicada pela seta). B (Falha óssea preenchida com a membrana de elastina).

Na fase pós-operatória, cada animal recebeu uma dose de 0,1mg/100g de peso do antibiótico Pentabiotic Veterinário Pequeno Porte (Fort Dodge®), via intramuscular. Também foi oferecida uma dosagem de analgésico (paracetamol) na dose de 200mg/Kg de peso do animal, via oral, três vezes ao dia [8].

A distribuição ocorreu da seguinte maneira: **G1** (Animais com defeito na calota craniana e sem preenchimento da falha óssea - Grupo Controle); **G2** (Animais com defeito na calota craniana e preenchido com membrana derivada de cartilagem auricular, sem mineralização); **G3** (Animais com defeito na calota craniana e preenchido com membrana derivada de cartilagem auricular e mineralizada com fosfato de cálcio). Cada Grupo obteve 8 animais, que foram eutanasiados 2 meses após a cirurgia experimental. A eutanásia procedeu-se com inalação de gás carbônico (CO<sub>2</sub>), e as calotas cranianas dos animais foram removidas e enviadas para análise macroscópica, histológica e morfométrica. Estereologia foi utilizada para quantificar o volume de osso formado na área receptora de acordo com o princípio de DELESSE, com o uso do retículo quadriculado de 100 pontos. Os valores obtidos foram submetidos ao programa estatístico BioEstat, aplicando os testes ANOVA seguido de Tukey, com nível de significância p<0.05 [3].

### Procedimento Histológico:

As amostras da área receptora do enxerto foram imersas no fixador de medula óssea (Allkimia®) por 10 dias e em seguida no Descalcificador (Allkimia®) por 20 dias. Após este processo, a ação do ácido foi neutralizada por 24 horas em uma solução de sulfato de sódio a 5%. Realizou-se a desidratação em série crescente de álcoois: 70% (*Overnight*), 80%, 85%, 90%, 95% e 100%. As amostras foram colocadas em partes iguais de álcool e xilol (*Overnight*) e diafanizados em xilol, com trocas a cada 2 horas, sendo executadas 3 trocas e finalmente, incluídas em parafina.

De cada amostra obteve-se cortes semi-seriados de 5µm de espessura e corados com os seguintes corantes: *Tricômico de Masson* - Para diferenciação do osso maduro original corado em vermelho e do osso neoformado (jovem/imaturo) que se cora em azul; *Picosirius Red* - Técnica de coloração que aumenta a birrefringência das fibras de colágeno, possibilitando sua identificação, densidade e o tipo de fibra formada.

### Resultados

Nas análises macroscópicas, nenhum dos grupos apresentou sinais de necrose ou processos inflamatórios, indicativos de rejeição imunológica, caracterizando a biocompatibilidade da membrana de elastina, conforme Figura 3.

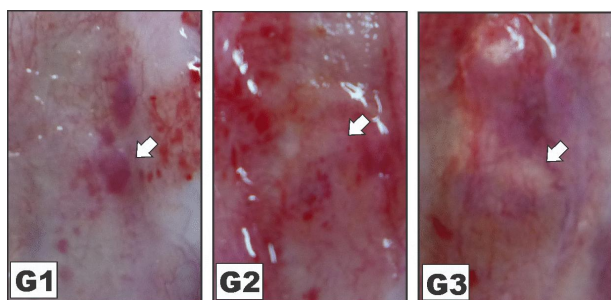


Figura 3: Macroscopia de G1 (Controle) e áreas enxertadas dos grupos G2 e G3, com ausência de sinais inflamatórios. Setas indicam o local do implante.

Na histologia com *Tricômico de Masson*, G1 apresentou predominância em tecido conectivo com discreta neoformação óssea nas bordas da área receptora. Entretanto, em G2 ocorreu abundante neoformação óssea ao longo da extensão do defeito, formando uma espécie de “ponte”, com maciça proliferação e infiltração celular no interior da matriz, formando trabéculas ósseas que alojavam osteócitos, sendo a neoformação, proporcional ao processo de reabsorção do enxerto. Em G3 verificou-se menor neoformação. Figura 4 à Esquerda.

Com a coloração *Picosirius Red*, ficou evidente o acúmulo de fibras colágenas do tipo I nos tons que vão do amarelo ao vermelho, sobre toda a área enxertada, de todos os grupos, porém, maior em G2, que projetou-se

ao longo da matriz e também em seu interior. Figura 4 à Direita.

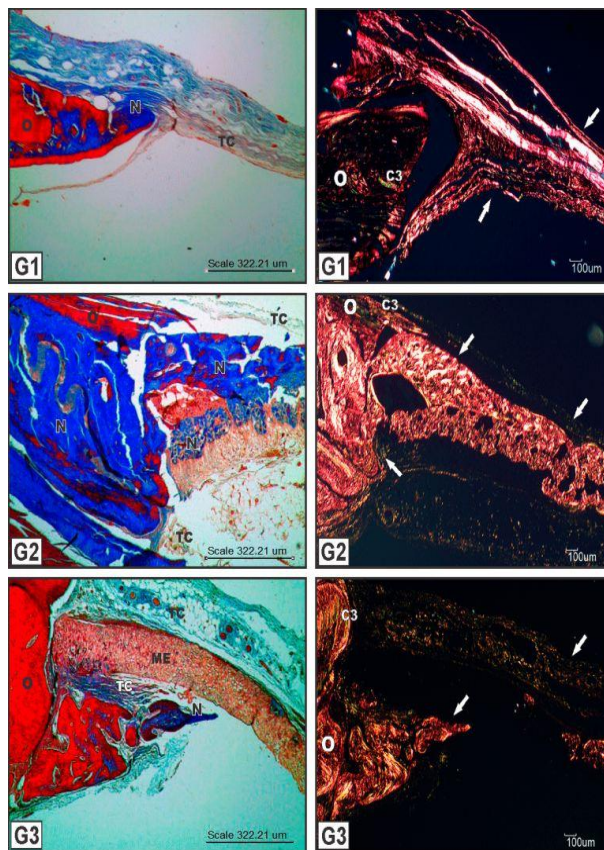


Figura 4: Eletrofotomicrografias de G1 a G3. *Tricômico de Masson* (à Esquerda), O (Osso maduro), N (Osso imaturo / neoformado), TC (Tecido conectivo), ME (Membrana de elastina); *Picosirius Red* (à Direita), O (Osso maduro), C3 (Colágeno tipo III), Setas (Formação de colágeno tipo I). Aumento 4X.

As médias e desvios-padrão do volume percentual relativo de osso neoformado dos grupos G1 a G3 foram  $19.25 \pm 1.5000$ ;  $67.00 \pm 8.8318$ ;  $41.75 \pm 5.3151$ , respectivamente, conforme Gráfico 1.

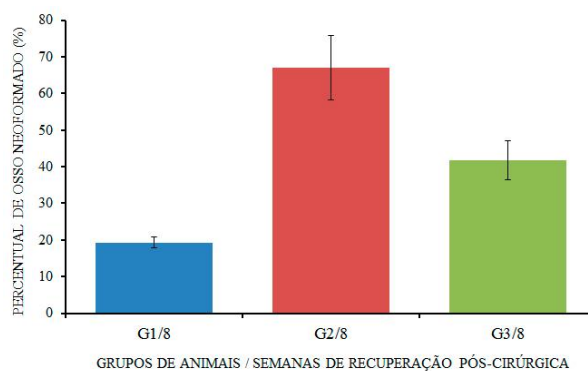


Gráfico 1: Morfometria do percentual de neoformação óssea dos grupos G1, G2 e G3.

## Discussão

Nota-se nesta pesquisa as características necessárias para confirmar a biocompatibilidade das membranas de elastina implantadas no sítio receptor craniano, visto a ausência de sinais de rejeição imunológica, tais como processos inflamatórios, presença de células gigantes indicativas de reação à corpo estranho e rarefações ósseas, indicativas de absorção óssea por processos infecciosos [9]. Além de imunocompatível, o biomaterial deve manter, induzir e restaurar funções biológicas, obter taxa de degradação concomitante à taxa de neoformação óssea, promover adesão e proliferação celular, oferecer suporte para a osteocondução e infiltração de células osteogênicas e garantir estabilidade osso-implante até finalizar a consolidação [10]. Corroborando com estas afirmações, nota-se através das análises macroscópicas, a preservação das membranas de elastina após 8 semanas de pós-cirúrgico, entretanto, em G2 o processo de reabsorção da matriz foi proporcional à neoformação óssea, viabilizando a osteointegração, osteocondução e osteoindução durante a regeneração óssea [2, 3].

A histologia com *Tricrômico de Masson*, evidenciou no grupo G1, um acentuado crescimento de tecido conectivo, enquanto que no grupo G3, o implante permaneceu praticamente intacto, devido à menor formação óssea constatada. Todavia, G2 apresentou biodegradabilidade superior, permitindo a infiltração e diferenciação celular, obtendo uma importante neoformação óssea de aspecto imaturo (corada em azul), que partiu das bordas da área receptora (corada em vermelho) e projetou-se sobre a matriz de elastina em direção ao centro do implante. Foi possível notar trabéculas ósseas no interior do enxerto, que migraram para áreas mais profundas do implante, próximas à dura-máter encefálica, confirmando a permeabilidade e inductibilidade da membrana e deixando evidente, que haveria o fechamento total da falha óssea se o tempo de recuperação fosse maior.

A membrana de elastina mineralizada com fosfato de cálcio (G3), permitiu uma interação osso-implante, predominantemente através de tecido conectivo e a neoformação óssea também margeou a superfície do biomaterial, porém, não permitiu que as células osteogênicas penetrassem em quantidades suficientes para o interior da membrana. Acredita-se que o processo de mineralização com fosfato de cálcio, tenha reduzido o diâmetro dos poros da membrana, dificultado a permeabilidade celular [11].

A técnica histológica *Picrosirius Red*, caracterizou as fibras colágenas, predominantemente do tipo I (coradas em amarelo e vermelho) em todos os grupos. Porém, foi surpreendentemente positiva em G2, com formação e birrefringência satisfatórias, sugerindo que estas fibras ofereceram suporte para a deposição das células osteogênicas ao longo da regeneração, sendo um aliado da neoformação óssea. Houve discreta formação de fibras do tipo III (coradas em tom esverdeado),

indicando que o processo de maturação do tecido se iniciou nas bordas da área receptora.

Com resultados muito satisfatórios quanto à biocompatibilidade, biodegradabilidade, osteocondução e osteoindução, a membrana de elastina derivada da cartilagem auricular bovina, pode ser considerada como um promissor biomaterial a ser utilizado nas terapias regenerativas do tecido ósseo lesado.

## Agradecimentos

Ao Laboratório de Anatomia do Centro Universitário Padre Anchieta de Jundiaí/SP e ao Depto. de Morfologia e Patologia Básica da Faculdade de Medicina de Jundiaí/SP, que forneceram a infraestrutura para os procedimentos experimentais e histológicos, respectivamente. Ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP), campus São Carlos/SP, por desenvolver e fornecer o biomaterial para a pesquisa, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

## Referências

- [1] Nascimento DL, Vulcani VAS, Martins VCA, Plepis AMG. Mineralização de matriz derivada de cartilagem auricular. Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais. 2012; 1(1):1-6.
- [2] König Jr B. Implantologia e osteointegração, quanto à pesquisa em cerâmicas, aplicações clínicas e outros materiais. São Paulo: Editora Rocca; 2010.
- [3] Cunha MR, Gushiken VO, Mardegan Issa JP, Iatecola A, Pettian M, Santos Jr AR. Osteoconductive capacity of hydroxyapatite implanted into the skull of diabetics. The J. of Cranio. Surg. 2011; 22(6): 2048-52.
- [4] Mithieux SM, Weiss AS. Elastin. Advances in Protein Chemistry. 2005; 70:437-61.
- [5] Daamen WF, Hafmans T, Veerkamp JH, Van Kuppevelt TH. Elastin as a Biomaterial for tissue engineering. Biomaterials. 2007; 28(30):4378-98
- [6] Tampieri A, Sprio S, Sandri M, Valentini F. Mimicking natural bio-mineralization processes: A new tool for osteochondral scaffold development. Trends in Biotechnology. 2011; 29(10):526-535.
- [7] Potijanyakul P, Sattayasansakul W, Pongpanich S, Leepong N, Kintarak S. Effects of enamel matrix derivative on bioactive glass in rat calvarium defects. Journal of Oral Implantology. 2010;36(3):195-204.
- [8] Lapchik VB, Mattaraia VGM, Ko GM. Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório. São Paulo: Editora Atheneu; 2009.
- [9] Ratner BD. Biomaterials Science. An int. to Mat. in Medicine. Third edition. Canada: Elsevier; 2013.
- [10] Billström GH, Blom AWB, Larsson S, Beswick AD. Application of scaffolds for bone regeneration strategies. Injury Int. J. Care Injured. 2013; 44:28-33.
- [11] Hannink G, Chris Arts JJ. Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: What is optimal for bone regeneration? Injury Int. Journal Care of the Injured. 2011; 42:22-25.