

ESTUDO EXPERIMENTAL DO REPARO DE DEFEITOS ÓSSEOS CRANIANOS DE RATOS COM BLENDA POLIMÉRICAS DE COLÁGENO, QUITOSANA E HIDROXIAPATITA

M. A. S. Munhoz¹, H. H. Hirata¹, E. G. Machado¹, M. R. Cunha¹, A. M. G. Plepis², S. Yoshioka² e V. C. A. Martins²,

¹ Faculdade de Medicina de Jundiaí, Jundiaí, Brasil

² Instituto de Química de São Carlos

email: masmunhoz@me.com

Resumo: Na clínica ortopédica e traumatológica existem diversos desafios clínicos envolvendo as extensas perdas de tecido ósseo. No tratamento, podem ser utilizados os enxertos autólogos, homólogos e xenólogos, bem como os substitutos sintéticos, conhecidos como biomateriais. Os animais foram submetidos a procedimento cirúrgico para a criação de defeito na calota craniana para o preenchimento do biomaterial estudado. Foram utilizados 15 ratos (*Rattus norvegicus*, *Wistar*), machos, peso aproximado de 330 gramas e 4 meses de idade. A falha óssea do grupo 1 (G1) ficou vazia, grupo (G2) preenchida com blenda polimérica de colágeno e quitosana e grupo 3 (G3) com blenda polimérica de colágeno e quitosana mineralizada com partículas de hidroxiapatita. Cada grupo foi composto por 5 animais. Após a oitava semana pós-operatória os animais foram sacrificados e as calotas cranianas foram retiradas com serra oscilatória para foto documentação macroscópica. Em seguida as amostras foram submetidas aos procedimentos de confecção das lâminas para avaliação histológica da neoformação óssea no local cirúrgico. Os resultados demonstraram a biocompatibilidade dos biomateriais devido a ausência de elementos celulares característicos de processo inflamatório. Houve neoformação óssea trabeculada e adjacente às bordas do defeito ósseo, porém predominou a presença de tecido conectivo na área central.

Palavras-chave: Osseointegração, colágeno, quitosana, hidroxiapatita, regeneração óssea, materiais biocompatíveis.

Abstract: In traumatology and orthopedic clinic there are many clinical challenges involving extensive loss of bone tissue. In the treatment, autologous, homologous and xenologous grafts and synthetic substitutes known as biomaterials can be used. The animals underwent a surgical procedure for the creation of a defect in the skull to fill the biomaterial studied. We used 15 rats (*Rattus norvegicus*, *Wistar*) male, weighing approximately 330 g and 4 months of age. The bone defects of group 1 (G1) was empty, group (G2) filled with polymer blend of collagen and chitosan and group

3 (G3) with polymer blend of collagen, chitosan mineralized with hydroxyapatite particles. Each group consisted of 5 animals. After the eighth postoperative week the animals were sacrificed and the calvaria were removed with oscillating saw to macroscopic photo documentation. Then the samples were subjected to procedures for preparation of slides for histological evaluation of bone formation at the surgical site. The results demonstrated the biocompatibility of the biomaterials due to the absence of characteristic cellular elements of inflammation. There was new bone formation and trabecular bone adjacent to the edges of the defect, however, the predominant presence of connective tissue in the central area.

Keywords: Osseointegration, collagen, chitosan, hydroxyapatite, bone regeneration, biocompatible materials.

Introdução

Existem vários procedimentos cirúrgicos no tratamento das lesões ósseas extensas, porém estão usualmente estabelecidos o transporte ósseo e a distração osteogênica, além dos diferentes tipos de enxertos ósseos autólogos e a osteossíntese interna e externa [1,2,3]. Outros recursos também estão disponíveis, como a utilização de células mesenquimatosas e osteoprogenitoras, aspirado de medula óssea, homoenxertos, fatores de crescimento ósseo e vascular, selantes, proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), xenoenxertos e enxertos periostais [4,5, 6,7,8]. Como alternativa, também podem ser favoravelmente utilizados os substitutos ósseos sintéticos conhecidos como biomateriais, visto a sua biocompatibilidade e osteocondutividade. Assim, várias substâncias naturais ou fabricadas vêm sendo exploradas pela Engenharia Tecidual na tentativa de desenvolver o melhor material que possa rapidamente estimular ou proporcionar um ambiente adequado para o crescimento de um novo tecido ósseo, necessário ao reparo do defeito esquelético, além de reduzir a necessidade do uso de enxerto ósseo autólogo em

grande quantidade [5]

Destacam-se entre os biomateriais os compostos de colágeno, visto ser um componente orgânico natural do osso, bem como o protótipo ideal de uma substância osteocondutora [9, 10].

Algumas modificações nas propriedades químicas do colágeno podem ser necessárias para implementar sua ação no processo regenerativo. Essas alterações incluem o aumento de ligações cruzadas, a associação do colágeno a outros materiais e até mesmo a adição de fatores de crescimento, glicosaminoglicanos e outras moléculas, como a elastina, à sua estrutura. [11, 12]. Adicionalmente, o aumento na carga negativa na molécula de colágeno melhora as suas propriedades de pizeletricidade, sendo essencial para o processo da osteogênese. [12, 13, 14].

Outros polímeros também vem se destacando na bioengenharia óssea, como a quitosana, que permite a adesão e proliferação celular [15].

Quando os componentes de colágeno e quitosana são utilizados em associação, formam as blendas poliméricas, tornando-se uma combinação interessante como método alternativo nas terapias regenerativas [16, 17].

A hidroxiapatita é uma das formas mais estáveis de cálcio e fosfato e está presente no osso como um dos componentes principais (60 a 65%). A cerâmica de hidroxiapatita tem sido utilizada como material de substituição óssea há mais de três décadas [18].

Desta maneira, o colágeno e a quitosana, associada ou não à hidroxiapatita, têm sido bastante utilizados nas terapias reconstrutivas, pois são polímeros biocompatíveis, atóxicos e biodegradáveis, além de possuírem inúmeras propriedades biológicas. [19].

O objetivo deste estudo foi analisar a viabilidade da utilização de blendas poliméricas de colágeno, quitosana e hidroxiapatita no processo de neoformação óssea ocorrida durante o reparo de defeitos provocados experimentalmente na calota craniana de ratos.

Materiais e métodos

Foram utilizados 15 ratos (*Rattus norvegicus*, Wistar) machos com aproximadamente 12 semanas de idade, peso médio de 300g, fornecidos pelo Centro Multi-Institucional de Bioterismo (CEMIB/UNICAMP) e mantidos no biotério da Faculdade de Medicina de Jundiaí.

Obtenção do Gel de Colágeno

Tendão de origem bovina foi lavado com solução salina 0,9% (NaCl) e água destilada, picotado e imerso em uma solução alcalina (hidrólise) por um período de 96 h a temperatura não maior que 25 graus Celsius. Esta solução contém sais (sulfatos e cloretos) e hidróxidos de metais alcalinos e alcalinos terrosos, conforme procedimento usual do Grupo de Bioquímica e Biomateriais do Instituto de Química de São Carlos - USP.

Obtenção do gel de quitosana

Para obtenção da quitosana foi utilizado a β -quitina,

extraída do gládio de lula (*Loligo spp*), obtido em Cananeia – SP, por Miami pescados.

Preparação da Hidroxiapatita (HA)

A síntese da hidroxiapatita foi feita, seguindo o método de JARCHO et al. Preparou-se uma solução de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ pH entre 11,0 e 12,0 com hidróxido de amônio concentrado (Solução I). Preparou-se a seguir uma solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ com pH entre 11,0 e 12,0 (Solução II). A solução de cálcio (Solução I) foi vigorosamente agitada e mantida sob fluxo constante de N_2 , sendo, em seguida, adicionada, lentamente, a solução de fosfato (Solução II), produzindo uma suspensão com precipitado de forma gelatinosa, que foi agitado durante 40 horas à temperatura ambiente, sempre sob fluxo constante de N_2 .

Os animais foram distribuídos em 3 grupos com 5 animais cada, sendo:

Grupo 1 (G1): ratos com falha no osso parietal esquerdo, sem preenchimento de implante (grupo controle). Sacrificados com 8 semanas de pós-operatório.

Grupo 2 (G2): ratos com falha no osso parietal esquerdo, preenchida com blenda polimérica de colágeno e quitosana. Sacrificados com 8 semanas de pós-operatório.

Grupo 3 (G3): ratos com falha no osso parietal esquerdo, preenchida com blenda polimérica de colágeno e quitosana associada à hidroxiapatita. Sacrificados com 8 semanas de pós-operatório.

Após o sacrifício, as calotas cranianas foram retiradas para foto documentação macroscópica. Em seguida, as amostras foram submetidas aos procedimentos histotécnicos de confecção das lâminas para avaliação histológica da neoformação óssea no local cirúrgico com os métodos de análise histológica por microscopia de luz transmitida (ótica) e análise histológica por microscopia de luz polarizada.

A análise morfométrica baseou-se no método de estereologia, o qual permitiu determinar parâmetros tridimensionais de um tecido por meio de contagem de pontos de imagens bidimensionais.

Na análise estatística os valores obtidos do percentual do volume ósseo neoformado foram submetidos ao teste Anova, seguida de Tukey [20,21 e 22].

Resultados

Na análise macroscópica em todos os grupos estudados, não foi observada, na área receptora do implante sinais característicos de rejeição imunológica. Observou-se também a integridade da conformação óssea da região da calota craniana, bem como o contorno definido das margens da lesão óssea e a ausência de calo ósseo visível macroscopicamente.

Histologicamente, houve discreta neoformação óssea em continuidade com as margens da lesão óssea, porém predominou a presença de tecido conectivo na área cirúrgica. As blendas poliméricas apresentaram biocompatibilidade com o tecido receptor, porém com

baixa capacidade osteogênica devido à permanência do defeito ósseo. Não houve a sua osteointegração em virtude da presença de tecido conectivo em grande quantidade e adjacente ao implante (figura 1.).

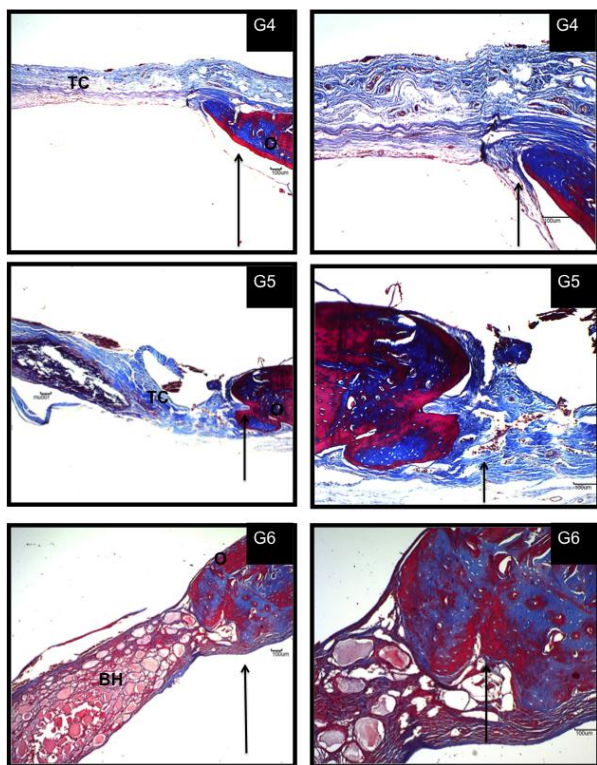


Figura 1. Fotomicrografia da área da lesão craniana dos grupos eutanasiados 8 semanas pós-operatório (G4 a G6). Nota-se osso neoformado (setas) de natureza imaturo e maduro projetando-se da margem do osso original (O) e abundante tecido conectivo (TC) na lesão óssea. Em G6, destaca-se o aspecto compacto da blenda associada a hidroxiapatita (BH). Coloração de Tricrômico de Masson. Aumentos: 4X e 10X.

A análise morfométrica está representada na figura 2.

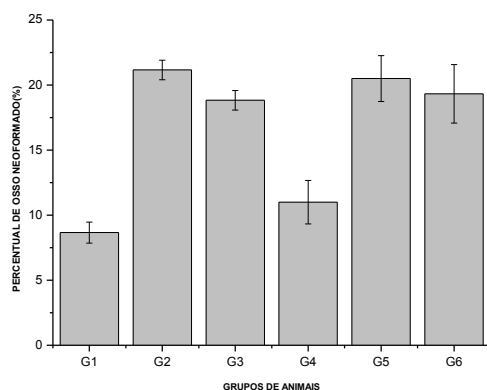


Figura 2. Gráfico da análise morfométrica de G1 a G6 demonstrando o percentual de osso neoformado de cada grupo.

Discussão

Na conceituação moderna, biomateriais não devem ter como função apenas o preenchimento de espaço, mas sim estimular uma resposta biológica específica, a qual depende de algumas propriedades particulares intrínsecas do material, como a distribuição eletrônica, arranjo tridimensional, conformação molecular, propriedades pizoeletricas, porosidade e as propriedades físico-químicas específicas. O desenvolvimento desses biomateriais é baseado nos mecanismos que controlam a função que se deseja substituir e na relação estrutural do material com a propriedade que se pretende obter [23].

A biocompatibilidade das blendas foi evidenciada nas análises macroscópicas e histológicas, enfatizando boas perspectivas de novos estudos no futuro com estes biomateriais.

Fatores extrínsecos também podem influenciar na intensidade da osteogênese em casos de enxertia óssea. Entre eles, destaca-se a origem embriológica do tecido ósseo estudado, sendo que os ossos intramembranosos, como o crânio, são menos osteogênicos, quando comparados ao fêmur e tibia, que são de origem endocondral e apresentam a camada interna do periósteo com células osteoprogenitoras capazes de proporcionar uma maior neoformação óssea [24].

Conclusão

As blendas poliméricas apresentaram biocompatibilidade com o tecido receptor, porém com baixa capacidade osteogênica devido à permanência do defeito ósseo. Não houve a sua osteointegração em virtude da presença de tecido conectivo em grande quantidade na região central do implante.

Referências

- [1] Dimitriou, R.; Jones, E.; McGonagle, D.; Giannoudis, P. V. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Medicine*, v. 9, n.66, p. 1- 10, 2011.
- [2] Karargyris, O.; Polyzois, V. D.; Karabinas, P.; Mavrogenis, A. F.; Pneumaticos, S. G. Papineau debridement, Ilizarov bone transport, and negative-pressure wound closure for septic bone defects of the tibia. *Eur J Orthop Surg Traumatol*. 2013.
- [3] Paley, D., Maar, D. C. Ilizarov bone transport treatment for tibial defects. *J Orthop Trauma*; v. 14, n. 2, p. 76-85, 2000.
- [4] Blokhuis, T. J.; Calori, G. M.; Schmidmaier, G. Autograft versus BMPs for the treatment of non-unions: what is the evidence? *Injury, Int. J. Care Injured*, v. 44, p. 40-42, 2013. Supplement 1.
- [5] Cunha, M. R.; Santos Jr., A. R.; Goissis, G.; Genari, S. C. Implants of polyanionic collagen matrix in

- bone defects of ovariectomized rats. *J Mater Sci: Mater Med*, v.19, p. 1341–1348, 2008.
- [6] Domingos, D. A. Aplicação em cirurgia ortopédica do poder osteogênico do periósteo na infância. *Rev. Bras. Ortop.*, v. 37, n. 10, p. 415-423, 2002.
- [7] Dimitriou, R.; Mataliotakis, G.; Giannoudis, P. V. The role of barrier membranes for guided bone regeneration and restoration of large bone defects: current experimental and clinical evidence. *BMC Medicine*, v. 10, n. 81, p. 1-24, 2012.
- [8] Machado, E. G. Aplicação de um novo selante de fibrina combinado com as proteínas rhBMP-2 (morfofénica recombinante) e P-I (hevea brasiliensis) no reparo de defeitos na tibia de ratos. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Jundiaí, Jundiaí, 2012.
- [9] Bhakta, G.; Lim, Z. X.; Rai, B.; Lin, T.; Hui J. H.; Prestwich, G. D.; Van Wijnen, A. J.; Nurcombe, V.; Cool, S. M. The influence of collagen and hyaluronan matrices on the delivery and bioactivity of bone morphogenetic protein-2 and ectopic bone formation. *Acta Biomater.*, v. 13, p. 347-354, 2013.
- [10] Dawson, E.; Bae, H.; Burkus, J. K.; Stambough, J. L.; Glassman, S. D. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 on an absorbable collagen sponge with an osteoconductive bulking agent in posterolateral arthrodesis with instrumentation. *J Bone Joint Surg Am.*, v. 91, p. 1604-1613, 2009.
- [11] Moreira, P. L.; An, Y. H.; Santos Jr., A. R.; Genari S. C. In vitro analysis of anionic collagen scaffolds for bone repair. *J. Biomed Mater Res.*, v. 71B, p. 229- 237, 2004.
- [12] Moreira, P. L.; Genari S. C.; Goissis, G.; Galembeck, F.; An, Y. H.; Santos Jr., A. R. Bovine osteoblasts cultured on polyanionic collagen scaffolds: An ultrastructural and immunocytochemical study. *J Biomed Mater Res Part B*, v.101B, p. 18– 27, 2013.
- [13] Lacerda, C. A.; Plepis, A. M. G.; Goissis, G. Hidrólise Seletiva De Carboxiamidas De Resíduos De Asparagina E Glutamina Em Colágeno: Preparação E Caracterização De Matrizes Aniônicas Para Uso Como Biomateriais. *Química Nova*, v. 21, n. 3, p. 267-271, 1998.
- [14] Goissis, G.; Piccirilli, L.; Plepis, A. M. G.; Das-Gupta, D. K. Preparation and Characterization of Anionic Collagen: P(VDF/TrFE) Composites. *Polymer Engineering And Science*, v. 39, n. 3, p. 474-482, 1999.
- [15] Moreira, P. L. Avaliação *in vitro* dos processos de proliferação e diferenciação de células osteoblásticas e a mineralização sobre matrizes aniônicas de colágeno para reparo ósseo. Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2005.
- [16] Meinig, R. P.; Rahn, B.; Perren, S. M.; Gogolewski, S.; Bone regeneration with resorbable polymeric membranes: treatment of diaphyseal bone defects in the rabbit radius with poly (L-lactide) membrane. *J. Orthop Trauma.*, v. 10, p. 178-90, 1996.
- [17] Tonhi E.; Plepis A. M. G. Obtenção e caracterização de blendas colágeno- quitosana. *Quím. Nova*, v. 25, n. 6, p. 943-948, 2002.
- [18] Hak, D. J. The Use of Osteoconductive Bone Graft Substitutes in Orthopaedic Trauma. *J Am Acad Orthop Surg*, v. 15, p. 525-36, 2007.
- [19] JARCHO, M. et al. Hydroxylapatite synthesis and characterization in dense polycrystalline form, **J. Mat. Sci.**, p.2027-2035, 1976.
- [20] Locilento, D. A. Preparo, obtenção e caracterização de esponjas quitosana/colágeno para liberação controlada de extrato de semente de uva. Dissertação de Mestrado. Bioengenharia. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.
- [21] Montgotmey, D. C. Desing and analysis of experiments. Ed. John Wiley and Sons, Inc. Canadá, 3.ed., p.649, 1991.
- [22] Noguti, J. Estudo do efeito do ozônio diluído em água na reparação óssea através de avaliação imunoistoquímica. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- [23] Ratner, B. D.; Hoffman, A. S.; Schoen, F. J.; Lemons, J. E. *Biomaterials Science. An introduction to Materials in Medicine*. Third edition. Canada: Elsevier, 2013.
- [24] Camilli, J. A.; Cunha, M. R.; Bertran, C. A.; Kawachi, E. Y. Subperiosteal hydroxyapatite implants in rats submitted to ethanol ingestion. *Arch Oral Biol*; v. 49, n. 9, p. 747–53, 2004.