



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS

GILDÊNIO ESTEVAM FREIRE

**EFEITO DO TRATAMENTO HIDROTÉRMICO COM ESPONJA DE
COLÁGENO IMPREGNADAS COM NANOPARTÍCULAS DE
HIDROXIAPATITA NA PROLIFERAÇÃO E ATIVAÇÃO DE
OSTEOBLASTOS E AVALIAÇÃO DE SUA BIOCAMPATIBILIDADE (*in
vitro/in vivo*)**

FORTALEZA

2018

GILDÊNIO ESTEVAM FREIRE

EFEITO DO TRATAMENTO HIDROTÉRMICO COM ESPONJA DE COLÁGENO
IMPREGNADAS COM NANO PARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA NA
PROLIFERAÇÃO E ATIVAÇÃO DE OSTEÓBLASTOS E AVALIAÇÃO DE SUA
BIOCOMPATIBILIDADE (*in vitro/in vivo*)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Morfofuncionais. Área de concentração: Morfofisiologia óssea e articular.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho
Leitão

Coorientador: Prof. Dr. Júlio Cesar Góes Ferreira

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F933e Freire, Gildênio Estevam.
EFEITO DO TRATAMENTO HIDROTÉRMICO COM ESPONJA DE COLÁGENO IMPREGNADAS
COM NANO PARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA NA PROLIFERAÇÃO E ATIVAÇÃO DE
OSTEOBLASTOS E AVALIAÇÃO DE SUA BIOCAMPATIBILIDADE (in vitro/in vivo) / Gildênio
Estevam Freire. – 2018.
76 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2018.

Orientação: Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão.
Coorientação: Profa. Dra. Júlio Cesar Góes Ferreira.

1. Osteoblastos. 2. Esponjas de colágeno. 3. nanohidroxiapatita. 4. Biocompatibilidade. I. Título.

CDD 611

GILDÊNIO ESTEVAM FREIRE

Efeito do tratamento hidrotérmico com esponja de colágeno impregnadas com nano partículas de hidroxiapatita na proliferação e ativação de osteoblastos e avaliação de sua biocompatibilidade (*in vitro/in vivo*)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Morfofuncionais. Área de concentração: Morfofisiologia óssea e articular.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão

Coorientador: Prof. Dr. Júlio Cesar Góes Ferreira

Aprovado em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão
Orientadora (UFC)

Profa. Dr. Paula Goes Pinheiro Dutra
Examinador interno (UFC)

Prof. Dr. Pierre Basílio Almeida Fachine
Examinador externo (UFC)

Dedico esse trabalho aos meus pais Luciene (*in memoriam*) e Raimundo que sempre foram exemplos e que me ensinaram a valorizar os estudos e tratá-los como um bem maior e intransferível, assim como na formação do meu caráter.

Aos meus irmãos, Gildésio e Rayssa, pelo apoio, paciência e incentivo.

Ao meu sobrinho, Heitor, que sempre encontro um sorriso quando achava que não teria mais forças para continuar.

“No reino dos fins, tudo tem ou um preço ou uma dignidade. Quando uma coisa tem preço, pode ser substituída por algo equivalente; por outro lado, a coisa que se acha acima de todo preço, e por isso não admite qualquer equivalência, compreende uma dignidade.”

Kant

AGRADECIMENTOS

Agradeço, antes de tudo, a Deus por estar sempre ao meu lado e me mostrar que tudo é possível quando se tem fé.

À minha orientadora, Prof^ª Renata Ferreira de Carvalho Leitão, agradeço pela paciência e pelo dom de esclarecer e simplificar as minhas dúvidas e mostrar que todos somos capazes e que é caindo e se levantando que nos fortalecemos. Saiba que tenho uma admiração tanto como ser humano, como professora.

À minha amiga e Prof^ª Antoniella, por ter me convidado a conhecer o NEMPI, onde me fez despertar a vontade de pesquisar e seguir numa possível carreira a docência.

À Prof^ª Gerly Anne de Castro Brito, pelo apoio, e assim, viabilizando a execução deste trabalho.

Ao professor Júlio Góes pela confecção das esponjas testadas neste trabalho e sempre estando disponível a ajudar, assim como o Professor Dr. Pierre Basílio e sua orientanda, e agora Doutora, Elayne Valério pela parceria neste trabalho.

Aos meus grandes amigos, Arthur Cordeiro, Bernardo Aguiar e Mariana Viana que me acompanham e me apoiam desde a graduação.

Às amigas que conquistei durante o mestrado Josy, Dayse, onde sempre pude contar e compartilhar das alegrias e dificuldades. Do pouco que sei hoje, devo muito a elas.

Aos colegas do laboratório, em especial, Alceu, Angelica, Ariel, Beatriz, Cecília, Cintia, Luane, Fátima, Regina, Vanessa e Theídes, que sempre estiveram dispostos a ajudar dentro e fora do laboratório.

Aos estudantes de Iniciação científica, Guilherme, Letícia e Maria Eduarda, pela disponibilidade e ajuda na execução dos experimentos.

Ao laboratório NEMPI e seus colaboradores Sr. Marcos, Laisa, Júnior, Flávia, Sr. Ivan e a todos os professores, agradeço pela disponibilidade e ajuda.

Agradecer ao Sidney Belforf, representante da empresa Critéria em Fortaleza, assim como a empresa que se prontificaram a fornecer as esponjas de colágeno (Lumina-coat, Critéria., Brasil).

Agradecer a empresa Sterigenics, Cotia, São Paulo, Brasil, por esterelizar nossas esponjas e nos isentarem do custo.

A FUNCAP pelo apoio financeiro.

RESUMO

O presente trabalho avaliou o efeito de esponjas de colágeno carregadas com diferentes concentrações de nanohidroxiapatita, desenvolvidas por nosso grupo de pesquisa, em osteoblastos murinos em cultivo celular, assim como a sua biocompatibilidade no dorso de ratos Wistar. A viabilidade e proliferação celular foram avaliadas através do ensaio MTT e imunomarcção para Ki-67, respectivamente, após 24 e 48 horas de incubação dos osteoblastos com as esponjas de colágeno carregadas com concentrações diferentes de nanohidroxiapatita. (CHAP0h CHAP2h e CHAP5h). Osteoblastos incubados com esponjas de colágeno já utilizadas comercialmente (C) e esponjas de colágeno sem hidroxiapatita preparadas por nosso grupo (COL) foram utilizadas como grupos controle. A quantificação dos níveis de fosfatase alcalina óssea (FAO) no meio de cultura após 24h, 48h, 5 dias e 7 dias de incubação foi um dos parâmetros utilizados para investigar a atividade dos osteoblastos, além do ensaio de mineralização pela coloração de Von Kossa, após 21 dias de cultivo celular. Para a investigação dos mecanismos envolvidos na ativação celular, a expressão protéica de BMP-2 foi investigada via Western blot após 7 dias de incubação. A morfologia celular foi avaliada através de microscopia eletrônica de varredura. Nos estudos *in vivo* para a avaliação da biocompatibilidade, investigou-se a resposta inflamatória induzida pela implantação das esponjas no dorso de ratos Wistar machos em diferentes tempos de observação. Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais de 12, 12 e 6 animais, respectivamente, baseados em diferentes períodos de observação (24 horas, 7 e 15 dias), sendo os grupos (1) Controle: esponjas de colágeno comerciais; (2) Esponjas de colágeno produzida pelo nosso grupo; (3) esponjas de colágeno produzida pelo nosso grupo carregadas com nano partículas de Hidroxiapatita. Totalizou-se um número de 30 animais. Considerou-se os seguintes parâmetros: número de células inflamatórias ao redor das esponjas, quantificação das concentrações de mieloperoxidase (MPO) e citocinas IL-1 β e TNF- α nos tecidos coletados através de ELISA e imunohistoquímica, além da quantificação de colágeno, utilizando o *software* image J, no tecido subcutâneo ao redor das esponjas. Após 48 horas de incubação, observou-se, no grupo CHAP5h, aumento significativo do número de células viáveis e Ki-67 positivas. Esse mesmo grupo apresentou mineralização mais intensa comparado aos grupos controle, além de aumento significativo da atividade da FAO e expressão de BMP-2 após 7 dias de cultivo celular. MEV revela a presença de cristais hexagonais de hidroxiapatita com alto teor de fósforo. *In vivo*, o grupo CHAP5h apresentou menor migração de células inflamatórias, quantificada 1 e 7 dias após a implantação, e menor imunomarcção para IL-1 β no 7^o dia, associado ao aumento da síntese de colágeno, avaliado 15 dias após a implantação das esponjas. Os resultados sugerem um efeito positivo do grupo CHAP5h na proliferação, viabilidade e ativação de osteoblastos, possivelmente devido a maior expressão de BMP-2 e atividade da FAO. A associação dos dados *in vitro* e da biocompatibilidade constatada no estudo *in vivo*, sugere fortemente o uso desse biomaterial na regeneração de defeitos ósseos, especialmente defeitos críticos.

Palavras-chave: Osteoblastos, esponjas de colágeno, nanohidroxiapatita, biocompatibilidade.

ABSTRACT

The biocomposites of collagen and hydroxyapatite have been widely used in bone defects treatment, allowing the drug delivery and growth factors, as well as serving as scaffold. They also present osteogenic activity by mechanisms not yet clarified. We evaluated the effect of collagen sponges impregnated with different concentrations of nanohydroxyapatite developed by our research group on murine osteoblasts in culture, as well as the biocompatibility of these materials on the back of Wistar rats. Cell viability and proliferation were evaluated by the MTT assay and Ki67 immunolabeling, respectively, after 24 and 48 hours of the osteoblasts incubation with the collagen sponges impregnated with different concentrations of nanohydroxyapatite (CHAP2h and CHAP5h). Osteoblasts incubated with commercially used collagen sponges (C) and collagen sponges without hydroxyapatite prepared by our group (COL and CHAP0h) were used as control groups. The quantification of bone alkaline phosphatase (FAO) levels in the culture medium after 24h, 48h, 5 days and 7 days of incubation was one of the parameters used to investigate the activity of osteoblasts, besides the mineralization test by Von Kossa, after 21 days of cell culture. For the investigation of the mechanisms involved in cell activation, the protein expression of BMP-2 was investigated by Western Blot after 7 days of incubation. The cell morphology was evaluated by scanning electronic microscopy. In the *in vivo* studies for the evaluation of biocompatibility investigated the inflammatory response induced by the implantation of sponges on the back of male Wistar rats at different observation times. The animals were divided into 3 experimental groups of 12, 12 and 6 animals, respectively, based on different observation periods (24 hours, 7 and 15 days), and the groups were: Control: commercial collagen sponges; (2) Collagen sponges produced by our group; (3) collagen sponges produced by our group carried with nano particles of Hydroxyapatite. A total of 30 animals were added. The following parameters were considered: number of inflammatory cells around the sponges, quantification of myeloperoxidase concentrations (MPO) and cytokines IL-1 β and TNF- α in tissues collected by ELISA and immunohistochemistry, as well as quantification of collagen, through the J image software in the subcutaneous tissue around the sponges. After 48 hours of incubation, we observed a significant increase in the number of viable and Ki-67 positive cells in the CHAP5h group. This same group showed more intense mineralization compared to the control groups, besides a significant increase of the FAO activity and expression of BMP-2 after 7 days of incubation. SEM also reveals the presence of hexagonal crystals of hydroxyapatite with high phosphorus content. *In vivo*, the CHAP5h group showed less migration of inflammatory cells, quantified 1 and 7 days after implantation, and lower IL-1 β immunolabeling on the 7th day, associated with the increase in IL-1 β collagen synthesis, evaluated 15 days after sponge implantation. The results suggest a positive effect of the CHAP5h group on the proliferation, viability and activation of osteoblasts, possibly due to increased expression of BMP-2 and FAO. The association of the *in vitro* data and the biocompatibility found in the *in vivo* study strongly suggests the use of this biomaterial in the regeneration of bone defects.

Keyword: Osteoblast, collagen sponge, nanohydroxyapatite, biocompatibility

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A estrutura hierárquica do osso típico em várias escalas de comprimento.	14
Figura 2: Mecanismo de ação das BMPs.	17
Figura 3. Imagens de esponjas de colágeno.	20
Figura 4. Estrutura tridimensional dos cristais de hidroxiapatita.	21
Figura 5. Micrografias (MET) dos grupos CHAP0h, CHAP2h e CHAP5h, respectivamente Figuras A, B e C, e suas respectivas curvas de distribuição.	23
Figura 6: Processo de fabricação das esponjas.	26
Figura 7: Cultivo de osteoblastos (OFCOOL II)	29
Figura 8: Protocolo experimental in vivo.	37
Figura 9. Efeito de esponjas de colágeno impregnadas com nano partículas de hidroxiapatita sobre a viabilidade e proliferação celular de osteoblastos murinos (ofcol ii) após 24 (a) e 48h (b) de cultivo celular.	42
Figura 10. Efeito de esponjas de colágeno impregnadas com nano partículas de hidroxiapatita sobre a imunomarcção para ki-67 em osteoblastos.	43
Figura 11. Imunofluorência para ki-67 em osteoblastos incubados com esponjas de colágeno impregnadas com nano partículas de hidroxiapatita.	44
Figura 12. Efeito de esponjas de colágeno incorporadas com nanohidroxiapatita sobre a liberação de fosfatase alcalina (FAO) em meio de cultura de osteoblastos incubados durante 24h, 48h, 3 e 7 dias.	47
Figura 13. Imagens representativas do ensaio de mineralização descrito por von kossa em osteoblastos ofcol ii após o período de 21 dias de incubação com esponjas adicionadas ao meio de cultura.	48
Figura 14. Quantificação dos depósitos de cálcio no ensaio de mineralização descrito por von kossa em osteoblastos ofcol ii após o período de 21 dias de incubação com esponjas adicionadas ao meio de cultura.	49
Figura 15. Micrografias da superfície das esponjas de colágeno. Grupo C(A), CHAP0h (B), CHAP2h (C) e CHAP5h (D) antes do teste de viabilidade celular.	50
Figura 16: Análise por EDS. CHAP5h após dias de cultivo análise no MEV (Esquerda) e análise por EDS revelando os cristais marcados (Direita)	51
Figura 17. MEV das esponjas dos grupos C, CHAP0h, CHAP2h, CHAP5h após 24 horas e 7 dias em meio de cultura.	52
Figura 18. Efeito da nanohidroxiapatita na expressão protéica da BMP2.	53

Figura 19. Fotomicrografia do tecido subcutâneo adjacente às membranas corada por H&E	54
Figura 20. Efeito de esponja de colágeno incorporada com nanohidroxiapatita sobre a atividade da mieloperoxidase em tecido subcutâneo adjacente às membranas.	55
Figura 21. Efeito de esponja de colágeno incorporada com nanohidroxiapatita sobre a liberação de citocinas inflamatórias.	57
Figura 22. Fotomicrografia do tecido subcutâneo adjacente às membranas corada por H&E.	58
Figura 23. Efeito de esponja de colágeno incorporada com nanohidroxiapatita sobre a imunomarcagem para IL-1 α em tecido subcutâneo adjacente às membranas.	59
Figura 24. Fotomicrografia do tecido subcutâneo adjacente às membranas corada por Tricromo de Masson.	60
Figura 25. Análise em pixels de colágeno após coloração por Tricromo de Masson.	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNO ₃	Nitrato de prata
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µmol	Micromol
ANOVA	Análise de variância
AKT	Proteínaquinase B
ATP	Trifosfato de adenosin
BSA	Albumina sérica bovina
Ca ²⁺	Íon Cálcio
CO ₂	Dióxido de carbono
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay
EPM	Erro padrão da média
et al	E colaboradores
mg	Miligrama
Min	Minuto
mL	Mililitro
N	Número
°C	Graus celsius
P	Página

PBS	Tampão fosfato-salino
pH	Potencial hidrogeniônico
RPM	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Proteínas em gel de poliacrilamida-SDS
TBST	Tampão salina Tris-HCl suplementado com Tween 20
Zn ²⁺	Zinco
BMP	Proteína morfogenética óssea
OPG	Osteoprotegerina
RANKL	Ligante do receptor do ativador do fator nuclear Kappa B
FAO	Fosfatase alcalina óssea
CaRS	Receptor Sensível de Cálcio
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
WB	Western Blot
PKC	Proteína quinase C
CTM	Célula troncomesenquimal
Col.I	Colágeno tipo I

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Metabolismo ósseo	14
1.3 Biomateriais.....	18
1.4 Esponjas para regeneração óssea guiada	19
1.5 Hidroxiapatita (HAP)	21
1.6 Biomateriais a base de colágeno e hidroxiapatita.....	22
2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	24
3 OBJETIVOS.....	26
3.1 Objetivo geral	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 Síntese de biomateriais	27
4.1.1 Preparação da esponja de colágeno polianiónico.....	27
4.1.2 Preparação das nanoHidroxiapatitas	28
4.1.3 Preparação dos compósitos	28
4.1.4 Esterilização das esponjas.....	29
4.2 Estudo <i>in vitro</i>	29
4.2.1 Biocompatibilidade em culturas de células de osteoblastos OFCOL II	29
4.2.1.1 Cultura de osteoblastos OFCOL II	29
4.2.1.2 Grupos experimentais <i>in vitro</i>	30
4.2.1.3 Teste de viabilidade celular pelo método direto (MTT).....	31
4.2.1.4 Avaliação da proliferação celular por imunofluorescência	31
4.2.1.5 Dosagem de fosfatase alcalina em meio de cultura	32
4.2.1.6 Avaliação da atividade de osteoblastos através da formação de cristais minerais.....	33
4.2.1.7 Análise da superfície das membranas por MEV.....	34
4.2.1.8 Expressão protéica de BMP-2 por Western Blotting.....	34
4.2.1.8.1 Extração de proteínas	34
4.2.1.8.2 Dosagem de proteína	35
4.2.1.8.3 Western Blotting	35
4.3 Estudo <i>in vivo</i>	36

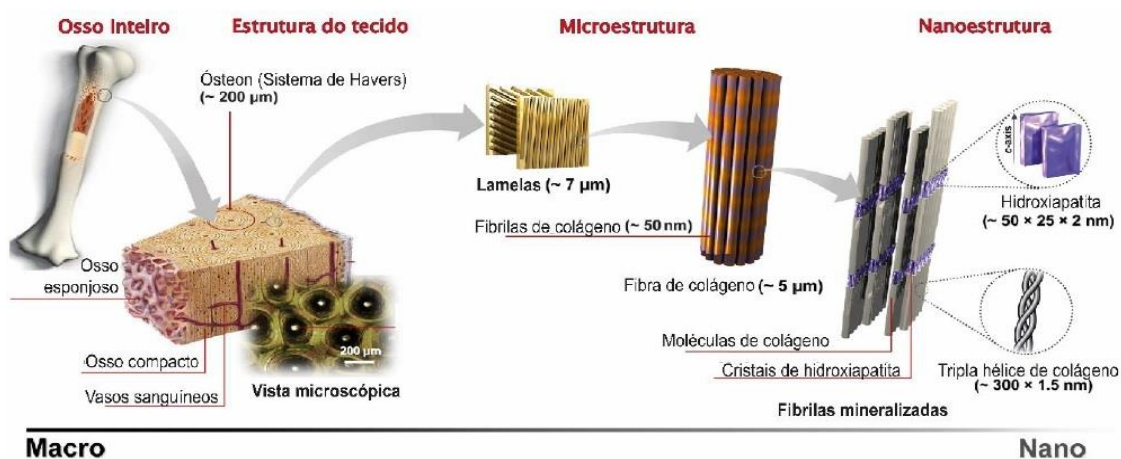
4.3.1	Biocompatibilidade de esponjas de colágeno e impregnadas com nanopartículas de HAp e implantadas em tecido subcutâneo.....	36
4.3.1.1	Aspectos éticos	36
4.3.1.2	Animais	37
4.3.1.3	Modelo Experimental	37
4.3.1.4	Grupos experimentais	37
4.3.1.5	Protocolo experimental em animais.....	38
4.3.1.6	Análise Histopatológica.....	38
4.3.1.7	Atividade de mieloperoxidase (MPO) no tecido subcutâneo adjacente às membranas.....	39
4.3.1.8	Dosagem de citocinas pró inflamatórias (TNF- α e IL-1 β)	39
4.3.1.9	Imunohistoquímica IL-1	39
4.3.1.10	Avaliação da síntese de colágeno.....	40
5	Análise estatística	41
6	RESULTADOS	43
6.1	Avaliação de viabilidade pelo método direto MTT e proliferação celular.....	43
6.2	Atividade de Fosfatase Alcalina no meio de cultura	46
6.3	Estudo da mineralização produzida por osteoblastos incubados com esponjas sem e com nanopartículas de hidroxiapatita	48
6.4	Análise morfológica e adesão celular nas esponjas por MEV	50
6.5	Avaliação da expressão protéica de BMP-2 por osteoblastos incubados com esponjas sem e com nanopartículas de hidroxiapatita	53
6.6	Análise histopatológica do infiltrado celular no tecido subcutâneo adjacente às membranas.....	54
6.7	Atividade de mieloperoxidase (MPO) no tecido subcutâneo adjacente às membranas.....	55
6.8	Dosagem de citocinas TNF- α e IL-1 β no tecido subcutâneo adjacente à membrana.....	56
6.9	Imunohistoquímica para IL-1 β no tecido subcutâneo adjacente às esponjas.....	57
6.10	Análise morfométrica qualitativa e quantitativa de colágeno por image J após coloração com Tricromo de Masson	59
7	DISCUSSÃO.....	61
8	CONCLUSÕES.....	68
	REFERENCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 Metabolismo ósseo

O tecido ósseo é uma forma especializada de tecido conjuntivo formado por células e material extracelular calcificado, a matriz óssea (Figura 1). As células são: os osteócitos, que se situam em cavidades ou lacunas no interior da matriz; os osteoblastos, produtores de matriz orgânica; e os osteoclastos, células gigantes, móveis e multinucleadas que reabsorvem o tecido ósseo, participando do processo de remodelação óssea. A matriz orgânica é extremamente organizada, constituída em sua maior parte por colágeno tipo I, e uma fase mineral formada essencialmente por cristais de fosfato de cálcio, sob a forma de hidroxiapatita. A combinação da fase mineral e da fase orgânica confere ao tecido ósseo propriedades únicas que o tornam muito resistente às solicitações mecânicas (WEITZMANN et al., 2013).

Figura 1. A estrutura hierárquica do osso típico em várias escalas de comprimento.



Fonte: CARVALHO, 2017.

O osso é um tecido multifuncional, metabolicamente ativo, constituído por uma população heterogênea de células, em diferentes estágios de diferenciação celular. Apesar do seu aspecto aparentemente inerte, os ossos são estruturas plásticas altamente dinâmicas que, em condições fisiológicas, permanecem em equilíbrio dinâmico onde desempenham um processo contínuo de renovação e remodelação, sendo, em sua maior parte, decorrente da atividade dos osteoblastos e os osteoclastos, responsáveis pela

formação e reabsorção óssea, respectivamente (PIZAURO, 2002).

Uma série de condições como: idade, ação de medicamentos, alterações osteo-metabólicas, dentre outros, podem alterar esse equilíbrio (PEREIRA et al., 2011).

Os osteoblastos maduros são células sem capacidade de divisão, mas metabolicamente ativas e tem como função a formação óssea. Dentre as proteínas sintetizadas pelos osteoblastos estão o colágeno tipo I e proteínas não colágenas como a osteonectina, a osteocalcina e a sialoproteína óssea, entre outras (MATTHEW et al., 2013). Estas proteínas têm uma importância fundamental no processo de mineralização, ou seja, na ligação dos cristais à matriz colagênica de hidroxiapatita. Além disso, os osteoblastos sintetizam diversos fatores de crescimento, que ficam incorporados na matriz óssea, desempenhando um papel determinante, tanto na formação do tecido ósseo como na diferenciação e na atividade dos osteoclastos. Essas células também participam da calcificação da matriz, através da secreção de pequenas vesículas ricas em fosfatase alcalina, liberadas no interior da matriz extracelular (TSAY et al., 2010).

A remodelação óssea requer que os osteoblastos e os osteoclastos trabalhem orquestradamente para a manutenção da massa óssea (Figura 2). A comunicação entre essas células, portanto, é fundamental para a integridade do osso. A modulação da osteoclastogênese é mediada por osteoblastos através da via RANK/RANKL/OPG (ROSKAMP et al., 2006).

Para iniciar o seu processo de diferenciação, os osteoclastos necessitam da presença de células osteoblásticas (ou de células mesenquimatosas da medula óssea) capazes de produzir fatores de diferenciação e ativação, que incluem, entre outros, o fator estimulador de colônias de macrófagos (Macrophage Colony Stimulating Factor – M-CSF). Os osteoblastos expressam e liberam, ainda, uma proteína transmembranar conhecida por RANKL (ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B). Para que ocorra ativação das células osteoclásticas é necessário que estas desenvolvam em sua superfície, um receptor transmembranar designado por RANK (receptor ativador do fator nuclear kappa B). A interação entre RANKL e RANK leva à maturação dos osteoclastos (ONAL et al., 2012).

Os osteoblastos são responsáveis por sintetizar outra proteína: a osteoprotegerina (OPG), que apresenta alta afinidade para RANKL e atua impedindo ou bloqueando a ligação do RANKL ao seu receptor RANK e, conseqüentemente, inibindo a reabsorção óssea (BOYCE, XING, 2007).

Desse modo, as células da linha osteoblástica podem controlar o desenvolvimento e a atividade osteoclástica em resposta a diferentes estímulos mecânicos, hormonais e inflamatórios. A presença de altos níveis de RANKL promove, portanto, a osteoclastogênese, enquanto que uma maior expressão de OPG resulta em sua diminuição, ou mesmo na apoptose dos osteoclastos (GINALDI; DE MARTINIS, 2016).

1.2 Proteína morfogênica óssea 2 (BMP)

As BMPs são um grupo de proteínas osteoindutoras, com aminoácidos e polipeptídeos arranjados sequencialmente, as quais são capazes de estimular as células-tronco mesenquimais a se diferenciarem em osteoblastos e formarem osso (Figura 2) (ALONSO et al., 2010). O mecanismo de ação da BMP-2 no desenvolvimento da osteogênese sugere que BMP-2 se liga aos receptores de superfície para BMPs, do tipo I e II, nesse instante o receptor do tipo II fosforila o receptor do tipo I. Depois o receptor tipo I, fosforila a proteína Smad-1,5 e 8 presente no citoplasma. Smad-1,5 e 8 fosforiladas se ligam a Smad-4, esse complexo migra para o núcleo e ativam genes envolvidos na osteogênese (JAMES et al., 2016, SALAZAR et al., 2016, BRAGDON et al., 2011). Um desses genes é o RUNX-2 (transcription factor runt-related transcription factor 2), ele é um membro da família de fatores de transcrição RUNXs e codifica uma proteína nuclear com um domínio Runt de ligação ao DNA. Esta proteína é essencial para a diferenciação osteoblástica e morfogênese esquelética e atua como um arcabouço para ácidos nucleicos e fatores reguladores envolvidos na expressão do gene esquelético (Pubmed Gene).

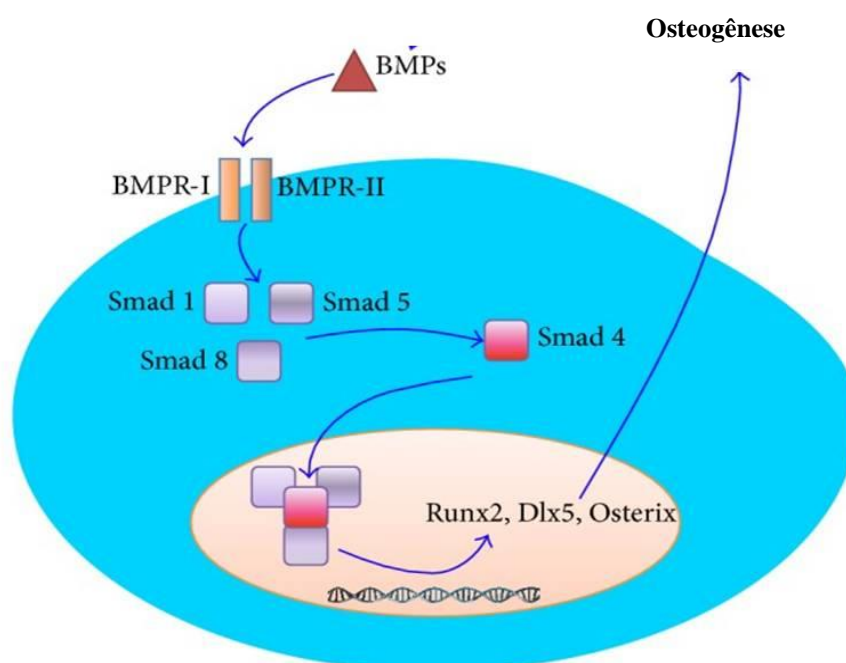
As proteínas ósseas morfogenéticas recombinantes 2 (rhBMP-2) tem mostrado indução de diferenciação dos odontoblastos e formação óssea por ossificação endocondral (SWEENEY et al., 2012).

As análises histológicas de alguns estudos de farmacologia tem caracterizado a cascata de eventos celulares envolvidos no osso da seguinte maneira: 1) Implantação: rh-BMP-2/ACS é implantada; 2) Quimiotaxia: migração de células mesenquimais e outras células formadoras de osso da implantação; 3) Proliferação: rh-BMP2/ACS, as células se multiplicam e se diferenciam; 4) Diferenciação: rh-BMP2/ACS, ligam-se a receptores específicos na superfície das células mesenquimais

para que se diferenciem em osteoblastos; 5) Formação óssea e angiogênese: osteoblastos produzem novo tecido mineralizado dentro da ACS, novos vasos sanguíneos se formam ao mesmo tempo; 6) Remodelação óssea: organismo continua remodelando a formação óssea, resultando em um trabeculado ósseo normal (ELGALI I et al., 2016).

Segundo Hart e Bowles (2012), uma das principais vantagens da utilização da rhBMP-2 é a habilidade de reconstruções de defeitos ósseos sem necessitar de um sítio cirúrgico doador, diminuindo a morbidade cirúrgica. Entretanto, uma importante limitação desta proteína é a falta de estabilidade estrutural associada com o carreador (membrana de colágeno reabsorvível) da rhBMP-2. Para evitar o colapso entre o tecido mole e esponja de colágeno, um dispositivo deve ser usado como barreira para a manutenção do espaço entre as estruturas, onde ocorrerá a indução e a neoformação óssea (SOUMYA et al., 2014).

Figura 2: Mecanismo de ação das BMPs.



Fonte: Adaptado de RAMEL, 2012

1.3 Biomateriais

A perda de um órgão ou de uma parte do corpo gera, além da perda da função, transtornos sociais e psicológicos. Os avanços alcançados na medicina e odontologia modernas têm possibilitado o desenvolvimento de técnicas que geram uma melhor qualidade de vida, e oferece novas opções aos pacientes mutilados. (BANORIYA et al., 2017).

O enxerto ósseo autólogo é considerado o padrão ouro em termos de regeneração, sendo o tratamento mais seguro e eficaz, pois utiliza osso do próprio paciente, fornecendo um substrato natural para novas células osteogênicas no local do enxerto, permitindo a cicatrização e remodelagem do osso lesado (GOMEZ-BARRENA et al., 2011). No entanto, uma grande desvantagem dos auto-enxertos envolve dor e infecção ao redor da área óssea doadora, limitação do volume ósseo doador, apenas 20 cm, e integração incompleta do osso enxertado (DELLOVE et al., 2007). Diferentemente do osso autólogo, os enxertos ósseos alogênicos e xenogênicos estão amplamente disponíveis e não necessitam de cirurgia adicional. A fim de evitar o risco de uma reação imunológica do hospedeiro a estes enxertos, técnicas de processamento tais como liofilização e irradiação são necessárias para remover todas as propriedades imunogênicas. No entanto, acredita-se que essas técnicas influenciam negativamente a sua osteoindutividade e condutividade. As desvantagens acima mencionadas estabeleceram espaço para o desenvolvimento de um grande número de substitutos ósseos sintéticos, assim, a engenharia de tecido ósseo e o uso de biomateriais parecem ser alternativas terapêuticas promissoras para superar essas dificuldades (TIAN et al., 2012).

Os biomateriais para enxertia participam de processos de modelagem, remodelagem e reparação do tecido ósseo a ser formado e estimulado. São três os processos envolvidos na obtenção do osso neoformado e qualquer tipo de enxerto ósseo deve possuir uma das três características para exercer a função regenerativa. O processo de osteogênese é responsável pela formação e desenvolvimento do osso a partir da diferenciação das células mesenquimais. As células osteogênicas levam a formação de osso em tecido mole ou à ativação mais rápida de crescimento ósseo em osso pré-existente. O processo de osseoindução estimula o processo de osteogênese. Os enxertos considerados osteoindutores podem ativar o processo regenerativo do osso, formando e

expandindo tecido ósseo para regiões além do sítio receptor (KRICHELDORF, 2009).

Os biomateriais cerâmicos, tais como: fosfato de cálcio, hidroxiapatita (HA) e fosfato tricálcico (TCP); polímeros sintéticos, tais como: poliestireno, ácido poli-l-láctico (PLLA), policaprolactona (PCL) e ácido poliglicólico; polímeros naturais, tais como: colágeno, glicosaminoglicano, quitosana, ácido hialurônico, brina e elastina e metais como: titânio e magnésio estão sendo usados na fabricação de arcabouços (DAMADZADEH et al., 2010).

O arcabouço a ser utilizado como matriz acelular desempenha um papel central na neoformação óssea e, para isso, necessita compor alguns requisitos básicos, como alta porosidade e tamanho de poro adequado; propriedades de superfície que permitam adesão celular, diferenciação e proliferação; biocompatibilidade e integridade para manter a estrutura de tecido pré-concebida (WANG et al., 2007). Além disso, ele deve ser reabsorvível, evitando, assim, uma segunda cirurgia.

Os fosfatos de cálcio estão entre os materiais utilizados para a reposição e regeneração óssea por apresentarem baixa toxicidade local e respostas inflamatórias. Tais características são explicadas pela natureza química destes materiais que, por serem formados basicamente por íons cálcio e fosfato, participam ativamente do equilíbrio iônico com o fluido biológico (TATHE et al., 2010). Os fosfatos de cálcio são utilizados em uma variedade de aplicações que envolvem o reparo ósseo, incluindo recobrimento de próteses, podendo estar associados a materiais poliméricos, tais como colágeno e polietileno (RODELLA et al., 2011).

Dentre todos os fosfatos cálcicos, a hidroxiapatita, que possui a menor taxa de biodegradação em solução aquosa, ou seja, reabsorção pelo organismo animal, e é o principal constituinte mineral da estrutura óssea, o qual vem sendo amplamente estudada e utilizada em cirurgias de reparação óssea, apresentando bons resultados (PIGOSSI et al., 2015).

1.4 Esponjas para regeneração óssea guiada

Os princípios para regeneração tecidual guiada baseiam-se em criar e manter um ambiente protegido e favorável para as células, impedir que os tecidos incapazes de promover a regeneração entrem em contato com o tecido a ser regenerado e permitir a proliferação das células viáveis para regeneração (LEE et al., 2014). Quando a

regeneração guiada está relacionada ao reparo de estruturas ósseas denomina-se regeneração óssea guiada, a qual favorece a osteogênese restabelecendo as características estruturais e funcionais do tecido ósseo (NGUYEN et al., 2013).

A efetividade das membranas está relacionada aos seguintes critérios: biocompatibilidade, integração aos tecidos adjacentes, estabilidade mecânica e fácil manuseio. Neste contexto, as membranas reabsorvíveis vêm ganhando espaço com o desenvolvimento de novos biomateriais, pois resultados tem se mostrado satisfatórios (DIMITRIOU et al., 2012).

Os polímeros naturais têm como vantagem o reconhecimento biológico, podendo suportar positivamente adesão e função celular. As desvantagens são: possibilidade de imunorejeição e transmissão de patógenos quando os materiais são de origem animal ou de cadáveres, menos controle sobre a degradação e consistência do polímero e pouca resistência mecânica. A reabsorção destes polímeros ocorre por mecanismos celulares, através de reações enzimáticas ou por fagocitose (ELGALI et al., 2016).

As esponjas de colágeno possuem excelente afinidade celular e biocompatibilidade para a regeneração de tecidos (Figura 3). As esponjas confeccionadas de colágeno não mineralizado, no entanto, normalmente possuem baixa resistência e, portanto, são difíceis de manipular, além de apresentarem menor biocompatibilidade com o tecido ósseo animal e humano. As esponjas de colágeno mineralizadas favorecem a regeneração óssea, pois induzem a migração de células indiferenciadas para o local do receptor de enxerto, onde se diferenciam em osteoblastos (KASAJ et al., 2008).

Figura 3. Imagens de esponjas de colágeno.

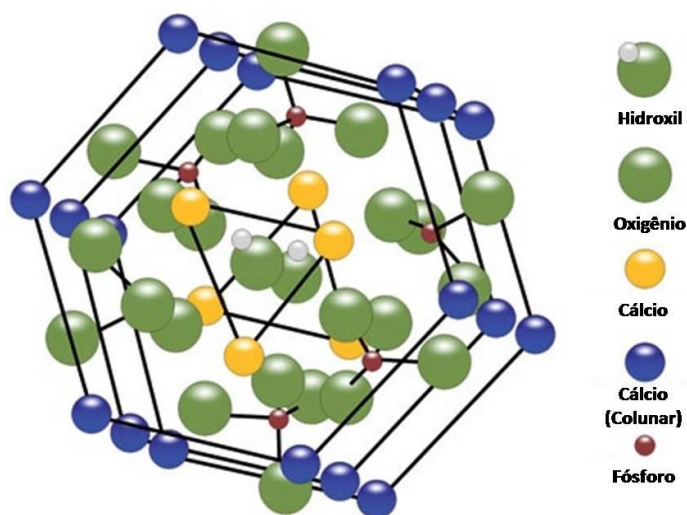


Em regeneração óssea, esses polímeros são empregados como um suporte funcional em conjunto com outras tecnologias, por exemplo, na engenharia tecidual esses materiais podem ser empregados como arcabouços, os quais podem ser semeados com células ou integrados com fatores de crescimento para regeneração óssea, cartilaginosa e de outros tecidos (KIM et al., 2010).

1.5 Hidroxiapatita (HAP)

A HAP estequiométrica é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, com razão Ca/P igual a 1,67 e é o fosfato de cálcio mais estável e o menos solúvel de todos (Figura 4) (COSTA et al., 2009). Ela está presente em ossos e dentes de todos os vertebrados, representando 5% do peso total de um indivíduo adulto. Representa 55% da composição de ossos, 96% da composição do esmalte dentário e 70% da dentina. Dentre todos os fosfatos cálcicos, a hidroxiapatita possui a menor taxa de biodegradação em solução aquosa, ou seja, reabsorção pelo organismo animal (ZHOU et al., 2011).

Figura 4. Estrutura tridimensional dos cristais de hidroxiapatita.



Fonte: <http://www.graphicsbuzz.com/graphics/hydroxyapatite-graphics-e6e2d7.html>

Os materiais à base de HAP de tamanho nanométrico, imitando a dimensão e a composição da fase mineral do osso natural, chamam grande atenção na medicina

regenerativa e na engenharia de tecidos por suas excelentes propriedades de biocompatibilidade, osteointegração e capacidade de atuar como carreadores de fármacos, proteínas e outras moléculas bioativas que podem ser absorvidas ou seletivamente ligadas à sua superfície (PISTONE et al., 2014)

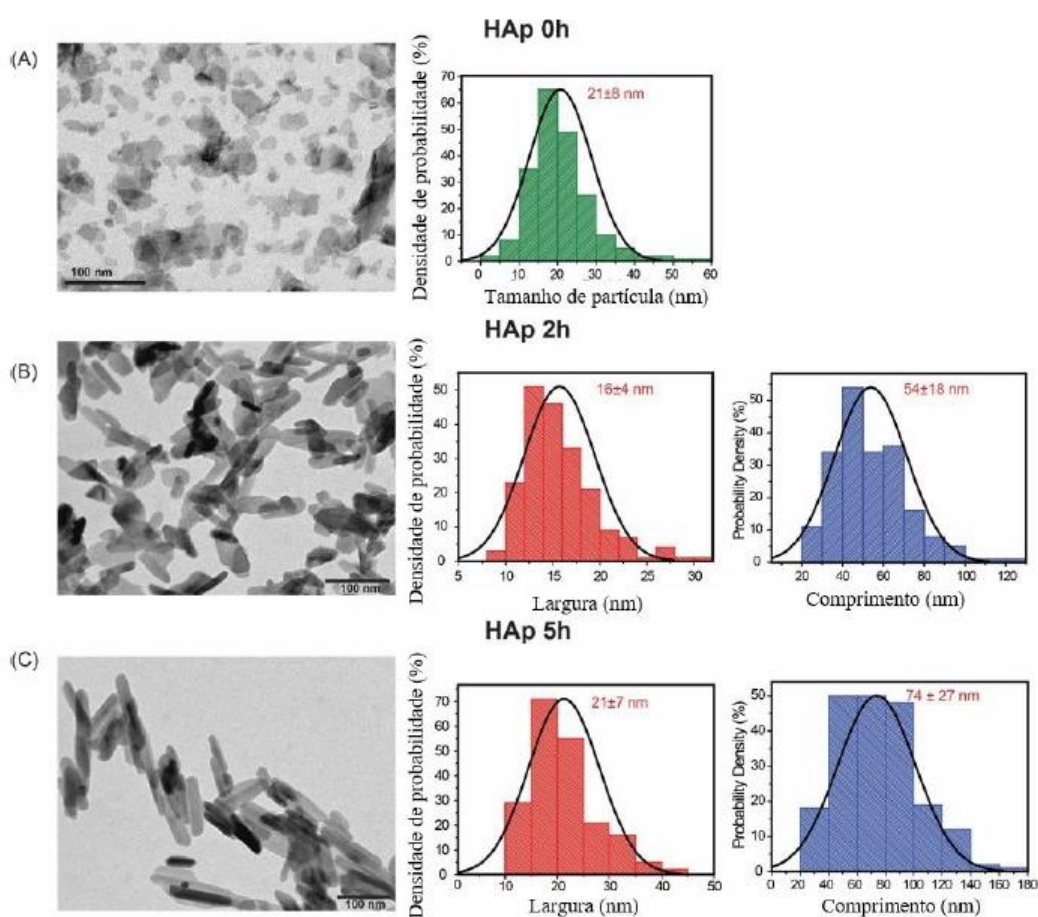
Devido sua significativa semelhança físico-química com os constituintes minerais de ossos e dentes humanos, a hidroxiapatita (HA) demonstrou ser biocompatível e osteocondutora, sendo amplamente utilizada para aplicações ortopédicas, tais como implantes ósseos, revestimentos em implantes metálicos e substitutos ósseos. (HAIDER et al., 2017).

1.6 Biomateriais a base de colágeno e hidroxiapatita

Diante das inúmeras vantagens descritas, os biomateriais a base de colágeno foram associados à hidroxiapatita, intensificando a biomecânica e a bioatividade, pela semelhança estrutural com a matriz extracelular óssea (KANE et al., 2015), fornecendo assim suporte para a adesão e proliferação dos osteoblastos e células mesenquimais indiferenciadas (KANE et al., 2015). Essa união tem apresentado resultados animadores. Estudos têm revelado que a união desses biocompostos apresenta a capacidade de induzir a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos. (LYONS et al., 2010; LYONS et al., 2014, MURPHY et al., 2014). Essa capacidade de induzir a osteogênese na ausência da adição de fatores de crescimento ainda não está bem compreendida. Entretanto, é sabido que a hidroxiapatita nanométrica é capaz de se ligar ao longo das moléculas de colágeno formando fibras e fibrilas (KIKUCHI, 2013). Também temos um biomaterial macroscopicamente único. A hidroxiapatita confere resistência mecânica, a qual protege mecanicamente o osso em regeneração e, por outro lado, seus nanocristais, dissolvidos pela ação dos osteoclastos, fornecem cálcio, fundamental na formação dos cristais de mineralização. Já a parte colágena, funciona como um arcabouço e é responsável pela viscoelasticidade do material. Outra característica importante dessa união é a laminação, ou seja, podemos obter feixes microscópicos desses biomateriais (KIKUCHI, 2013).

Ainda nessa linha de desenvolvimento de novos compósitos a base de colágeno e nanohidroxiapatita, nosso grupo em parceria com o grupo de Química de Materiais Avançados e Laboratório de Telecomunicações e Ciência dos Materiais

(LOCEM) do Departamento de química e física da Universidade Federal do Ceará, respectivamente desenvolveram nanopartículas de hidroxiapatita apresentando uma única fase, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, com sistema cristalino hexagonal (Figura 5). Ainda demonstraram que o aumento do tempo de tratamento hidrotérmico na síntese da nanopartículas contribua para o aumento do comprimento e largura dos nanobastões. Esse comportamento pode ser visto facilmente nas imagens de microscopia eletrônica de transmissão e nas curvas de distribuição para a largura e o comprimento das amostras HAp0h (nanohidroxiapatitas com tratamento hidrotérmico por 0 hora), HAp2h (nanohidroxiapatitas com tratamento hidrotérmico por 2 horas) e HAp5h (nanohidroxiapatitas com tratamento hidrotérmico por 5 horas) são exibidas na Figura. A tendência de crescimento para desenvolver a morfologia em forma de bastão que se estende sobre o tempo de aquecimento foi evidente.



Fonte: CARVALHO, 2017.

Figura 5. Micrografias (MET) dos grupos CHAP0h, CHAP2h e CHAP5h, respectivamente Figuras A, B e C, e suas respectivas curvas de distribuição.

Para a amostra HAp0h, sem tratamento hidrotérmico, observou-se uma morfologia não definida e tamanho de partículas menor em relação às demais amostras sintetizadas (Figura 5A). Em contraste, as amostras HAp2h e HAp5h apresentaram um formato de bastão bem definido (Figura 5B e C, respectivamente). Portanto, a síntese hidrotérmica produziu nanopartículas de hidroxiapatita com forma e tamanho similares aos da HAP do esmalte dentário. Também aumentaram a eficiência da ação anticárie de resinas infiltrantes.

2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Diante dos bons resultados na odontologia, nós buscamos outras aplicações para esse material, por exemplo: a medicina, uma vez que o tratamento de defeitos ósseos na área médica e odontológica é um desafio comum, especialmente quando se trata de defeitos extensos, que demandam grande período de tempo para o reparo, diminuindo as chances de sucesso. Outro fator relevante é o aumento da expectativa de vida, uma vez que os ossos tornam-se mais propícios a sofrer fraturas. No presente estudo, as nanopartículas de hidroxiapatita foram incorporadas a esponjas de colágeno, para a obtenção de um arcabouço para reparo ósseo. Estudos subsequentes de caracterização desses biomateriais revelaram que a estrutura da tripla hélice da molécula de colágeno não foi alterada com a associação da nanohidroxiapatita, apesar de ter sido observado interação entre as nanopartículas de HAP e o colágeno. Ademais, as moléculas de colágeno mantiveram sua estrutura preservada no processo de produção das esponjas. A forma, o tamanho e a cristalinidade dos cristais de hidroxiapatita também foram preservadas, resultando na obtenção de um biocompósito semelhante à matriz óssea extracelular, não apenas na composição, mas também no arranjo estrutural (CARVALHO, 2017). Diante disso, surge a necessidade de realizar estudos *in vitro* e *in vivo*, com a finalidade de avaliar a biocompatibilidade, bioatividade e biodegradação dos biomateriais. Aqui nos propomos a avaliar a biocompatibilidade e a biotividade, em razão de estudos já terem sugerido o possível papel desse biocompósito na atividade osteogênica (MURPHY et al., 2014; KIKUCHI, 2013).

Por fim, este estudo teve como principal objetivo contribuir substancialmente com a área da saúde, com a geração de conhecimento científico de qualidade em um tema de relevância para Saúde Pública do nosso país, com possível

geração de produtos inovadores e patentes de biomateriais para regeneração óssea.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a osteoatividade *in vitro* e a biocompatibilidade *in vivo* de compósitos esponjosos de colágeno e nanohidroxiapatita com diferentes morfologias em tecido subcutâneo do dorso de ratos Wistar.

3.2 Objetivos específicos

1ª Etapa: Efeito das esponjas na proliferação e ativação em culturas de osteoblastos OFCOL II

1. Investigar a viabilidade e proliferação dos osteoblastos murinos incubados sobre esponjas de colágeno, impregnadas com diferentes concentrações de nanopartículas de hidroxiapatita através do ensaio 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT) e imunomarcagem para ki-67;
2. Investigar a influência das esponjas na atividade de osteoblastos, avaliando os níveis de FAO secretados por essas células no meio de cultura e através da deposição de sais de cálcio, detectados pela coloração de VON KOSSA;
3. Avaliar a adesão celular na superfície das esponjas, assim como a formação e composição de minerais, através de microscopia eletrônica de varredura e espectrometria de energia dispersiva de raios-x – EDS;
5. Investigar a participação da BMP-2, através de Western Blotting, na ativação de osteoblastos cultivados sobre as esponjas avaliadas.

2ª Etapa: Biocompatibilidade em modelo de dorso em tecido subcutâneo de ratos

1. Avaliar e quantificar a intensidade de inflamação tecidual desencadeada pelas esponjas, através da contagem de células inflamatórias ao redor das esponjas, dosagem das citocinas IL-1 β e TNF- α , dosagem de mieloperoxidase (MPO) e imunohistoquímica para IL-1 β .
2. Avaliar e quantificar a produção de colágeno e matriz intersticial induzido pelas respectivas esponjas através da coloração dos tecidos coletados com tricoma de Masson.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

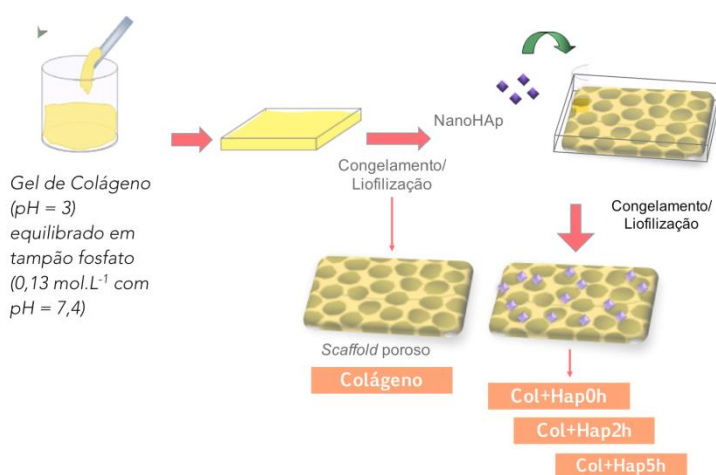
4.1 Síntese de biomateriais

4.1.1 Preparação da esponja de colágeno polianiônico

Todas as esponjas foram produzidas pelo Grupo de Química de Materiais Avançados (GQMAT) do Departamento de Química Analítica e Física-Química e pelo Laboratório de Telecomunicações e Ciência dos Materiais (LOCEM) do Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará.

O colágeno foi preparado por solubilização a partir de serosa bovina após 72 horas de tratamento em condições alcalinas e na presença de sais, seguido de homogeneização em solução de ácido acético, a pH 3,5 (Figura 6). As amostras foram dializadas e levadas a uma concentração final de 1%, determinada pela hidroxiprolina. O gel de colágeno foi preparado equilibrando o colágeno solúvel em tampão de fosfato ($0,13 \text{ mol l}^{-1}$ com pH 7,4) durante 120 horas, seguido de centrifugação (5.000 rpm durante 1 hora). O gel resultante foi vertido sobre moldes acrílico (8x6 cm), congelados em freezer para posterior liofilização (CARVALHO, 2017).

Figura 6: Processo de fabricação dos compósitos colágeno-nanohidroxiapatita.



Fonte: Carvalho, 2017

4.1.2 Preparação das nanoHidroxiapatitas

Foi adicionada uma solução de ácido fosfórico ($0,3 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$) a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (99,67% de pureza - Quimex, Dinamica. São Paulo, Brasil), razão molar Ca/P de 1,67, mexendo à temperatura ambiente. Um precipitado branco foi obtido pela adição de 30% de solução de NH_4OH (99,5% de pureza - Vetec. São Paulo, Brasil) até atingir pH 9.

O precipitado branco foi lavado com água destilada e filtrada a vácuo. Uma parte deste precipitado representava o espécime HAP-0h. Posteriormente, o pó foi disperso em solução de NH_4Cl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com 99,5% de pureza - Vetec e pH 9. A proporção em peso entre o precipitado e a solução foi 1:10. As suspensões foram colocadas em um autoclave de teflon coberto com aço inoxidável para receber o tratamento hidrotérmico a $150 \text{ }^\circ\text{C}$ por: 0 hora (HAP 0h), 2 horas (HAP 2h) e 5 horas (HAP 5h). Finalmente, a amostra foi filtrada a vácuo, lavada e seca a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ por 4 horas e armazenada em dessecador (CARVALHO, 2017).

A síntese seguiu a equação:



4.1.3 Preparação dos compósitos

Os compósitos foram preparados por embebição em dispersões das nanohidroxiapatitas, produzidas por sonicação. A massa de nanopartículas adicionada por amostra corresponde a 30% da massa da esponja do compósito. Foram produzidas 4 amostras:

- Esponja de colágeno (COL) – Esponja de colágeno produzida no QMAT
- Esponja de colágeno-HAP0h (CHAP0h) - Esponja de colágeno com nanoHidroxiapatitas com tratamento hidrotérmico por 0 hora.
- Esponja de colágeno- HAP2h (CHAP2h) - Esponja de colágeno com nanoHidroxiapatitas com tratamento hidrotérmico por 2 horas.
- Esponja de colágeno- HAP5h (CHAP5h) - Esponja de colágeno com nanoHidroxiapatitas com tratamento hidrotérmico por 5 horas.

A esponja já comercializada (Lumina-coat, Critéria., Brasil) com as

seguintes características: orgânica natural derivada da estrutura óssea bovina desmineralizada, composta basicamente por colágeno tipo I, foi utilizada neste estudo como grupo controle.

-Grupo controle (C) - Esponja de colágeno (Lumina-coat, Critéria., Brasil).

4.1.4 Esterilização das esponjas

As esponjas confeccionadas foram recortadas sobre um papel milimetrado em forma de quadrados com proporções de 5x5 mm, acondicionadas em invólucros transparentes, vedados e devidamente separadas de acordo com o seu grupo e enviadas para esterilização por radiação gama (25KGy) (Sterigenics, Cotia, São Paulo, Brasil) (CARVALHO, 2017).

4.2 Estudo *in vitro*

4.2.1 Biocompatibilidade em culturas de células de osteoblastos OFCOL II

4.2.1.1 Cultura de osteoblastos OFCOL II

Foram utilizados osteoblastos murinos (OFCOL II) adquiridos no banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (BCRJ), mantidos em meio de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) contendo 10 % de soro fetal bovino na presença de antibióticos (100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina) a 37°C em estufa umidificada, incubada em atmosfera de 5% de CO₂ (Figura 7). Neste estudo, as células foram utilizadas entre as passagens 16°-30°. A partir do estoque, foi preparada uma garrafa de cultura de 25 cm³, contendo 1ml de células, adicionando-se 4 ml de meio de cultura, DMEM, enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram mantidas em estufa com controle automático de temperatura 37 °C e pressão de CO₂. O crescimento celular foi acompanhado por meio de observação em microscópio invertido (Nikon Eclipse TS100).

Estas células foram subcultivadas após tripsinização quando formada uma monocamada confluenta. Após o período de 3 minutos com 2ml de tripsina a 0,05%, as

células foram retiradas, adicionando-se 6 ml de meio de cultura DMEM suplementado com 10 % de SFB. Em seguida as células foram transferidas para um tubo falcon de 15 ml, centrifugadas (SOLAB SL-701) a 2000 rpm, 4°C por 5 minutos. Após este período, o sobrenadante foi removido e as células ressuspensas com adição de 4ml de meio completo. Deste volume foram retiradas alíquotas de, no mínimo, 1 ml e passadas para novas garrafas. As trocas de meio foram realizadas a cada 48 horas.

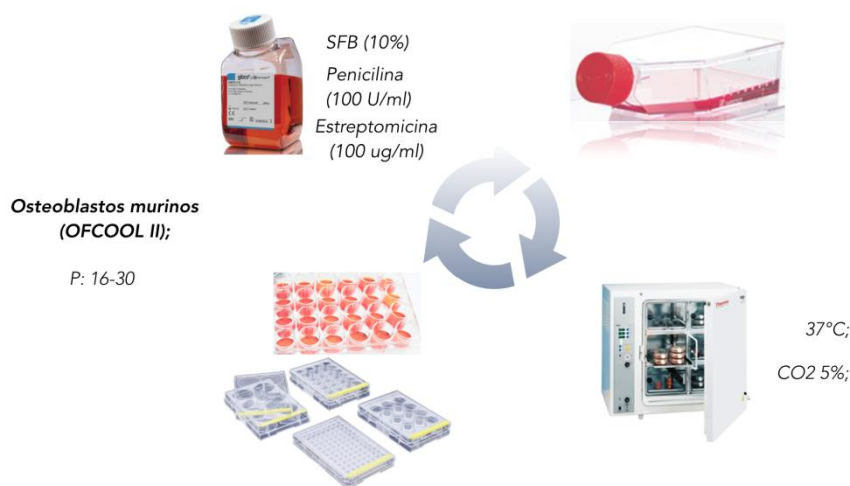


Figura 7: Cultivo de osteoblastos (OFCOOL II)

4.2.1.2 Grupos experimentais *in vitro*

As amostras foram divididas em grupo controle contendo apenas meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina e estreptomicina (meio completo) e com as esponjas de colágeno, e acrescidas previamente de nanopartículas de hidroxiapatita.

- Grupo (DMEM): Células incubadas apenas com o meio de cultura DMEM.
- Grupo controle (C): Células cultivadas sobre esponjas de colágeno comerciais (Lumina-coat, Critéria., Brasil).
- Grupo (COL) - Células cultivadas sobre esponjas de colágeno produzida pelo nosso grupo.
- Grupo (CHAP0h): Células cultivadas sobre esponjas de colágeno produzida

pelo nosso grupo carregadas com nanopartículas de Hidroxiapatita que foram submetidas ao tratamento hidrotérmico a 150 °C por 0h.

- Grupo (CHAP2h): Células cultivadas sobre esponjas de colágeno produzida pelo nosso grupo carregadas com nanopartículas de Hidroxiapatita que foram submetidas ao tratamento hidrotérmico a 150 °C por 2h.
- Grupo (CHAP5h): Células cultivadas sobre esponjas de colágeno produzida pelo nosso grupo carregadas com nanopartículas de Hidroxiapatita que foram submetidas ao tratamento hidrotérmico a 150 °C por 5h.

4.2.1.3 Teste de viabilidade celular pelo método direto (MTT)

O teste de citotoxicidade tem como objetivo avaliar os efeitos letais ou subletais de uma substância ou produto a nível celular. Para esse trabalho, foi utilizado o teste de citotoxicidade pelo método direto com MTT.

Esse teste avalia de forma quantitativa a função mitocondrial através da redução do tetrazolium MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide; Sigma) em cristais de formazana. Essa reação de redução ocorre dentro da mitocôndria através da enzima succinato-desidrogenase, portanto, a quantidade de cristais de formazana está diretamente relacionada com o potencial de redução do tetrazolium MTT nas mitocôndrias.

Para a realização dos testes utilizou-se células OFCOLL II em placas de 96 poços contendo as esponjas e células em quantidade de 100µl de meio de cultura com 3.000 células por poço nos períodos de 24 e 48 horas

Passado os períodos de, 24 e 48 horas removeu-se o meio de todos os poços, mantendo as membranas nos mesmos. Em seguida adicionou-se 100µl por poço de MTT diluído com o meio de cultura completo em uma concentração de 1mg/ml. O MTT foi incubado por 3 horas em uma temperatura de 37°C e 5% de CO₂. Passado esse período, foi extraído 100 µl do sobrenadante e transferido para uma placa de 96 poços e adicionado 100 µl DMSO em cada poço sob agitação de 30 segundos para solubilizar os cristais de formazana. As leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro (Biotek) no comprimento de onda de 590nm.

4.2.1.4 Avaliação da proliferação celular por imunofluorescência

Os osteoblastos foram cultivados na concentração de 3×10^4 células por poço em placas de 24 poços com meio de cultura à temperatura de 37°C e na concentração de 5% de CO₂. Lamínulas de 13 mm foram utilizadas como superfície para fixação de células e esponjas colocadas previamente na placa de cultura e incubado nos períodos de 24h e 48 h de acordo com os grupos.

Após este período de exposição, o meio foi removido e as células juntamente com as esponjas foram fixadas com 500µL de paraformoldeído (PFA) 4% por poço durante 30 minutos. Em seguida, foi utilizada 500µL solução de bloqueio por 1h, seguida da incubação com o anticorpo primário diluído mantido por um período de overnight em refrigeração. Terminado este período, foi adicionado 100µL do anticorpo secundário diluído em solução de lavagem por 1h. Para concluir o ensaio o núcleo das células foi corado com DAPI (1:2000) diluído em PBS 1x por 5 minutos. Todas as etapas foram intercaladas com lavagens sucessivas. Os preparados foram observados em um microscópico confocal (LM710-Confocal-Zeiss), usando filtros seletivos para cada fluoróforo, as imagens foram capturadas com a câmara integrada e processador de imagem, usando uma objetiva de 20x. Para quantificar o número de células positivas marcadas para Ki-67, utilizou-se o programa Image J para obter o número de células imunomarcadas por campo. Foram fotografadas 10 campos por lâmina sendo um total de 4 lâminas por grupo.

4.2.1.5 Dosagem de fosfatase alcalina em meio de cultura

A dosagem de fosfatase alcalina óssea foi realizada com intuito de avaliar a atividade dos osteoblastos por ser um marcador bem estabelecido dessas células. Para avaliação deste parâmetro, amostras dos sobrenadantes do meio de todos os poços foram coletados das placas de cultura de 24 poços após os períodos de 24 horas, 48 horas, 5 dias e 7 dias de exposição das esponjas. Após a coleta, as amostras foram utilizadas para a dosagem de Fosfatase Alcalina Óssea (FAO), utilizando um “Kit” específico, cuja metodologia segue orientação do laboratório fabricante (LABTEST®).

O método está fundamentado na labilidade da isoforma óssea da fosfatase alcalina frente ao calor. Alíquotas de 100 µL da amostra foram incubadas em banho-maria a 56 °C por 10 minutos e imediatamente transferidas para um banho de gelo. A

atividade da fosfatase alcalina não óssea (termoestável) foi determinada diretamente no espectrofotômetro em temperatura de 30 °C com leitura das absorbâncias em 405 nm, tendo como substrato o p-nitrofenilfosfato. A fração óssea, por sua vez, foi determinada indiretamente subtraindo-se a atividade obtida de fosfatase alcalina termoestável da fosfatase alcalina total ((MOSS; WHITBY, 1975).

4.2.1.6 Avaliação da atividade de osteoblastos através da formação de cristais minerais

Com o intuito de investigar o comportamento das esponjas no processo de mineralização pelos osteoblastos, observou-se também a formação de nódulos mineralizados através do ensaio de Von Kossa. Nesse ensaio, as trocas do meio de cultura aconteciam a cada 48 horas. Os grupos analisados foram semeados em quadruplicata em placas de 12 poços, a uma concentração de 3×10^4 células/poço, mantidos em meio de cultura padrão. A análise de mineralização foi realizada no período de 21 dias. Ao final, o meio de cultura foi removido, cada poço foi lavado com PBS em temperatura ambiente e as células foram fixadas com etanol 100% (1mL/poço) por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram reidratadas em concentrações decrescentes de etanol (100% até 50%, por 5 minutos em cada solução), e lavadas em água destilada por duas vezes. Em seguida, 1mL de solução de 5% de nitrato de prata (AgNO_3) foi colocado em cada poço e as células foram incubadas no escuro por 1 hora. Então, as células foram lavadas quatro vezes em água destilada e expostas à luz durante 1 hora até que o mineral escurecesse. As análises foram feitas a partir de fotografias utilizando o microscópio invertido no aumento de 40x.

A análise morfométrica quantitativa foi realizada conforme relatado anteriormente (Shen et al., 2014). Para a análise morfométrica quantitativa, cinco seções aleatórias de slides de Von Kossa foram digitalizadas eletronicamente em uma imagem RGB que posteriormente foi analisada usando o software Image-J (versão 1.32j). A quantidade de depósito de cálcio foi então estimada a partir das imagens com um macro escrito pelos autores (JIS) convertendo pixels da imagem com intensidade substancialmente maior (>120%) azul do que vermelho para ter a nova amplitude da escala de cinza = 1, deixando outros pixels como com amplitude = 0.

4.2.1.7 Análise da superfície das membranas por MEV

Antes do cultivo de células, as amostras foram alocadas nas placas de cultura de 24 poços e pré-incubadas durante 2 horas com 100 ml DMEM sem células antes da experiência de modo a facilitar a adsorção de proteínas. Após a remoção desse meio, foi realizada pipetagem direta com 500 µl de meio de cultura com 3×10^4 células em placas de 24 poços sobre as membranas e incubados a $37^\circ\text{C} / 5\%$ de CO_2 . O meio de cultura celular foi mudado a cada 48h. Após os períodos de 24 horas e 7 dias, o meio de cultura foi removido e as esponjas com células foram submetidas a três lavagens com PBS para remover as células não aderidas. Posteriormente, foram fixadas com solução de glutaraldeído a 2,5% tamponado com tampão de cacodilato 0,2 M (pH 7,4) durante a noite à temperatura ambiente. Após esse período, foram gradualmente desidratados na mistura de etanol / água destilada graduada de 50 a 100% de etanol, em passos de 10% durante 10 min cada. Após a secagem as amostras foram colocadas sobre fitas de carbono e metalizadas com ouro de 30nm de espessura e a análise superficial foi realizada na Central Analítica da UFC em Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 450 FEG – FEI com voltagem de 20kV. Avaliou-se a adesão dos osteoblastos nas esponjas.

4.2.1.8 Expressão protéica de BMP-2 por Western Blotting

Para avaliar a expressão protéica de BMP-2 por osteoblastos nas células ósseas, realizou-se Western Blotting. Seguiram-se sequencialmente as seguintes etapas: extração de proteínas, dosagem de proteínas e Western Blotting.

4.2.1.8.1 Extração de proteínas

As células foram cultivadas da concentração de 3×10^4 células/poço em placas de 6 poços com meio de cultura completo à temperatura de 37°C e na concentração de 5% de CO_2 . Após 48h de semeadura, o meio foi trocado e as células incubadas de acordo com os grupos. DMEM (Meio somente), C (Células com esponja comercial), COL (Células com esponja sintetizada); e CHAP5h (Células com esponja de

colágeno com nanohidroxiapatitas com tratamento hidrotérmico por 5 horas). O período de incubação com os materiais foi de 48h. Ao final desse período, o meio de cultura foi removido, cada poço foi lavado com PBS em temperatura ambiente.

Colocou-se 100ml de tampão RIPA (25 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1% NP-40; 1% triton-X-100; 1% deoxicolato de sódio; 0,1% SDS) e inibidor de protease (Sigma-Aldrich, EUA, 1µL de inibidor de protease: 100µL de RIPA) em cada poço da placa. Em seguida, com um raspador de células, as amostras foram removidas e colocadas em microtubos devidamente identificadas, vortexadas por 30 segundos, a cada 10 min por 30 min, e centrifugadas (17 min, 4°C, 13000 rpm). O pellet foi desprezado e o sobrenadante (porção que contém as proteínas) foi transferido para um novo microtubo.

4.2.1.8.2 Dosagem de proteína

As proteínas foram dosadas pelo método do ácido bicinonínico (BCA) e foi realizado conforme descrito pelo fabricante (*Thermo Scientific*, Estados Unidos, EUA). De acordo com este método, as proteínas presentes nas amostras reduzem o cobre da sua forma cúprica (Cu^{2+}) para a cuprosa (Cu^{1+}). Este se liga a duas moléculas de ácido bicinonínico, resultando na cor púrpura visualizada no final da reação. Inicialmente, a proteína foi diluída (1 µl de proteína: 20 µl de RIPA) e preparado 75µL de proteína diluída. Em seguida, misturou-se o reagente A (Contém ácido bicinonínico) e B (contém sulfato de cobre pentahidratado 4%) respectivamente na proporção de 50:1. Posteriormente, colocou-se em duplicata 25 µl de cada amostra diluída e 200 µl da mistura final do reagente A e B em placa de 96 poços. Posteriormente, a placa foi incubada por 30 min a 37°C em estufa. Enfim, efetuou-se a leitura da reação em leitor de Elisa a 562 nm. Para a curva, foram utilizadas concentrações conhecidas de Albumina sérica bovina (BSA): 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 e 0 µg/ml (BEZERRA, 2016).

4.2.1.8.3 Western Blotting

Inicialmente, preparou-se 20 µg de proteína referente a cada amostra, adicionando tampão da amostra (BioRad, EUA 65,8 mM Tris-HCl, pH 6,8; 26,3%

glicerol; 2,1% SDS; 0,01% azul de bromofenol) e β -mecaptoetanol (BioRad, EUA), vortexando por 10 s, aquecendo no banho maria (95°C, 5 min) e centrifugando (10000 rpm, 4°C, 30s). Em seguida, realizou-se a eletroforese vertical de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) a 60 v nos primeiros 15 min para deposição das amostras no fundo do poço e 120 v para o restante da corrida, onde foi utilizado gel a 10% (BMP-2 e p38 α) e tampão de corrida (25 mM Tris; 192 mM glicina; 1% SDS). Após a corrida, efetuou-se a transferência por eletroforese das proteínas do gel para a membrana de PVDF (BioRad, EUA, Fluoreto de polivinilideno) a 100 v por duas horas em tampão de transferência (25 mM Tris; 192 mM glicina; 20% metanol). Após esta etapa, as membranas foram bloqueadas por uma hora em agitação constante, para reduzir as ligações inespecíficas, com 5% BSA (Sigma-Aldrich, EUA) diluído em tampão salina Tris-HCl suplementado com Tween 20 (TBST- 20 mM Tris pH 7,5; 150 mMNaCl; 0,1% Tween 20). Em seguida, realizou-se a lavagem das membranas com TBST, sendo três lavagens por 10 min cada. Na etapa seguinte, as membranas foram incubadas, overnight a 4°C sob agitação constante, com os anticorpos anti-BMP-2 (Santa Cruz *Biotechnology*, SC-6895, 1:100) diluídos em 1% de BSA em TBST. Após esta etapa, realizaram-se três lavagens de 10 min cada com TBST. As membranas foram incubadas com os anticorpos secundários HRP-rabbitanti-goat (Invitrogen, A16142, 1:2500) por duas horas em temperatura ambiente. Decorrido este tempo, as membranas foram lavadas três vezes, duração de 10 min cada, com TBST. Enfim, adicionou-se o reagente de quimioluminescência (BioRad, EUA, *Clarity western ECL blotting substrate*) e as membranas foram agitadas por 5 min. As imagens das bandas foram capturadas por um sistema de ChemiDoc XRS (BioRad, EUA). A densidade das bandas foi mensurada por meio do software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA)

4.3 Estudo *in vivo*

4.3.1 Biocompatibilidade de esponjas de colágeno e impregnadas com nanopartículas de HAp e implantadas em tecido subcutâneo

4.3.1.1 Aspectos éticos

O estudo seguiu os aspectos que envolvem a pesquisa com animal para cuidados e uso de animais de laboratórios publicado pelo colégio brasileiro de experimentos com animias (COBEA), o qual foi submetido a aprovação pela comissão de ética em uso animal da Universidade Federal do Ceará (Protocolo nº 25/2017; ANEXO 1). Além disso, todos os esforços foram realizados no sentido de reduzir o número de animais utilizados, a dor, o sofrimento e o estresse dos mesmos.

4.3.1.2 Animais

Os animais utilizados nesse estudo foram ratos Wistar machos da espécie (*Ratus Norvegicus*), com massa corpórea entre 180 e 200 gramas, provenientes do Biotério Central (UFC), e mantidos sob condições de temperatura entre 22 e 24°C e ciclos de 12h–12h claro e escuro controlados durante os experimentos. Estes foram alojados em gaiolas apropriadas, em número de seis animais em cada uma delas, com alimentação balanceada à base de ração. A água foi disponibilizada à vontade.

4.3.1.3 Modelo Experimental

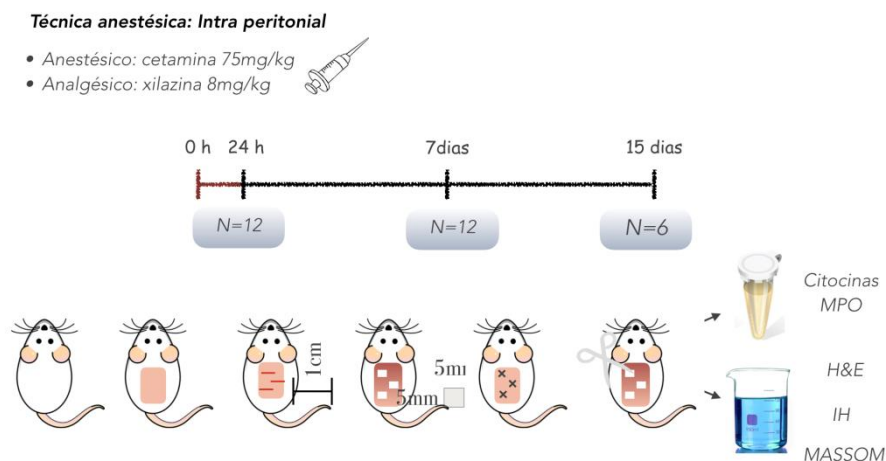
Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais de 12, 12 e 6 animais, respectivamente, baseados nos diferentes períodos de observação (24 horas, 7 e 15 dias), totalizando 30 animais. Cada animal recebeu as seguintes esponjas:

4.3.1.4 Grupos experimentais

- Grupo controle (C): Esponjas de colágeno comerciais (Lumina-coat, Critéria., Brasil).
- Grupo (COL): Esponjas de colágeno produzida pelo nosso grupo.
- Grupo (CHAP5h): Esponjas de colágeno produzida pelo nosso grupo carregadas com nano partículas de Hidroxiapatita que foram submetidas ao tratamento hidrotérmico a 150 °C por 5h, determinada previamente nos ensaios *in vitro*.

4.3.1.5 Protocolo experimental em animais

Figura 8: protocolo experimental in vivo.



Os ratos Wistar foram anestesiados pela injeção intra-peritoneal (i.p) de cetamina na dose de 75mg/Kg e xilazina 5mg/Kg. A tricotomia foi realizada na área dorsal escapular e pélvica seguida antissepsia com solução de álcool iodado. Incisões horizontais de aproximadamente 1cm foram realizadas em 3 locais da superfície dorsal na direção látero-lateral. Com uma tesoura cirúrgica de ponta romba, penetrando através da incisão em direção caudal, o tecido subcutâneo foi divulsionado até o ponto onde as membranas (5 x 5 mm) imersas em solução de fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% foram posicionadas. As incisões foram suturadas com fio de seda 4.0 (Ethicon - Johnson & Johnson, Brasil), seguida pela assepsia com álcool iodado. Os animais foram mantidos sob observação em gaiolas unitárias, por 24 horas, para evitar machucados e dor. Após os períodos de 24 horas e 7 e 15 dias, os animais foram sacrificados pela administração i.p. através de elevada dose de anestésico e relaxante muscular, correspondente a três vezes o valor do peso animal (Figura 8). A pele dorsal foi raspada e os implantes cirurgicamente removidos junto com uma porção do tecido circunjacente (VERISSIMO, 2012).

4.3.1.6 Análise Histopatológica

Os espécimes foram fixados em solução de formol tamponado por 24horas,

desidratados em etanol, clarificados com xilol e embebidos em parafina. A microtomia foi realizada em cortes longitudinais medindo 4µm de espessura e corados pelo método de hematoxilina e eosina (H&E) para avaliação em microscópio óptico do infiltrado inflamatório.

4.3.1.7 Atividade de mieloperoxidase (MPO) no tecido subcutâneo adjacente às membranas

Nos grupos eutanasiados nos períodos de 24 horas e 7 dias após a cirurgia, foi realizada a análise da atividade de mieloperoxidase, importante na quantificação da inflamação aguda. As medidas de atividade da mieloperoxidase foram realizadas nos tecidos subcutâneos (VERISSIMO, 2012).

4.3.1.8 Dosagem de citocinas pró inflamatórias (TNF- α e IL-1 β)

As amostras de tecido subcutâneo adjacente às esponjas foram removidas dos animais nos períodos de 24 horas e 7 dias para dosagem de citocinas. Os espécimes foram armazenados em freezer a -80°C até a realização dos ensaios. O tecido coletado foi homogeneizado e processado como descrito (SaWeh-Garabedian et al., 1995). A detecção das concentrações de TNF- α e IL-1 foram determinadas pelo método de ELISA, como descrito previamente (CUNHA et al., 1993). As placas foram incubadas durante a noite a 4°C com anticorpo anti-rato TNF- α e IL-1 (2 ug/ml). Após o bloqueio das placas, as amostras foram adicionadas a várias diluições em duplicatas e incubadas a 4°C por 24 h. As placas foram lavadas 3 vezes com solução tampão e o anticorpo policlonal biotilado de ovelha anti-TNF- α e anti-IL-1 (diluído 1:1000 com tampão 1% BSA) foi adicionado. Após o período de incubação a temperatura ambiente por 1 hora, as placas foram lavadas e 50ul de avidin-HRP (dilução 1:5000) foram adicionado as placas. O reagente colorido o-phenylenediamine (OPD; 50 µl) foi adicionado 15 min depois e as placas foram incubadas no escuro 37°C por 15 a 20 min. A reação enzimática foi bloqueada com H₂SO₄ e a absorbância mensurada a 490nm. Os valores mensurados foram expressos em picogramas/mililitro (pg/ml) (VERISSIMO, 2012).

4.3.1.9 Imunohistoquímica IL-1

A imunohistoquímica para IL-1B, foi realizada utilizando o método de estreptavidina-biotina-peroxidase (VERISSIMO, 2012). No 7º dia, os animais foram eutanasiados e coletadas 6 amostras de esponjas por grupo (C, CL e HAP5h), juntamente com o tecido circundante foram removidos, a seguir, os tecidos foram desidratados em álcool sendo, então, incluídas em parafina. Após este procedimento, foram feitos cortes seriados de 4µm em micrótomo apropriado e colocados em lâminas de L-polilisina, apropriadas para a realização de imunohistoquímica. Os cortes foram desparafinizados, hidratados em xilol e álcool e imersos em tampão de recuperação (Dako) pH 9.0 sob aquecimento em PT-LINK (Dako) 45 minutos para a recuperação antigênica a 95°C. Após o resfriamento das lâminas, foram feitas lavagens com solução tamponada de fosfato (PBS), intercaladas com o bloqueio da peroxidase endógena com solução (DAKO) 3% (10 minutos). Os cortes foram incubados por 1 hora com anticorpo primário de cabra policlonal IL1-β (ab 97222-Abcan) diluído 1:200. Após a lavagem em PBS, foi feita a incubação com secundário (de detecção) bitinilado IgG anti coelho diluído 1:200 (Santa Cruz), por 30 minutos. Depois de lavado, os cortes foram incubados com o complexo estreptoavidina peroxidase conjugada (complexo ABC Santa Cruz) por 30 minutos. Após nova lavagem com PBS, seguiu-se coloração com o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina-peróxido (DAB), seguida por contracoloração com hematoxilina de Mayer. Por fim, foi realizada a desidratação das amostras e montagem das lâminas. Controles negativos foram processados simultaneamente como descrito acima, sendo que o anticorpo primário foi substituído por PBS-BSA 5%.

As imagens foram capturadas por meio de um microscópio de luz acoplado a uma câmera com sistema de aquisição LAZ 3,5 (leica DM1000, Alemanha). Fotografou-se 10 campos por corte histológico no aumento de 40x, e foi realizada a contagem de células positivas marcadas por cada campo utilizando o programa Image J. Foi considerada células positivas marcadas com coloração marron citoplasmática e nuclear.

4.3.1.10 Avaliação da síntese de colágeno

A coloração com tricromo de Masson foi realizada usando o kit pronto a usar (Histokit™- EasyPath). Após a confecção, as lâminas permaneceram em estufa a

60°C por 60 minutos, foram posicionadas em berços de coloração e submetidas ao processo de desparafinização e hidratação. As lâminas ficaram submersas em solução de Bouin em estufa a 60°C por uma hora, e seguiu-se por resfriamento até a temperatura ambiente. Depois deste procedimento, foram lavadas em água corrente por 15 minutos e rapidamente em água destilada. Em seguida, as lâminas foram posicionadas em suporte de coloração e os corantes aplicados sobre as mesmas na seguinte ordem: hematoxilina férrica por cinco minutos, lavagem em água corrente por cinco minutos e depois em água destilada; fucsina ácida adicionada de ponceau por dez minutos, lavagem em água corrente por um minuto e em seguida em água destilada; ácido fosfomolibdico a 5% por cinco minutos até o clareamento dos cortes, lavagem em água corrente e água destilada rapidamente; azul de anilina a 0,5% por cinco minutos, lavagem em água corrente e água destilada rapidamente; ácido acético por um minuto. Após a passagem nessas soluções, as lâminas foram novamente postas em berço de coloração e submetidas aos processos de desidratação, diafanização e montagem com entellan. (SUVIK & EFFENDY, 2012).

A análise morfométrica quantitativa foi realizada conforme relatado anteriormente (HALLER et al., 2012). A expressão do colágeno foi quantificada medindo a área de cinco campos da coloração com tricromo de Masson usando o software Image J. A coloração com tricromo foi realizada nas esponjas com tecido adjacente no período de 15 dias após a implantação das esponjas nos dorsos dos animais. Foram imediatamente fixadas em solução tampão de formalina a 4% (pH 7,2) durante 18 h, desidratadas em etanol a 70% e depois incorporadas em parafina e cortadas com um microtomo. A coloração do Tricromo foi então realizada e o colágeno foi quantificada usando o software ImageJ. Para a análise morfométrica quantitativa, cinco seções aleatórias de slides de tricromo foram digitalizadas eletronicamente em uma imagem RGB que posteriormente foi analisada usando o software Image J (versão 1.32j). A quantidade de colágeno foi então estimada a partir das imagens RGB com um macro escrito pelos autores (JIS) convertendo pixels da imagem com intensidade substancialmente maior (>120%) azul do que vermelho para ter a nova amplitude da escala de cinza = 1, deixando outros pixels como com amplitude = 0.

5 Análise estatística

Foi empregada a análise da variância (ANOVA) one ou two-way seguida pelo teste de Bonferroni para a comparação das médias obtidas. Os valores foram expressos como Média \pm Erro Padrão Médio. Shapiro Wilk foi utilizado para avaliar a normalidade. Foi considerado o nível de significância para $p < 0,05$. As análises foram executadas com o auxílio do programa GraphPad Prism 7 (Graph-Pad Software, USA).

6 RESULTADOS

6.1 Avaliação de viabilidade pelo método direto MTT e proliferação celular

Os resultados do teste de viabilidade e citotoxicidade através do MTT estão expressos na Figura 9. Todas as esponjas testadas mostraram-se viáveis e sem toxicidade, porém somente o grupo CHAP5h, exibiu aumento significativo do número de células quando comparados ao grupo DMEM na 24^a hora (* $p < 0,05$) (Figura 9A) e a todos os outros grupos na 48 hora de incubação (**, # $p < 0,05$) (Figura 9B).

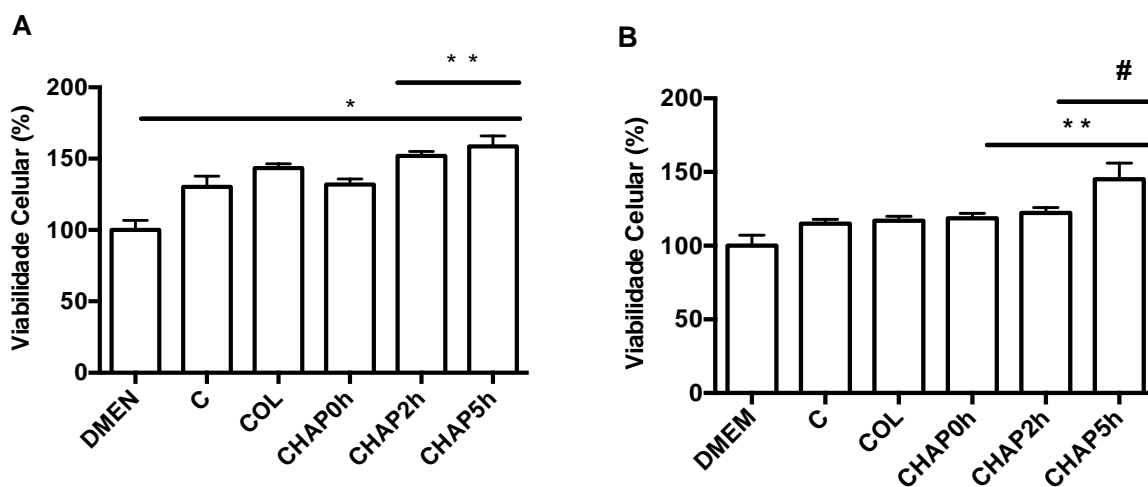


FIGURA 9. Efeito de esponjas de colágeno impregnadas com nano partículas de hidroxiapatita sobre a viabilidade e proliferação celular de osteoblastos murinos (ofcol ii) após 24 (A) e 48h (B) de cultivo celular. A viabilidade celular foi investigada através do ensaio mtt em diferentes tempos de incubação, 24h e 48 h, respectivamente Figura 9A e 9B. grupo dmen (células com o meio); grupo c (esponja de colágeno comercial); grupo col (esponja de colágeno produzida no gqmat); grupo chap0h (esponja de colágeno com nanohidroxiapatitas com tratamento hidrotérmico por 0 hora); grupo chap2h (esponja de colágeno com nanohidroxiapatitas com tratamento hidrotérmico por 2 hora); grupo chap5h (esponja de colágeno com nanohidroxiapatitas com tratamento hidrotérmico por 5 hora). * $p < 0,05$ em relação ao grupo dmen, ** $p < 0,05$ em relação ao grupo C, COL, CHAP0h, # $p < 0,05$ em relação ao grupo CHAP2h. Análise de variância (anova); teste de bonferroni

Para confirmar a proliferação celular sugerida pelo MTT no grupo CHAP5h, foi realizado imunocitoquímica para investigar a marcação de Ki-67, um antígeno nuclear presente em células em proliferação. Os grupos foram avaliados nos períodos de 24 e 48h. Na Figura 11 os núcleos apresentam-se corados com DAPI (azul) e as células ki67 positivas com alexia 488 (verde). A Figura 10A mostra, após 24 horas de cultivo celular, maior número de células Ki67 positivas nos grupos CHAP0h, CHAP2h e CHAP5h quando comparados ao grupo DMEM ($p < 0,05$). Entretanto, após 48 horas de incubação, observou-se apenas no grupo CHAP5h aumento significativo do número de células Ki67 positivas em relação ao grupo DMEM ($*p < 0,05$) (Figura 10B). Nas Figuras 10A e 10B, referentes respectivamente à 24 h e 48 h de incubação, confirmam os dados descritos anteriormente, uma vez que não é possível diferenciar os grupos na Figura 10A, porém na Figura 10B essa diferença é perceptível no grupo CHAP5h, onde se observa os núcleos celulares marcados em azul e a imunomarcação de ki-67 em verde bem intenso, quando comparado ao grupo DMEM.

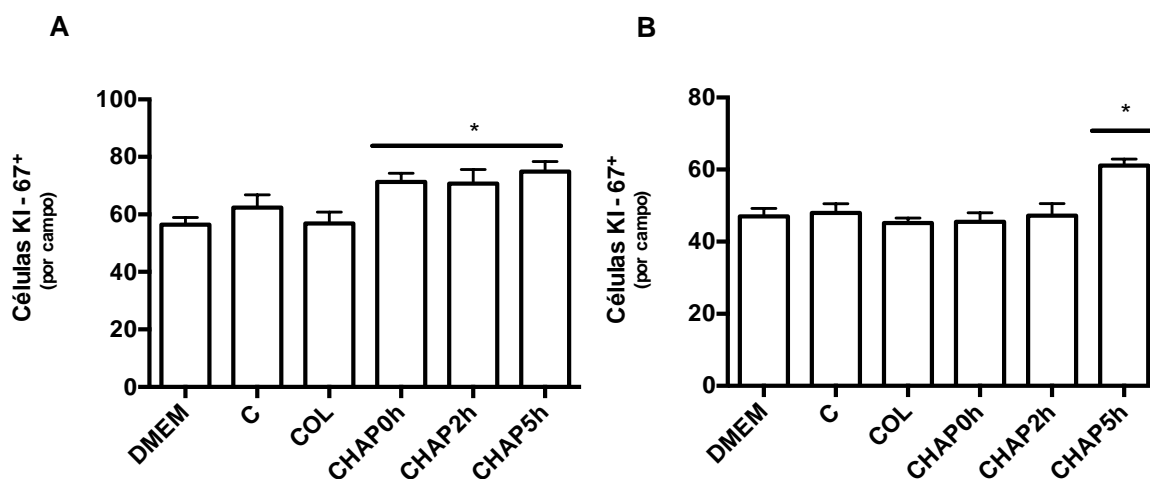


Figura 10. Efeito de esponjas de colágeno impregnadas com nano partículas de hidroxiapatita sobre a imunomarcação para ki-67 em osteoblastos. Avaliação da proliferação celular através da imunomarcação para ki67 em osteoblastos em diferentes tempos de incubação, 24h e 48 h, respectivamente Figura 10A e 10B. Grupo DMEM (Células com o meio); Grupo C (Esponja de colágeno comercial); Grupo COL (Esponja de colágeno produzida no GQMAT); Grupo CHAP0h (Esponja de colágeno com nanoHidroxiapatitas com tratamento hidrotérmico por 0 hora); Grupo CHAP2h (Esponja de colágeno com nanoHidroxiapatitas com tratamento hidrotérmico por 2 horas); Grupo CHAP5h (Esponja de colágeno com nanoHidroxiapatitas com tratamento hidrotérmico por 5 horas). O número de células KI-67 positivas foram contadas por campo e os dados foram expressos como média \pm e. p. m. $*p < 0,05$ em relação ao grupo DMEM (ANOVA bivariada seguida pelo teste de Bonferroni).

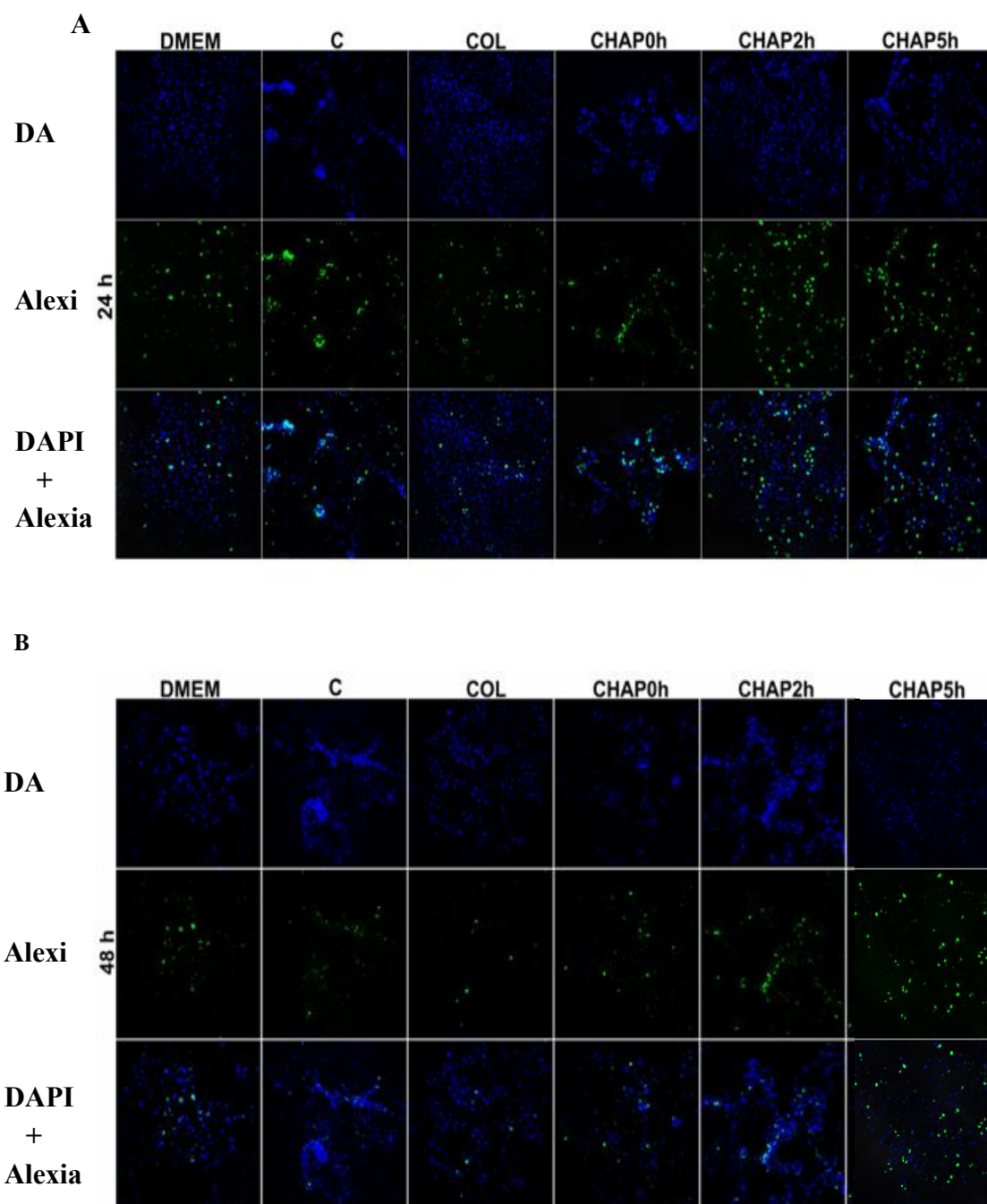
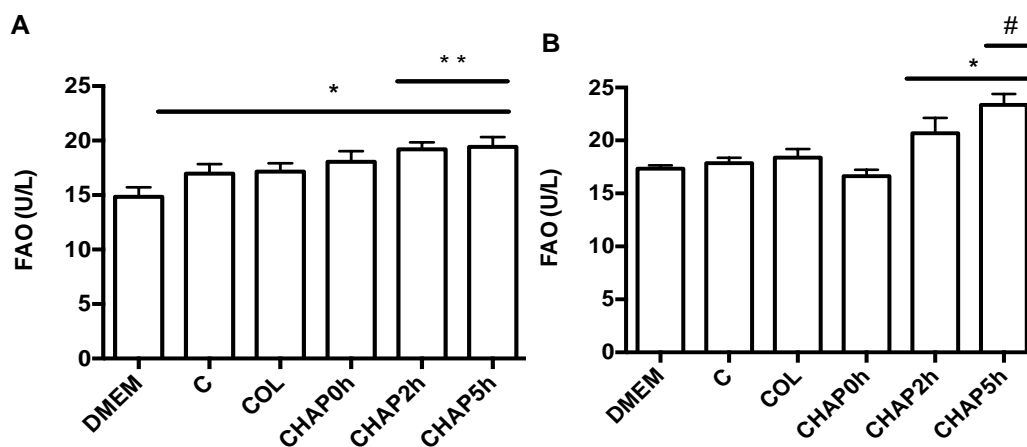


Figura 11. Imunofluorência para ki-67 em osteoblastos incubados com esponjas de colágeno impregnadas com nano partículas de hidroxiapatita. Imunomarcagem para ki-67 em osteoblastos em diferentes tempos de incubação, 24h e 48 h, respectivamente Figura 11A e 11B. Aonde os núcleos apresentam-se corados com DAPI (azul) e as células ki 67 positivas, coradas com alexia 488(verde). Grupo DMEM (Células com o meio); Grupo C (Esponja de colágeno comercial); Grupo COL (Esponja de colágeno produzida no GQMAT); Grupo CHAP0h (Esponja de colágeno com nanoHidroxiapatitas com tratamento hidrotérmico por 0 hora); Grupo CHAP2h (Esponja de colágeno com nanoHidroxiapatitas com tratamento hidrotérmico por 2 horas); Grupo CHAP5h (Esponja de colágeno com nanohidroxiapatitas com tratamento hidrotérmico por 5 horas).

6.2 Atividade de Fosfatase Alcalina no meio de cultura

A Figura 12 ilustra a quantificação, por ELISA, da atividade de fosfatase alcalina óssea (FAO) no meio de cultura de osteoblastos cultivados sobre as esponjas de colágeno e hidroxiapatita, nos períodos de 24 h, 48h, 5 e 7 dias. A atividade aumentada da FAO, em relação ao grupo controle DMEM, foi observada após 24h de cultivo, em todos os grupos com esponjas, independente do tipo de esponja avaliada (Figura 12A). Após 48h, no entanto, observou-se um aumento significativo da atividade de FAO apenas nos grupos CHAP2h e CHAP5h, quando comparado ao grupo DMEM e ao grupo CHAP2h, respectivamente ($*p<0,05$) e ($\#p<0,05$) (Figura 12B). Após 5 e 7 dias, somente o grupo CHAP5h apresentou aumento da atividade de FAO, quando comparado ao grupo DMEM ($*p<0,05$) (Figuras 12C e 12D, respectivamente).



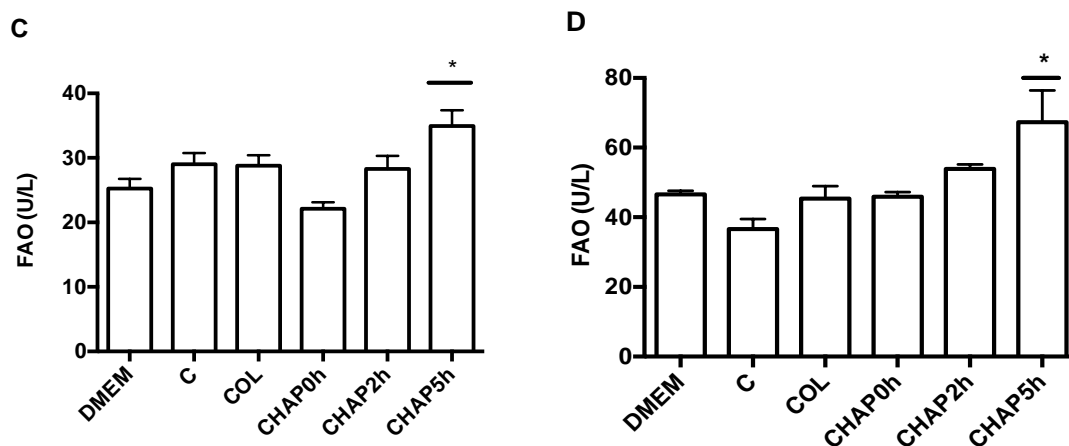


Figura 12. Efeito de esponjas de colágeno incorporadas com nanohidroxiapatita sobre a liberação de fosfatase alcalina (FAO) em meio de cultura de osteoblastos incubados durante 24h, 48h, 3, 5 e dias. Análise da atividade de fosfatase alcalina óssea (FAO) em osteoblastos em diferentes tempos de incubação, 24h, 48 h, 5 dias e 7 dias Figura 12. Grupo DMEN (Células com o meio); Grupo C (Esponja de colágeno comercial); Grupo COL (Esponja de colágeno produzida no GQMAT); Grupo CHAP0h (Esponja de colágeno com nanoHidroxiapatitas com tratamento hidrotérmico por 0 hora); Grupo CHAP2h (Esponja de colágeno com nanoHidroxiapatitas com tratamento hidrotérmico por 2 hora); Grupo CHAP5h (Esponja de colágeno com nanoHidroxiapatitas com tratamento hidrotérmico por 5 hora). Dados expressos como média \pm e. p. m. * $p < 0,05$ em relação ao grupo DMEN, ** $p < 0,05$ em relação ao grupo C, COL e CHAP0h, # $p < 0,05$ em relação ao grupo CHAP2h (ANOVA bivariada seguida pelo teste de Bonferroni).

6.3 Estudo da mineralização produzida por osteoblastos incubados com esponjas sem e com nanopartículas de hidroxiapatita

A Figura 13 ilustra os nódulos de mineralização presentes nas culturas de osteoblastos incubados com esponjas, evidenciados por coloração de Von Kossa. Os dados revelam que a incubação de osteoblastos murinos sobre esponjas favorece a formação de nódulos minerais (Figuras 13B, 13C, 13D, 13E e 13F), quando comparado ao grupo DMEM, sem esponja (Figura 13A), após 21 dias. Contudo, o número e o tamanho são maiores nos grupos CHAP2h e CHAP5h (Figuras 13G e 13F, respectivamente). A Figura 14 mostra claramente esse achado, uma vez que uma maior área coberta por nódulos minerais foi quantificada nos grupos CHAP2h e CHAP5h, quando comparado aos grupos controles. * $p < 0,05$ em relação ao grupo DMEN, ** $p < 0,05$ em relação ao grupo C, COL e CHAP0h, # $p < 0,05$ em relação ao grupo CHAP2h .

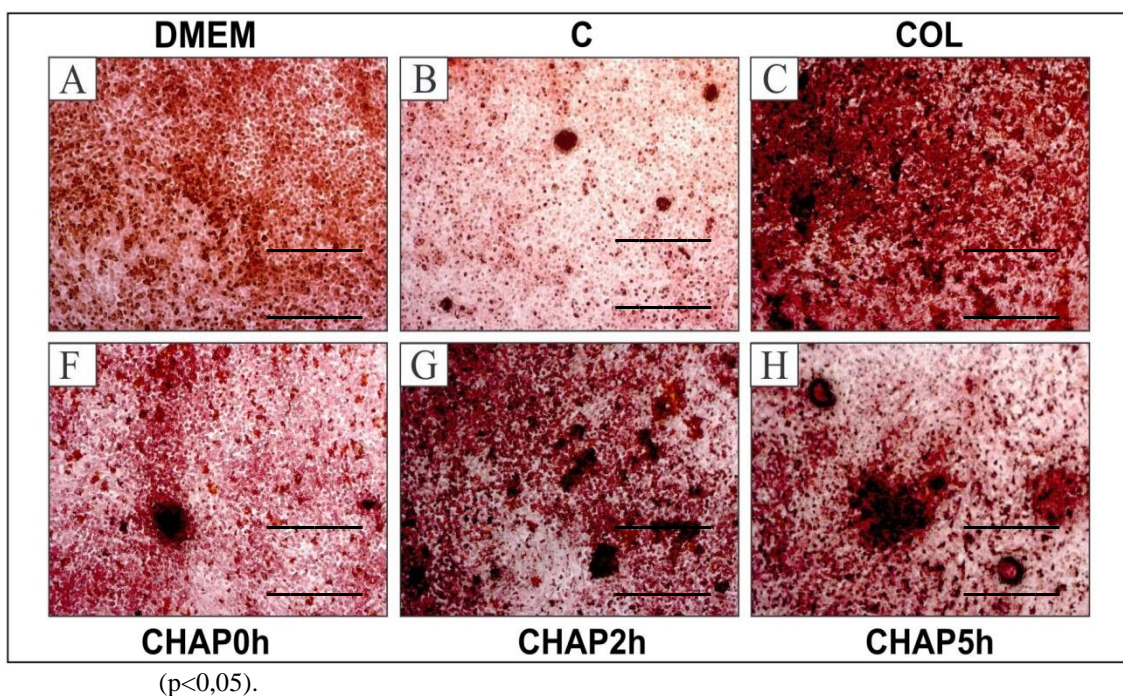


Figura 13.Imagens representativas do ensaio de mineralização descrito por von kossa em osteoblastos ofcol ii após o período de 21 dias de incubação com esponjas adicionadas ao meio de cultura. A mineralização é observada a partir da presença de pontos negros após 21 dias de incubação. Grupo DMEN (Células com o meio) (11A); Grupo C (Esponja de colágeno comercial) (11B); Grupo COL (Esponja de colágeno produzida no GQMAT) (11C); Grupo CHAP0h (Esponja de colágeno com nanoHidroxiapatitas com tratamento hidrotérmico por 0 hora) (11D); Grupo CHAP2h (Esponja de colágeno com nanoHidroxiapatitas com tratamento hidrotérmico por 2 hora) (11E); Grupo CHAP5h (Esponja de colágeno com nanoHidroxiapatitas com tratamento hidrotérmico por 5 hora) (11F).

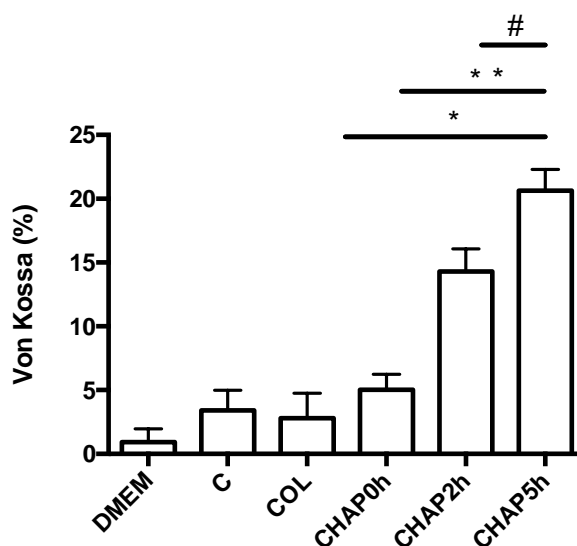


Figura 14. Quantificação dos depósitos de cálcio no ensaio de mineralização descrito por von kossa em osteoblastos ofcol ii após o período de 21 dias de incubação com esponjas adicionadas ao meio de cultura. A mineralização é observada a partir da presença de pontos negros após 21 dias de incubação. Grupo DMEN (Células com o meio); Grupo C (Esponja de colágeno comercial); Grupo COL (Esponja de colágeno produzida no GQMAT); Grupo CHAP0h (Esponja de colágeno com nanoHidroxiapatitas com tratamento hidrotérmico por 0 hora); Grupo CHAP2h (Esponja de colágeno com nanoHidroxiapatitas com tratamento hidrotérmico por 2 hora); Grupo CHAP5h (Esponja de colágeno com nanoHidroxiapatitas com tratamento hidrotérmico por 5 hora). Dados expressos como média \pm e. p. m. * $p < 0,05$ em relação ao grupo DMEN, ** $p < 0,05$ em relação ao grupo C, COL e CHAP0h, # $p < 0,05$ em relação ao grupo CHAP2h (ANOVA bivariada seguida pelo teste de Bonferroni).

6.4 Análise morfológica e adesão celular nas esponjas por MEV

Pequenas fatias dos espécimes (5 x 5 mm) foram cultivadas em meio de cultura por períodos de 24 h e 7 dias. Depois desse período de incubação, os compósitos foram avaliados por microscopia de varredura e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS). As micrografias da Figura 15 mostram a superfície dos *scaffolds* antes do processo de incubação com os osteoblastos. Nessa condição, a amostra de colágeno (Figura 15 A) exibe poros interconectados e não há indícios de cristais ao longo das fibras ou cálcio por EDS dessa amostra.

As micrografias dos *scaffolds* Col+HAp0h (Figura 15 B) e Col+HAp2h (Figura 15 C) - antes da incubação para proliferação celular - mostram uma notável distribuição de cristais incrustados na superfície das amostras. Para o *scaffold* Col+HAp5h (Figura 15D), aparecem cristais hexagonais ao longo das fibras de colágeno.

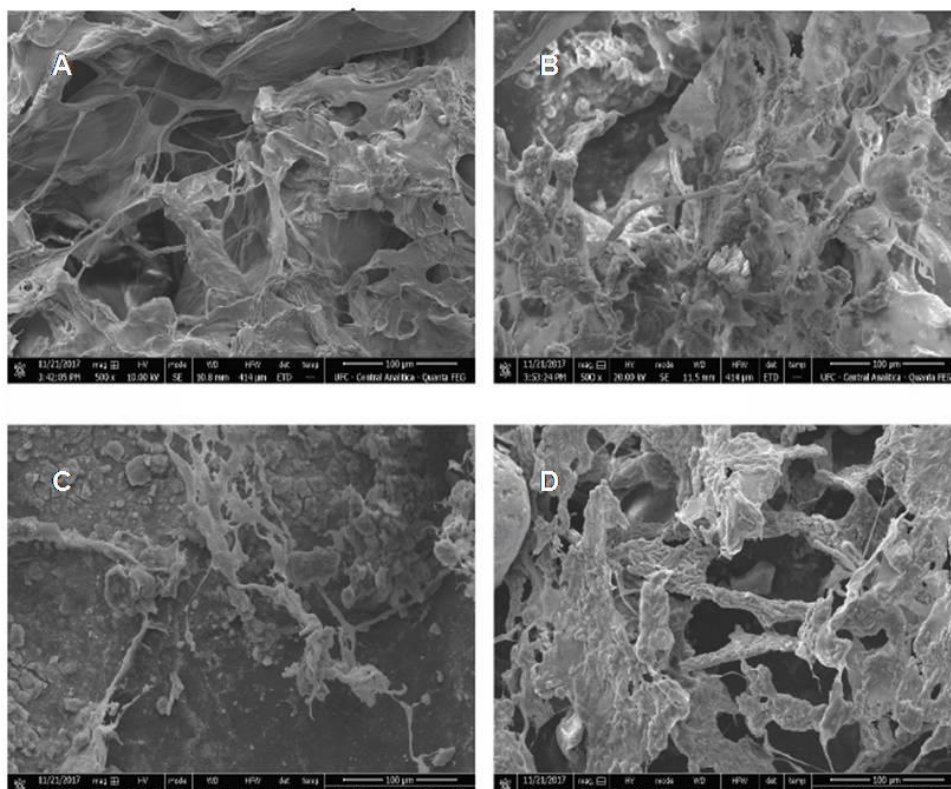


Figura 15. Micrografias da superfície da esponjas de colágeno. Grupo C(A), CHAP0h (B), CHAP2h (C) e CHAP5h (D) antes do teste de viabilidade celular.

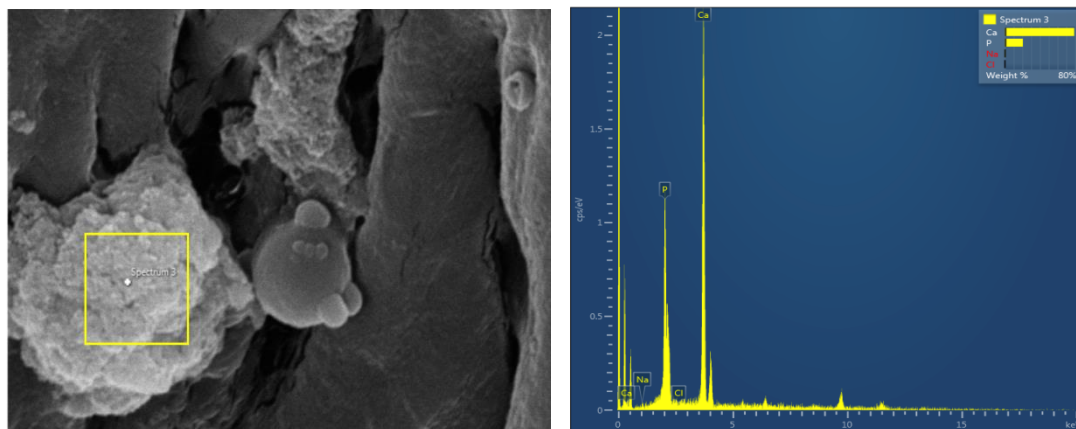


Figura 16: Análise por EDS. CHAP5h após dias de cultivo análise no MEV (Esquerda) e análise por EDS revelando os cristais marcados (Direita)

A Figura 16 revela a análise dos pontos de hidroxiapatita e consequente quantificação de cálcio e fósforo. Nós podemos observar dois picos intensos. Primeiro de fósforo e depois cálcio.

A micrografia da Figura 17A e 17B mostra o colágeno somente. A Figura 17C e D mostram a interação dos cristais de HAp com a fibra de colágeno, em que se observa a formação de uma espécie de casulo envolvendo o aglomerado de nanopartículas. Após sete dias de incubação (Figura 17 B), é possível observar células de osteoblastos cercadas de cristais de fosfato de cálcio produzidos por ele. Esses resultados se repetem para os *scaffolds* Col+HAp2h (Figura 17:E-F) e Col+HAp5h (Figura 17:G-H). É possível observar que, para a amostra com HAp5h, a mineralização (Figura 17-G) e produção de matriz extracelular (Figura 17-H) é mais intensa.

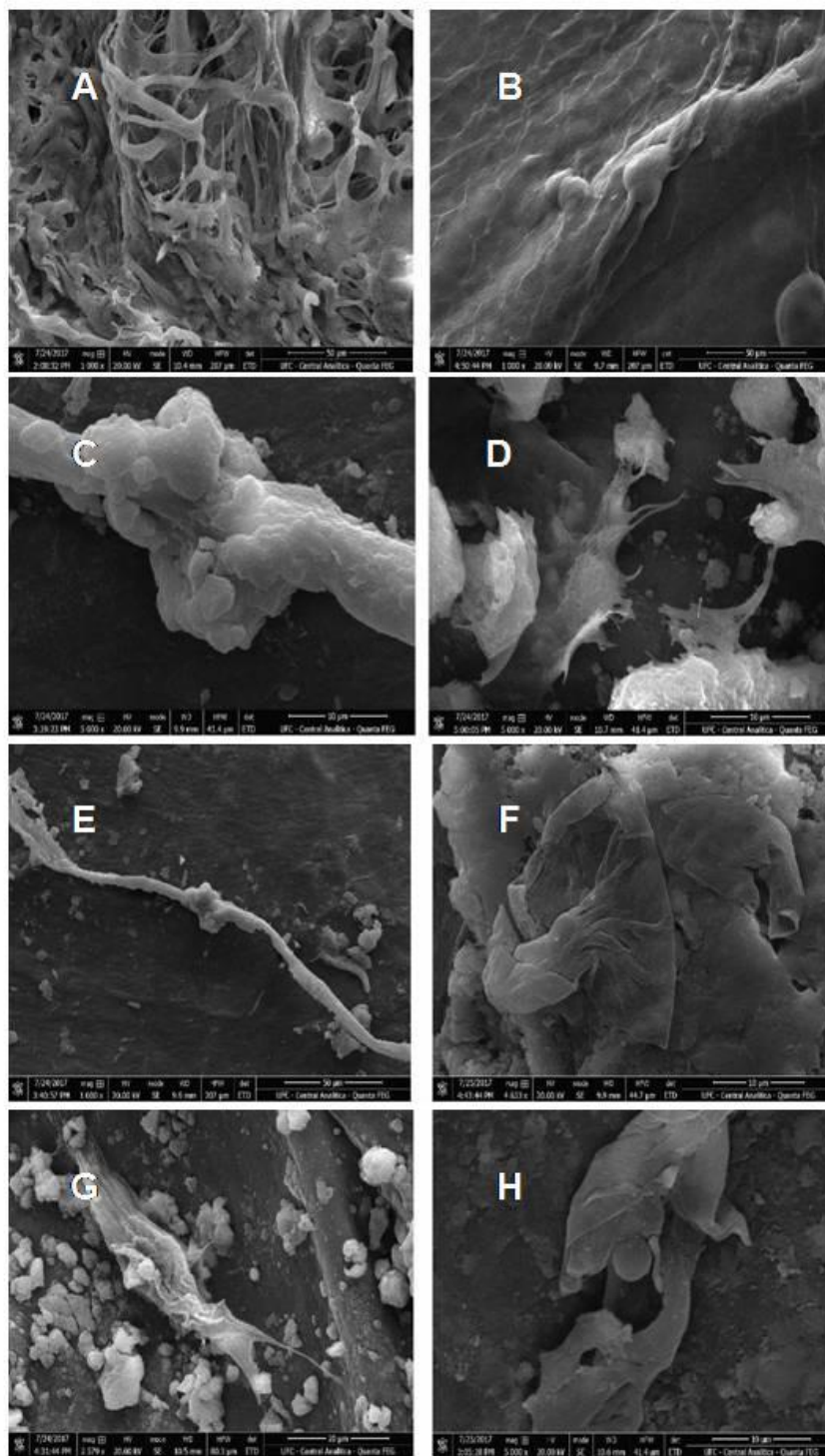


Figura 17. MEV das esponjas dos grupos C, CHAP0h , CHAP2h, CHAP5h após 24 horas e 7 dias em meio de cultura. Grupo C (A-B), grupo CHAP0h (C-D), grupo CHAP2h (E-F), grupo (G-H), respectivamente 24h (A, C, E, G) e 7 dias (B, D, F, H).

6.5 Avaliação da expressão protéica de BMP-2 por osteoblastos incubados com esponjas sem e com nanopartículas de hidroxiapatita

O efeito das esponjas na expressão protéica de BMP-2 por osteoblastos foi investigadas através de Western Blot, e encontra representado nas Figuras, que mostram os resultados obtidos após o período de 7 dias de incubação, respectivamente. A Figura 14B mostra que a incubação dos osteoblastos, por 7 dias, com nanohidroxiapatita que recebeu tratamento hidrotérmico por 5h aumenta significativamente a expressão protéica de BMP-2, quando comparado com o grupo DMEN ($p < 0.05$). Efeito esse que não foi encontrado com os outros grupos. Figura 18A mostra a marcação da proteína BMP-2 e p38 como controle.

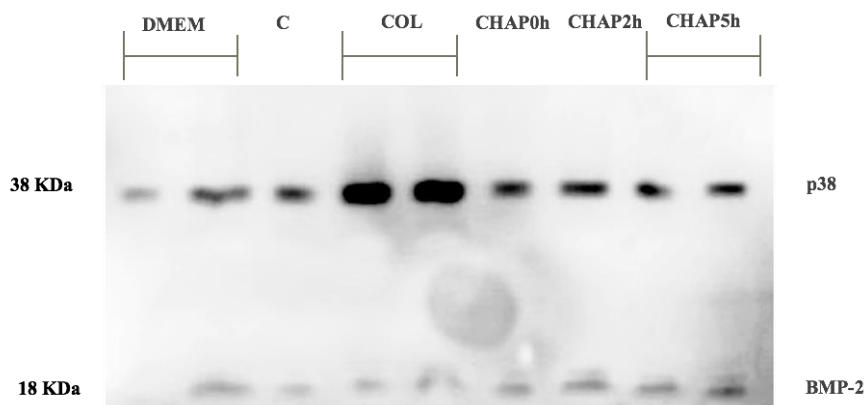


Figura 18. Efeito da nanohidroxiapatita na expressão protéica da BMP2. Análise da expressão de BMP-2 em osteoblastos após 7 dias de incubação por western blot Figura 14. Grupo DMEN (Células com o meio); Grupo C (Esponja de colágeno comercial); Grupo COL (Esponja de colágeno produzida no GQMAT); Grupo CHAP0h (Esponja de colágeno com nanoHidroxiapatitas com tratamento hidrotérmico por 0 hora); Grupo CHAP2h (Esponja de colágeno com nanoHidroxiapatitas com tratamento hidrotérmico por 2 hora); Grupo CHAP5h (Esponja de colágeno com nanoHidroxiapatitas com tratamento hidrotérmico por 5 hora).

6.6 Análise histopatológica do infiltrado celular no tecido subcutâneo adjacente às membranas

O influxo celular agudo no tecido subcutâneo adjacente às membranas foi avaliado por H&E. Para este estudo, somente três grupos foram avaliados, respectivamente grupo C, grupo COL e grupo CHAP5h, posto que esse último grupo apresentou os melhores resultados no estudo *in vitro*. Ao avaliar as alterações histológicas ocasionadas pelo grupo C, grupo COL e grupo CHAP5h, observou-se que com 24h de implantação todas as membranas induziram recrutamento de células inflamatórias (predominantemente de polimorfonucleares) (Figura 19 A-C). Todavia, após 7 e 15 dias de implantação, os grupos COL e CHAP5h apresentaram menor infiltrado de células inflamatórias comparado ao grupo C (membrana comercial) (Figura 19 D-I).

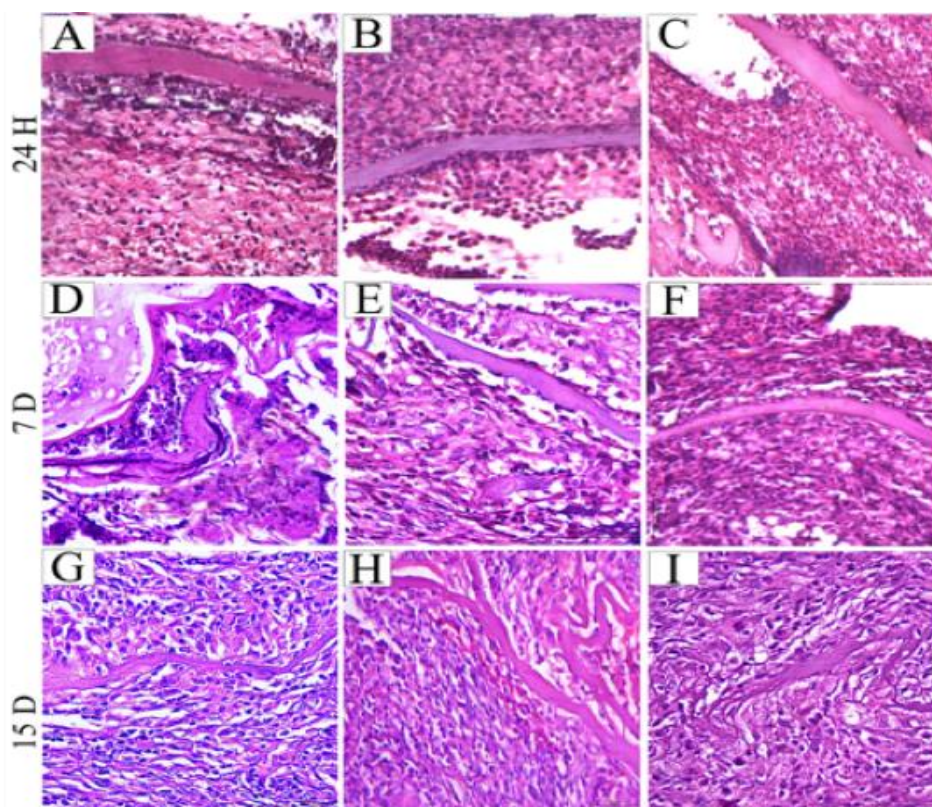


Figura 19: Fotomicrografia do tecido subcutâneo adjacente às membranas corada por H&E. O infiltrado inflamatório é observado pela presença de células mononucleares e polimorfonucleares presentes nas diferentes imagens. A Figura apresenta os diferentes grupos em dois tempos, 24h e 7 dias após a implantação das esponjas subcutaneamente. Grupo C (Esponja de colágeno comercial) (A-D-G); Grupo COL (B-E-H); Grupo CHAP5h (C-F-I).

6.7 Atividade de mieloperoxidase (MPO) no tecido subcutâneo adjacente às membranas

Além da contagem de células, é possível avaliar a atividade de MPO no tecido subcutâneo adjacente às membranas. A MPO é um marcador estabelecido para quantificar neutrófilos, embora possa ser produzida por outras células. Como podemos observar, não houve diferença estatística entre os grupos com relação a atividade de MPO no período de 24 horas (Figura 20A), porém no dia 7, houve diminuição estatisticamente dessa enzima nos grupos COL e CHAP5h quando comparado ao grupo C (membrana comercial) (Figura 20B).

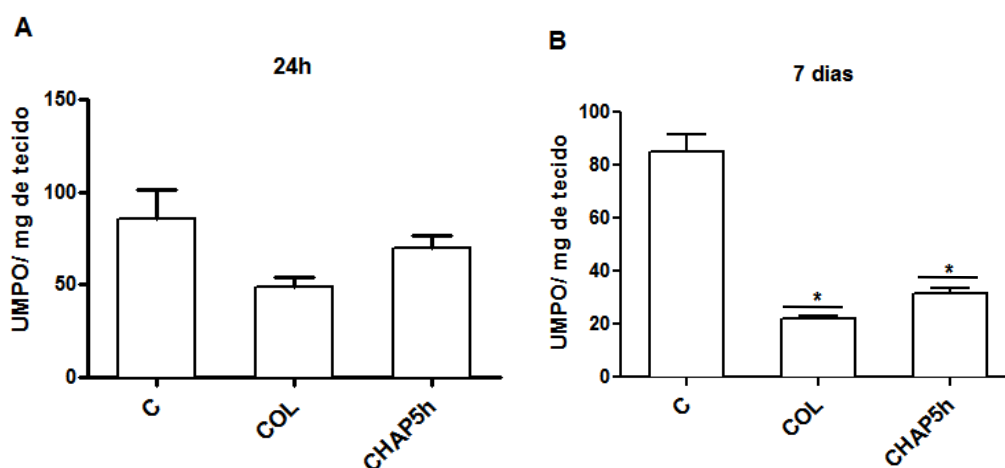


Figura 20. Efeito de esponja de colágeno incorporada com nanohidroxiapatita sobre a atividade da mieloperoxidase em tecido subcutâneo adjacente às membranas. Os animais foram sacrificados com 24h e 7^o dias (A, B, respectivamente), e as esponjas e tecidos circunjacentes removidos para o ensaio. Grupo C (Esponja de colágeno comercial); Grupo COL (Esponja de colágeno produzida no GQMAT); Grupo CHAP5h (Esponja de colágeno com nanoHidroxiapatitas com tratamento hidrotérmico por 5 horas). A atividade enzimática foi realizada segundo descrito nos materiais e métodos e os dados foram expressos como média \pm e. p. m de 6 animais. * $p < 0,05$ em relação ao grupo C (ANOVA bivariada seguida pelo teste de Bonferroni).

6.8 Dosagem de citocinas TNF- α e IL-1 β no tecido subcutâneo adjacente às membranas

As concentrações das citocina pró-inflamatória TNF- α apresentaram-se elevados em todos os grupos analisados nas primeiras 24h e 7 dias após a implantação das esponjas. Porém, não houve diferença entre os grupos (Figura 21A-B). Já as concentrações das citocinas pró-inflamatória IL-1 β apresentaram-se insignificante (Nível < 2 pg/ml) em todos os grupos analisados nas primeiras 24h e 7 dias após a implantação das esponjas (Figura 21 C-D).

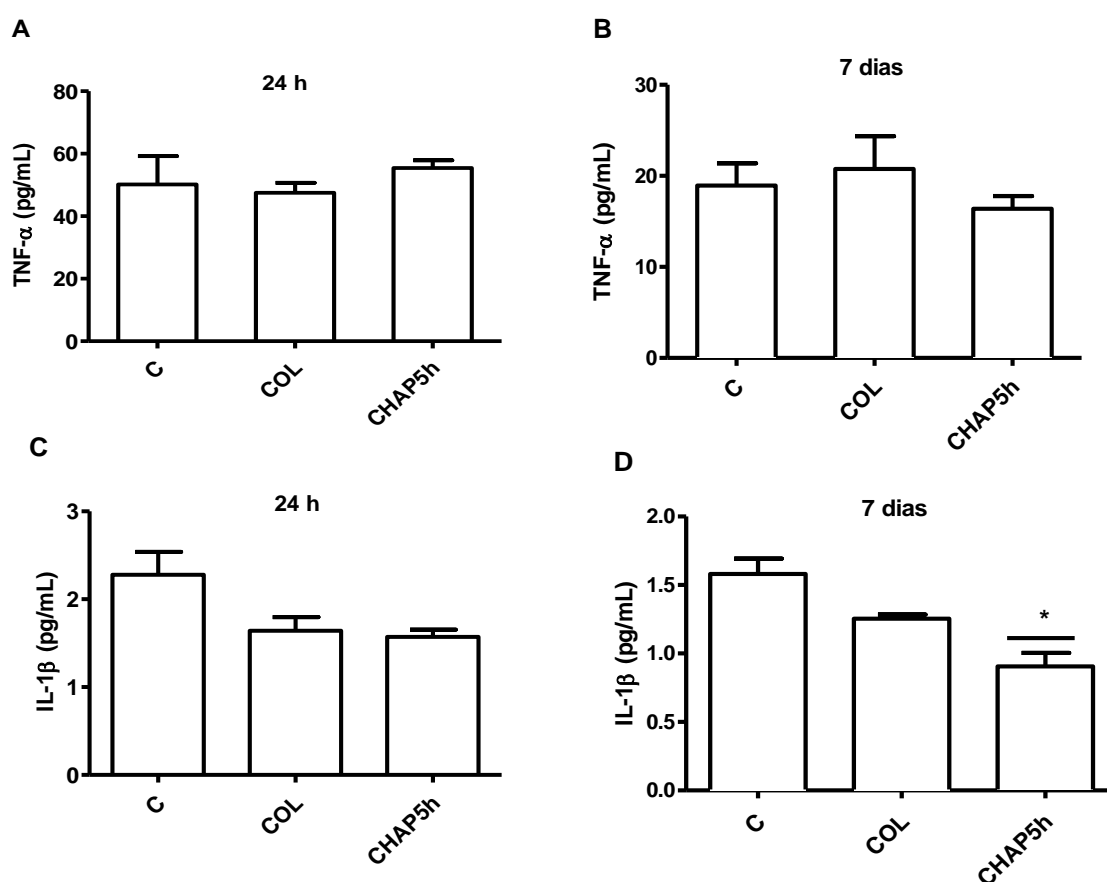


Figura 21. Efeito de esponja de colágeno incorporada com nanohidroxiapatita sobre a liberação de citocinas inflamatórias. Os animais foram sacrificados com 24h e 7^o dias (A e C, B e D), respectivamente), e as esponjas e tecidos circunjacentes removidos para a dosagem de citocinas inflamatórias. Grupo C (Esponja de colágeno comercial); Grupo COL (Esponja de colágeno produzida no GQMAT); Grupo CHAP5h (Esponja de colágeno com nanoHidroxiapatitas com tratamento hidrotérmico por 5 hora). As dosagens das citocinas foram realizadas utilizando kit de ELISA e os dados foram expressos em pg/ml e como média \pm e. p. m de 6 animais. * $p < 0,05$ em relação ao grupo C (ANOVA bivariada seguida pelo teste de Bonferroni).

6.9 Imunohistoquímica para IL-1 β no tecido subcutâneo adjacente às esponjas

Expressão de IL-1 β no tecido subcutâneo adjacente às membranas foi avaliado por imunohistoquímica. Neste estudo, os resultados mostraram que com 7 dias de implantação todas as esponjas induziram imunomarcação para IL-1 β (Figura 22 A-C). Entretanto, o grupo CHAP5h apresentou menor imunomarcação (Figura 22C).

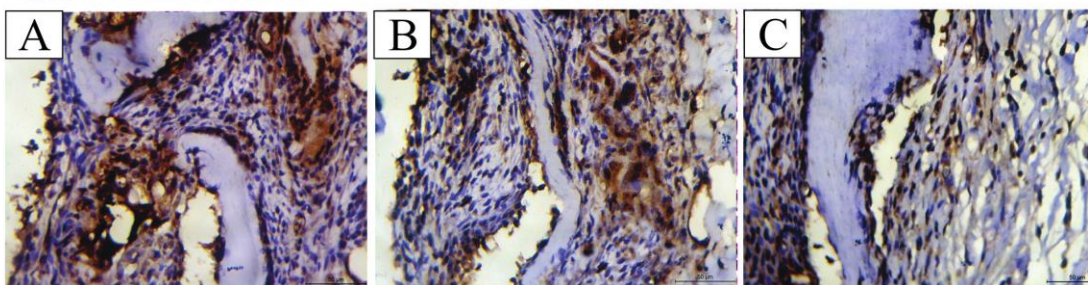


Figura 22. Fotomicrografia do tecido subcutâneo adjacente às membranas corada por H&E. A imunomarcação para IL-1 β é observada a partir da presença de células marcadas em castanho presentes nas diferentes imagens. A Figura apresenta os diferentes grupos no período de 7 dias após a implantação das esponjas subcutaneamente. Grupo C (Esponja de colágeno comercial) (Figura A); Grupo COL (Esponja de colágeno produzida no GQMAT) (Figura B); Grupo CHAP5h (Esponja de colágeno com nanoHidroxiapatitas com tratamento hidrotérmico por 5 hora) (Figura C).

Na Figura 20, referente à 7 dias, confirmam os dados descritos anteriormente, uma vez que é possível diferenciar o grupo CHAP5h quando o número de células positivas para IL-1 β foram avaliados, e com diferença estatística, quando comparado ao grupo C (*p<0,05).

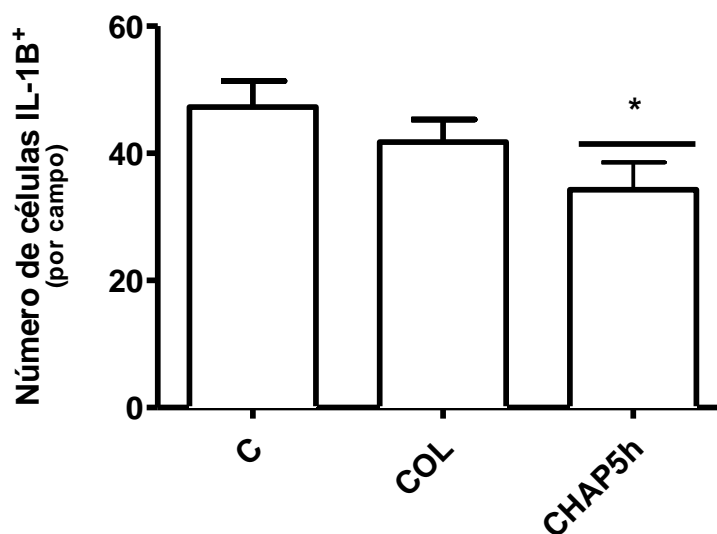


Figura 23. Efeito de esponja de colágeno incorporada com nanohidroxiapatita sobre a imunomarcagem para IL-1 α em tecido subcutâneo adjacente à membranas. Os animais foram sacrificados com 7º dia, e as esponjas e tecidos circunjacentes removidos para o ensaio. Avaliação o número de células imunomarcadas para IL-1 β no tecido. Grupo C (Esponja de colágeno comercial); Grupo COL (Esponja de colágeno produzida no GQMAT); Grupo CHAP5h (Esponja de colágeno com nanoHidroxiapatitas com tratamento hidrotérmico por 5 hora). O número de células IL-1 β positivas foram contadas por campo e os dados foram expressos como média \pm e. p. m. *p<0,05 em relação ao grupo C (ANOVA bivariada seguida pelo teste de Bonferroni)

6.10 Análise morfométrica qualitativa e quantitativa de colágeno por image J após coloração com Tricromo de Masson

O colágeno no tecido subcutâneo adjacente às membranas foi avaliado por tricromo de Masson. Para este estudo, somente três grupos foram avaliados, respectivamente grupo C, grupo COL e grupo CHAP5h, após 7 dias e 15 dias. Ao avaliar as alterações histológicas ocasionadas pelo grupo C, grupo COL e grupo CHAP5h, observou-se que com 15 dias de implantação todas as membranas induziram aumento de colágeno (Figura 24:D-F).

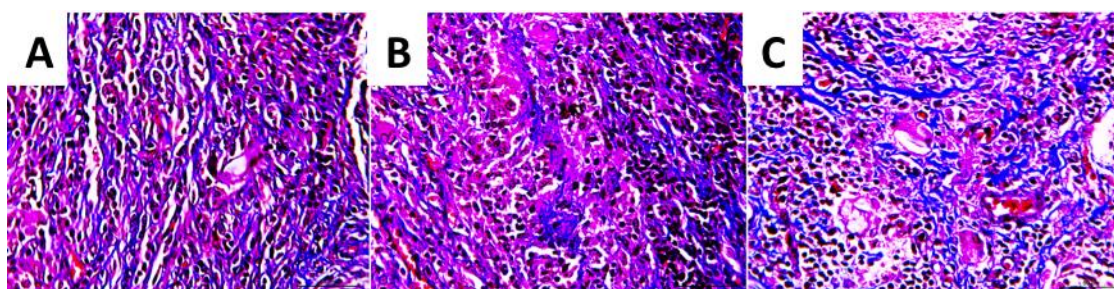


Figura 24. Fotomicrografia do tecido subcutâneo adjacente às membranas corada por Tricromo de Masson. O colágeno no tecido subcutâneo adjacente às membranas foi corado com tricromo de Masson. A Figura apresenta os diferentes grupos 15 dias (A, B e C) após a implantação das esponjas subcutaneamente. Grupo C (Esponja de colágeno comercial) (A); Grupo COL (Esponja de colágeno produzida no GQMAT) (B); Grupo CHAP5h (Esponja de colágeno com nanoHidroxiapatitas com tratamento hidrotérmico por 5 hora) (C).

A análise morfométrica quantitativa foi realizada conforme relato descrito nos materiais e métodos. O colágeno no tecido subcutâneo adjacente às membranas foi avaliado a intensidade luminosa em pixels. Os resultados mostraram que após 15 dias os grupos COL e CHAP5h apresentam maior quantidade de colágeno, quando comparado ao grupo C e CHAP2h, respectivamente (* $p < 0,05$) e (** $p < 0,05$).

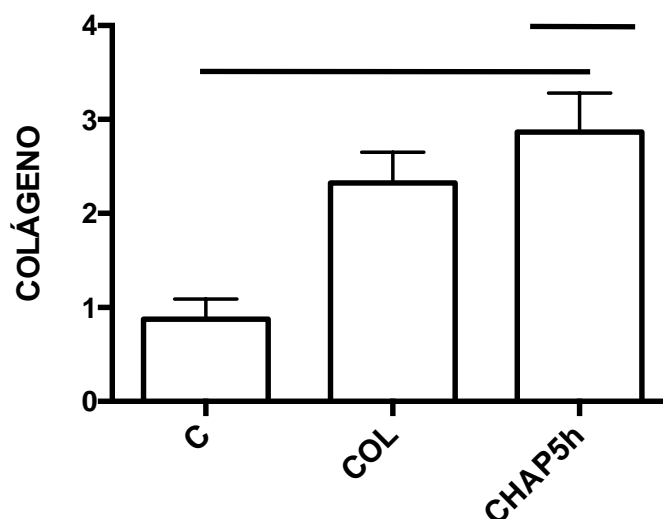


Figura 25. Análise em pixels de colágeno após coloração por Tricromo de Masson. Os animais foram eutanasiados após 15 dias, e as esponjas e tecidos circunjacentes removidos para o ensaio. Avaliação do colágeno no tecido foi avaliado em pixels. Grupo C (Esponja de colágeno comercial); Grupo COL (Esponja de colágeno produzida no GQMAT); Grupo CHAP5h (Esponja de colágeno com nanoHidroxiapatitas com tratamento hidrotérmico por 5 hora). O número de pixels foi avaliado e os dados foram expressos como média ± e. p. m. * $p < 0,05$ em relação ao grupo C, ** $p < 0,05$ em relação ao grupo COL (ANOVA bivariada seguida pelo teste de Bonferroni).

7 DISCUSSÃO

O emprego de biomateriais na regeneração óssea ocorre em escala cada vez mais ampla. Diversas pesquisas apresentam a composição de novos biomateriais aplicados na medicina regenerativa óssea com promissores resultados.

O uso dos biomateriais clinicamente deve passar essencialmente por análises em todo seu percurso de avaliação científica com ensaios pré-clínicos envolvendo experimentos *in vitro* e *in vivo* e, conseqüentemente, estudos clínicos longitudinais em humanos.

Neste estudo, propusemos avaliar o efeito da adição de nano partículas de hidroxiapatita com diferentes tamanhos e morfologia em uma matriz de colágeno aniônico em forma de arcabouço em cultura de osteoblastos (*in vitro*) e na biocompatibilidade (*in vivo*).

Primeiramente, ao avaliarmos a viabilidade de osteoblastos na presença das esponjas, mostramos que todas as esponjas não foram tóxicas aos osteoblastos nos períodos de 24 horas e 48 horas. Portanto, sugerindo que a incorporação de nanopartículas de hidroxiapatita, nessas concentrações e condições de experimento, não induz a redução do número de células. Curiosamente, a incorporação de nanopartículas de hidroxiapatita com tratamento hidrotérmico por cinco horas induziu aumento do número de células viáveis, sugerindo assim um possível efeito proliferativo sobre os osteoblastos. Como a matriz óssea é formada principalmente por colágeno e hidroxiapatita e os materiais utilizados no estudo têm esses dois compostos, torna-se possível explicar o possível efeito proliferativo dos nanomateriais, uma vez que estudos já demonstraram que colágeno e cristais de hidroxiapatita estimulam a adesão e a proliferação de osteoblastos (HATAKEYAMA et al., 2013; YOSHIDA et al., 2010; KIKUCHI, 2013; MURPHY et al., 2014; LYONS et al., 2014). Contudo, as esponjas somente com colágeno ou os nanomateriais que receberam tratamento hidrotérmico por um tempo menor, zero e duas horas, não apresentaram o mesmo efeito daquela nanopartícula que recebeu o tratamento hidrotérmico por maior tempo, mesmo todos dispondo da mesma composição e quantidade de colágeno e/ou hidroxiapatita. Assim, o tempo de tratamento hidrotérmico das nanopartículas de hidroxiapatita é fundamental para o efeito proliferativo das membranas de colágeno incorporadas com nanohidroxiapatita.

Estudo anterior revelou que a incorporação de nanohidroxiapatita a esponja de colágeno acelera a diferenciação osteogênica, quando comparada a incorporação de hidroxiapatita de tamanho macro a esponja de colágeno ou a esponja somente (HATAKEYAMA et al., 2013). Portanto, o tamanho da partícula de hidroxiapatita influencia no efeito. Como estamos trabalhando com partículas de tamanho nanométrico, ou seja, mesma escala, estudo preliminar do nosso grupo revelou que o aumento do tempo de tratamento hidrotérmico repercute com o aumento do tamanho e largura da nanopartícula, e conseqüentemente os bastões obtidos com as nanohidroxiapatitas apresentam estruturas cristalinas hexagonais mais próximas daquela hidroxiapatita presente no osso. Portanto, justificando em parte o efeito obtido com o aumento do tempo de tratamento hidrotérmico.

Para conferir maior proliferação celular no grupo com maior concentração de HA, sugerido pelo teste de viabilidade celular, investigamos o efeito proliferativo das esponjas nos osteoblastos, imunomarcando as células com Ki-67, um marcador de células em proliferação classicamente usado em todo o mundo. Além disso, ele já foi adotado em outros estudos do nosso grupo e alcançamos bons resultados no estudo dos osteoblastos. A proteína nuclear Ki-67 é amplamente usada, posto que ela é expressa exclusivamente em células em proliferação. Também ela é detectada em todas as fases do ciclo celular, ou seja, a fase do ciclo celular não restringe o seu uso, e o aumento da expressão dessa proteína tem uma alta correlação com a proliferação celular. Por essa razão, os anticorpos que reconhecem a pKi-67 são amplamente utilizados em estudos oncológicos e como marcadores de proliferação celular. Como observado nos estudos de viabilidade, no período de 24 horas, todas as esponjas foram capazes de induzir aumento do número de células viáveis, mas não repercutiu com o aumento da imunomarcagem para Ki-67. Por outro lado, após 48h, os dados mostram que o aumento da viabilidade induzida pelo grupo CHAP5h paralelamente leva ao aumento da imunomarcagem para Ki-67. Neste contexto, porque não foi observado esse aumento com 24h, embora com aumento da viabilidade. É sugerido que essa relação viabilidade e expressão de Ki-67 não seja uma relação direta do tipo linear ou logarítmica, mas paralelas, uma vez que ela é possível. Então supomos que o aumento da expressão de Ki-67 esteja acontecendo nos grupos após 24h, mas ainda a imunomarcagem não é suficiente para diferenciar os grupos.

Com o objetivo de investigar a influência das esponjas na atividade de

osteoblastos, avaliamos a atividade da FAO. Existem quatro tipos de fosfatase alcalina, mas vamos nos ater a fosfatase alcalina tecido inespecífica que é encontrada nos osteoblastos, visto que foi avaliada nesse trabalho (RADER et al., 2017, SHARMA et al., 2014). Essa enzima é extremamente importante no processo de mineralização extracelular, uma vez que ela libera fosfato inorgânico a partir de pirofosfato inorgânico presente no meio extracelular (MILLÁN & WHYTE, 2016, ORIMO 2010, GOLUB & BOESZE-BATTAGLIA, 2007). O fosfato inorgânico liberado entra na célula por transportadores de fosfato inorgânico e vai para as vesículas de matriz que também se encontram na superfície celular dos osteoblastos. Dentro da vesícula, o fosfato inorgânico irá contribuir para formação dos cristais de hidroxiapatita. Vale ressaltar que tem fosfato inorgânico sendo produzido dentro da vesícula, porém ele é produzido por uma enzima presente dentro da própria vesícula, pela ação da enzima phospho-1 sobre a fosfocolina. Sendo assim, tanto o fosfato inorgânico extracelular quanto o intracelular contribuem para a formação dos cristais de hidroxiapatita.

Diante do exposto acima, observamos que no período de 24h todas as esponjas aumentaram a atividade da FAO, porém somente o grupo CHAP5h manteve o aumento até o último dia de avaliação, ou seja, no 7º dia. Portanto, sugerindo que a morfologia de HA interfere no processo de mineralização. No presente estudo, essa capacidade das nanohidroxiapatita incorporadas a esponjas de colágeno induzir a atividade da fosfatase já foi demonstrada em outro estudo. Nesse estudo revelou que a incubação de Células SaOS-2 com esponjas de colágeno incorporadas com nanohidroxiapatita induz aumento na expressão de genes relacionado a fosfatase alcalina por até 4 semanas (HATAKEYAMA et al., 2013). Esse dado foi confirmado pelo ensaio de von Kossa que avalia a deposição de sais de cálcio, onde após 21 dias evidenciamos que a esponja CHAP5h mostrou-se osteoindutora para a formação de sais de cálcio por apresentar importante deposição desses sais, quando comparada as demais esponjas.

Similar ao nosso protocolo Moon et al., 2014 também avaliaram os depósitos de cálcio após 21 dias em culturas de osteoblastos. Além disso, recordamos que os depósitos de cálcio detectados pela técnica são produtos da ação enzimática de fosfatase alcalina e outras enzimas, então é possível avaliar a atividade enzimática antes dos produtos gerados por elas. A fim de verificar se realmente houve a adesão e crescimento das células e em qual *scaffold* do compósito estas células cresceram mais.

Além disso, investigou-se a interação das fibras de colágeno com as nanopartículas de HAP.

As micrografias do MEV mostram a superfície dos arcabouços antes do processo de incubação em cultura de células. Nessa condição, a amostra de colágeno exibiu poros interconectados de vários tamanhos em uma estrutura constituída por um arranjo de fibras organizadas randomicamente. Entretanto, não houve indícios de cristais ao longo das fibras e a análise química por EDS dessa amostra indicou que a concentração de cálcio é inexistente, confirmando assim a ausência de HAP nesse *scaffold*. Por outro lado, a amostra apresentou teor de fósforo de 8,84 %p., indicando a presença de sais de fosfatos.

As micrografias dos *scaffolds* CHAP5h e CHAP2h - antes da incubação para proliferação celular - mostram uma notável distribuição de cristais incrustados na superfície das amostras. Os valores obtidos por EDS para esses espécimes mostram uma razão Ca/P próximas a da HAP (Ca/P = 1,67) indicando, assim, que os cristais nessas amostras são aglomerados das nanopartículas de HAP. Para o *scaffold* CHAP5h, aparecem cristais hexagonais ao longo das fibras de colágeno. Nossos dados mostram que esses cristais estão intimamente ligados à rede da matriz. Além disso, há indícios de que houve crescimento desses cristais por entre as fibras dessa amostra.

Partindo desses resultados, investigamos alguns dos possíveis mecanismos envolvidos na proliferação dos osteoblastos induzido pelas esponjas com nanopartículas de hidroxiapatita. Nesta investigação a expressão protéica, por Western Blot, de marcadores relacionados à atividade de osteoblastos, como BMP-2 no período 7 dias foi avaliado.

Os nossos dados revelaram que a incorporação de nanohidroxiapatita com tratamento hidrotérmico por cinco horas na esponja induz proliferação via aumento da expressão de BMP-2. As BMPs são proteínas da superfamília do TGF- β , elas foram introduzidas cientificamente por pelo cientista Marshall Urist. Ele demonstrou que era possível induzir a formação óssea fora do sítio ósseo e, tal fenômeno, se devia a presença de proteínas que receberam o nome de proteína morfogenética óssea (SALAZAR et al., 2016). Depois elas foram identificadas, purificadas e clonadas. Entre elas destacou-se a BMP-2 e BMP-7, uma vez que estudos experimentais e clínicos, inclusive com BMP-2 recombinante, já demonstraram o papel delas no mecanismo de osteogênese e conseqüente reparação óssea (SALAZAR et al., 2016).

O mecanismo de ação da BMP-2 no desenvolvimento da osteogênese, sugere que BMP-2 se liga aos receptores de superfície para BMPs, do tipo I e II, nesse instante o receptor do tipo II fosforila o receptor do tipo I. Depois o receptor tipo I, fosforila a proteína Smad-1,5 e 8 presente no citoplasma. Smad-1,5 e 8 fosforilada se liga a Smad-4, esse complexo migra para o núcleo e ativa genes envolvidos na osteogênese (JAMES et al., 2016, SALAZAR et al., 2016, BRAGDON et al., 2011). Um desses genes é o RUNX-2 (transcription factor runt-related transcription factor 2), ele é um membro da família de fatores de transcrição RUNXs e codifica uma proteína nuclear com um domínio Runt de ligação ao DNA. Esta proteína é essencial para a diferenciação osteoblástica e morfogênese esquelética e atua como um scaffold para ácidos nucleicos e fatores reguladores envolvidos na expressão do gene esquelético (Pubmed Gene).

As esponjas de colágeno, assim como a hidroxiapatita, ou a associação esponja de colágeno e hidroxiapatita já foram extensivamente investigadas como carreadoras de BMPs, inclusive BMP-2 recombinante (ROHANIZADEH & CHUNG, 2011, YUN et al., 2014, CHOLAS et al., 2016, QUILAN et al., 2015). Contudo, nenhum estudo investigou o efeito direto da associação colágeno e hidroxiapatita sobre as BMPs, o que mantém o ineditismo do resultado. Antes do início deste trabalho, havia apenas um estudo o qual que não respondeu a forma que o escaffold de colágeno com hidroxiapatita era capaz de induzir a formação de tecido mineralizado na ausência de BMP-2 recombinante (MURPHY et al., 2014) e o segundo estudo que relatava o aumento da expressão de outros genes tais como: colágeno tipo I, sialoproteína óssea e o precursor da osteocalcina (bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein (BGLAP) em células osteoblásticas em resposta a esponjas incorporadas com nanohidroxiapatita (HATAKEYAMA et al., 2013). Então aqui trazemos essa resposta em parte, dado que à associação colágeno e hidroxiapatita per se induz a expressão de BMP-2. Isso não foi investigado e nem levantado essa hipótese no estudo de Murphy e colaboradores (2014). Também é possível que outras vias, por exemplo: RANK/OPG, bem como genes relacionados à expressão de colágeno tipo I, sialoproteína óssea e o precursor da osteocalcina (bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein (BGLAP) estejam mais expressos na presença de esponjas incorporadas com nanohidroxiapatita. Todavia, não foi possível investigar a expressão dos desses genes aqui, uma vez que o próprio colágeno estava presente nas esponja e por falta de recursos para avaliar os outros

genes.

Após concluirmos os estudos *in vitro*, onde as esponjas demonstraram possuir um grande potencial, iniciamos o estudo *in vivo* com objetivo de avaliar a biocompatibilidade. Nessa etapa utilizamos apenas três esponjas: comercial (C), COL e CHAP5h. Alguns motivos nos levaram a tal decisão. Primeiro, adotamos a esponja com nanopartícula que apresentou os melhores resultados nos parâmetros avaliados *in vitro*. Segundo, reduzimos o número de animais no experimento atendendo às boas práticas de uso de animais em experimentação. Terceiro, redução de custos, para a universidade, uma vez que os animais são fornecidos gratuitamente por ela, e para o nosso laboratório, posto que não gastamos reagente e nem material humano em experimentos desnecessários.

Inicialmente, realizamos uma coloração de H&E, para investigar a presença de inflamação tecidual ao redor das esponjas no período de 24h. Adoção desse tempo é fundamental, uma vez que a inexistência de influxo celular é um forte sinal de ausência de toxicidade. Entretanto, observamos um intenso infiltrado inflamatório, por isso resolvemos avaliar após 7 dias também. Curiosamente, o intenso infiltrado inflamatório permaneceu, mesmo após 7 dias, ou seja, essa resposta está sendo causada pelos compostos administrados, posto que o influxo celular induzido pelo trauma da administração já teria sido dirimido ou reduzido após 7 dias. Vale ressaltar por outro lado, que os animais não apresentavam vermelhidão ou edema. Também os sinais físicos estavam dentro da normalidade, ou seja, eles estavam comendo e deambulando normalmente sem sinais de estresse. Nós supomos que a administração de colágeno seja a responsável pela migração e manutenção do influxo celular, uma vez que as proteínas são bastantes conhecidas devido ao seu potencial imunogênico. Além disso, esse potencial pode ser aumentado quando a proteína é administrada por via sistêmica e/ou é proveniente de outra espécie.

A inflamação após a administração de colágeno já foi demonstrada em outros trabalhos ao longo de décadas (SRIVASTAVA et al., 1990; KIRK et al., 2013). Além do mais a reação inflamatória é importante no processo de reparo. Os locais onde os materiais a base de colágeno estavam presentes, revelavam a presença de linfócitos, macrófagos e polimorfonucleares (Neutrófilos), mesmo após 16 semanas (KIRK et al., 2013). Já nos estudos referentes à toxicidade de nanopartículas de hidroxiapatita *in vivo*, eles são escassos, exceto para um estudo usando peixe como modelo e outro trabalho

que avaliou a administração desse biomaterial por via oral durante um ano (ZHAO et al., 2013; REMYA et al., 2017). Todos os outros estudos revelam a excelente biocompatibilidade da hidroxiapatita com tecidos moles, como pele, músculo e gengivas, mas também no reparo de tecidos duros, por exemplo: reparo ósseo, bem como revestimento de implantes ou atuando como enchimento em osso ou dentes (ZHOU & LEE, 2011). Entretanto, esses dados não invalidam a relevância do nosso estudo ao usar o colágeno para a incorporação da nanohidroxiapatita, por que as nossas esponjas sem e com nanopartículas não geraram influxo celular superior e nem igual à comercial, mas reduziram o número de neutrófilos e a atividade da MPO nos sítios adjacentes a membrana principalmente após 7 dias, quando é possível excluir o influxo celular desencadeado pelo trauma da administração. Também vale salientar que nós não estamos sugerindo com isso uma atividade anti-inflamatória das esponjas com e sem nanopartículas produzidas pelo grupo, mas que elas apresentam um potencial inflamatório menor, ou seja, existe uma menor reação tecidual quando implantadas subcutaneamente, quando comparada a comercial.

Os dados revelaram que a administração das esponjas pode desencadear inflamação aguda (24h) e crônica (7dias). Diante disso, o estudo se propôs a investigar algumas possíveis citocinas envolvidas nesse processo. IL-1 β e TNF- α são citocinas que exercem papel importante no desenvolvimento de inflamação tecidual (Turner et al., 2014). Como observado acima, TNF- α está envolvido na inflamação aguda e crônica desencadeada pela administração das esponjas. Esse dado é importante, visto que, embora a inflamação local após a implantação de esponjas ou esponjas carregadas com proteínas com atividade farmacológica (ex. BMP-2 e BMP-7) sejam bem descritas na literatura (Huang et al., 2017, Willard et al., 2013, Browne et al., 2013), esse trabalho é o primeiro a demonstrar as citocinas envolvidas no mecanismo de inflamação desencadeadas por elas. Nós acreditamos que a presença de proteínas de colágeno ative os macrófagos residentes teciduais, e conseqüentemente eles quando ativados liberam TNF- α (Parameswaran & Patial, 2010). Além disso, essa citocina quando liberada, ela é capaz de induzir a quimiotaxia de células inflamatórias que são importantes fontes de citocinas (Parameswaran & Patial, 2010).

As esponjas não foram capazes de induzir a liberação de IL-1 β , uma vez que do ponto vista científico 2 pg/ml é insignificante em experimentos in vivo (IL-1 β : 8-1000 pg/ml limite de detecção kit BD Biosciences-US). Alternativamente buscamos a

imunexpressão de IL-1 β no tecido. Como observado nos resultados, ocorreu uma imunomarcção intensa para IL-1 β em todos os grupos, mesmo o grupo CHAP5h apresentando uma redução significativa no número de células positivas para IL-1 β após 7 dias. Como não é possível retirar o colágeno e assim reduzimos drasticamente à quantidade de proteínas. Nós sugerimos que as proteínas ou, até mesmo, produtos da proteólise para obtenção do colágeno (Chattopadhyay & Raines, 2014), podem estar induzindo a expressão de IL-1 β no tecido. Sendo assim, adição de nanopartícula de hidroxiapatita não aumenta a migração celular e nem as citocinas, na verdade ela gera uma redução na migração celular e na imunexpressão para IL-1 β , ou seja, concluímos que o grau de resposta inflamatória aguda e crônica pode estar associado às propriedades físicas e químicas do próprio material carreador, as esponjas.

Finalmente, ainda que as esponjas sejam de colágeno, o trabalho resolveu investigar a síntese de colágeno induzida pelas esponjas com e sem nanohidroxiapatita. Claramente as imagens não são capazes de diferenciar os grupos após 7 ou 15 dias. Contudo, a análise da luminosidade revelou um aumento nos grupos COL e CHAP5h. A relevância desse resultado do ponto de vista prático é passível de discussão, ou pelo método (análise de luminosidade) ou pela própria constituição do material (esponjas de colágeno) ou pela falta de diferenças visíveis entre os grupos. Contudo, a diferença existe e os gráficos mostram isso.

8 CONCLUSÕES

Diante dos resultados *in vitro* e *in vivo* obtidos neste trabalho, podemos concluir que as esponjas de colágeno carreadas com nanopartículas de hidroxiapatita, especificamente o grupo que foi submetido ao tratamento hidrotérmico por 5 horas (CHAP5h), pode ser utilizada como scaffolds. Os mesmos apresentaram biocompatibilidade, e um grande potencial osteocondutor, podendo ser utilizadas também como carreadores. No entanto, novos estudos são necessários a fim de se verificar o seu comportamento em um modelo de defeitos críticos em osso em animais, podendo representar uma estratégia promissora para a regeneração tecidual óssea.

REFERENCIAS

ALONSO, N.; TANIKAWA, D.Y.; FREITAS, R.D.A. S.; CANAN L, J.R.; OZAWA, T.O.; ROCHA, D.L. Evaluation of maxillary alveolar reconstruction using a resorbable collagen sponge with recombinant human bone morphogenetic protein-2 in cleft lip and palate patients. **Tissue Eng Part C Methods**. V.16, p.1183-1189, 2010.

BANORIYA, D., PUROHIT, R., DWIVEDI, R.K. Advanced Application of Polymer based Biomaterials. **Materials Today: Proceedings**. v.4, p.3534–3541, 2017.

BEZERRA, AV, **Efeito do ranelato de estrôncio na proliferação, viabilidade e ativação de osteoblastos murinos in vitro**. 2016, 54f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais. Fortaleza, Ceará, 2016.

BOYCE, B.F.; XING, L. The RANKL/RANK/OPG pathway. **Curr Osteoporos Rep**. V.3, p.98-104, 2007.

BRAGA, CM, **Avaliação do efeito de nanopartículas carregadas com sinvastatina em cultura de osteoblastos murino OFCOL II**. 2017, 62f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais. Fortaleza, Ceará, 2017.

BRAGDON, B., MOSEYCHUK, O., SALDANHA, S., KING, D., JULIAN, J., NOHE, A. Bone morphogenetic proteins: a critical review. **Cell Signal**. v.23, n.4, p.609-20, 2011.

BROWNE, S., ZEUGOLIS, D.I., PANDIT, A. Collagen: finding a solution for the source. **Tissue Eng Part A**. v.19, n.13-14, p. 1491-4, Jul. 2013.

CARVALHO, EV, **Apatitas nanoparticuladas incorporadas a matrizes poliméricas para aplicação odontológica**. 2017, 135f. tese (doutorado) – universidade federal do ceará. faculdade de química. programa de pós-graduação em química, Fortaleza, Ceará, 2017.

CHATTOPADHYAY, S., RAINES, R.T. Review collagen-based biomaterials for wound healing. **Biopolymers**. v.101, n.8, p.821-833, 2014.

CHOLAS, R. et al. Scaffolds for bone regeneration made of hydroxyapatite microspheres in a collagen matrix. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**. v.63, p.499-505, 2016.

COSTA, A.C.F.M. et al. Hidroxiapatita: obtenção, caracterização e aplicações. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**. v.43, p.29-38, 2009.

DAMADZADEH, B., JABARI, H., SKRIFVARS, M., AIROLA, K., MORITZ, N., VALLITTU, P.K. Effect of ceramic filler content on the mechanical and thermal behaviour of poly-L-lactic acid and poly-L-lactic-co-glycolic acid composites for medical applications. **J Mater Sci Mater Med**. v.21, n.9, p.2523-2531, 2010.

DELLOYE, C., CORNU, O., DRUEZ, V., BARBIER, O. Bone allografts: What they can offer and what they cannot. **J Bone Joint Surg Br.** v.89, n.5, p.574-579, 2007.

DIMITRIOU, R., MATALIOTAKIS, G.I., CALORI, G.M., GIANN, P.V. The role of barrier membranes for guided bone regeneration and restoration of large bone defects: current experimental and clinical evidence. **BMC Medicine.** 2012. doi: 10.1186/1741-7015-10-81.

ELGALI, I. Et al. Guided bone regeneration using resorbable membrane and different bone substitutes: Early histological and molecular events. **Acta Biomaterialia.** v.29, n.[S.I.], p.409-423, 2016.

GINALDI, L. & DE MARTINIS, M. Osteoimmunology and Beyond. **Current Medicinal Chemistry.** v.23, n.33, p.3754-3774, 2016.

GOLUB, E.E; BOESZE-BATTAGLIA, K. The role of alkaline phosphatase in mineralization. **Current Opinion in Orthopaedics.** v.18, n.5, p.444-448, 2007.

GÓMEZ-BARRENA, E. Bone regeneration: stem cell therapies and clinical studies in orthopaedics and traumatology. **J Cell Mol Med.** 2011. v.15, n.6, p.1266-86, 2011.

HAIDER, A., HAIDER, S., HAN, S.S., KANG, I-K. Recent advances in the synthesis, functionalization and biomedical applications of hydroxyapatite: a review. **RSC Adv.** 7:7442-7458, 2017.

HATAKEYAMA, W., TAIRA, M., CHOSA, N., KIHARA, H., ISHISAKI, A., KONDO, H. Effects of apatite particle size in two apatite/collagen composites on the osteogenic differentiation profile of osteoblastic cells. **Int J Mol Med.** v.32, n.6, p.1255-1261, 2013.

HUANG, H., WISMEIJER, D., HUNZIKER, E.B., WU, G. The acute inflammatory response to absorbed collagen sponge is not enhanced by BMP-2. **Int J Mol Sci.** 2017 Feb 25;v.18, n.3, p.ii: E498, 2017.

JAMES, A.W. et al. A Review of the Clinical Side Effects of Bone Morphogenetic Protein-2. **Tissue Eng Part B Rev.** v.22, n.4, p.284-97, 2016.

KANE, R.J. Hydroxyapatite reinforced collagen scaffolds with improved architecture and mechanical properties. **Acta Biomater.** v.17, n.[S.I.], p.16-25, 2015.

KASAJ, A., REICHERT, C., GÖTZ, H., RÖHRIG, B., SMEETS, R., WILLERSHAUSEN, B. In vitro evaluation of various bioabsorbable and nonresorbable barrier membranes for guided tissue regeneration. **Head Face Med.** v.4, p.22, 2008.

KIM, J.H. et al. Performance of Novel Nanofibrous Biopolymer Membrane for Guided Bone Regeneration within Rat Mandibular Defect. **In Vivo.** v.25, n.4, p.589-595, 2011.

KIKUCHI, M. Hydroxyapatite/collagen bone-like nanocomposite. **Biol Pharm Bull.** v.36, n.11, p.1666-1669, 2013.

KIRK, J.F. et al. Mechanical and biocompatible characterization of a cross-linked collagen-hyaluronic acid wound dressing. **Biomater.** 2013. doi:

10.4161/biom.25633. Epub 2013 Jul 29.

KRICHELDORF, F. Substitutos ósseos-Quando utilizá-los? In: Carvalho, PSP. (Ed.). Osseointegração 20 anos, Visão contemporânea da implantodontia. São Paulo: **Quintessence**, p.97-122, 2009.

LEWIECKI, E.M. New targets for intervention in the treatment of postmenopausal osteoporosis. **Nat Rev Rheumatol**. v.7, n.11, p.631-638, 2013.

LYONS, F.G. et al. The healing of bony defects by cell-free collagen-based scaffolds compared to stem cell-seeded tissue engineered constructs. **Biomaterials**. v.31, n.35, p.9232-9243, 2013.

LYONS, F.G., GLEESON, J.P., PARTAP, S., COGHLAN, K., O'BRIEN, F.J. Novel microhydroxyapatite particles in a collagen scaffold: a bioactive bone void filler? **Clin Orthop Rel Res**. v.472, n. 4, p.1318-1328, 2014.

MATTHEW, B., GREENBLATT, M.B., SHIM, J-H. Osteoimmunology: A Brief Introduction. **Immune Network**. v.13, n.4, p.111-115, 2013.

MILLÁN, J.L., WHYTE, M.P. Alkaline Phosphatase and Hypophosphatasia. **Calcif Tissue Int**. v.98, n.4, p.398-416, 2016.

MOON, J.S, et al. Relaxin augments BMP-2-induced osteoblast differentiation and bone formation. **J Bone Miner Res**. v.29, n.7, p.1586-1596, 2014.

MOSS, D.W., WHITBY, L.G.A. Alkaline phosphatase isoenzymes. Technical and clinical aspects. **Enzyme**. v. 20, n. 1, p. 20-34, 1975.

MURPHY, C.M. et al. A collagen-hydroxyapatite scaffold allows for binding and co-delivery of recombinant bone morphogenetic proteins and bisphosphonates. **Acta Biomater**. v.10, n.5, p.2250-2258, 2014.

Nguyen, T.T. et al.. Regeneration of tissues of the oral complex: current clinical trends and research advances. **J Can Dent Assoc**.79:d1, 2013.

ORIMO, H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. **J Nippon Med Sch**. v.77, n.1, p.4-12, 2010.

ONAL M. et al. Receptor activator of nuclear factor kB ligand (RANKL) protein expression expression by B lymphocytes contributes to ovariectomy-induced bone loss. **J Biol Chem**. v.287, n.35, p.29851-29856, 2012.

PARAMESWARAN, N., PATIAL, S. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr**. v.20, n.2, p.87-103, 2010.

QUINLAN, E., THOMPSON, E.M., MATSIKO, A., O'BRIEN, F.J., LÓPEZ-NORIEGA, A. Long-term controlled delivery of rhBMP-2 from collagen hydroxyapatite scaffolds for superior bone tissue regeneration. **J Control Release**. v.10, n.207, p.112-129, 2015.

PEREIRA, A., VAZ, P., ROCHA, G., FELINO, A., TAVARES, P. Engenharia genética em implantologia – o rankl. **Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilofac.**v.52, n.3, p.170–174, 2011.

PIGOSSI, S.C. et al. Bacterial cellulose-hydroxyapatite composites with osteogenic growth peptide (OGP) or pentapeptide OGP on bone regeneration in critical size calvarial defect model. **J Biomed Mater Res A.** v.103, n.10, p.3397-3406, 2015.

PISTONE, A., IANNAZZO, D., PANSERI, S., MONTESI, M., TAMPIERI, A., GALVAGNO, S. Hydroxyapatite-magnetite-MWCNT nanocomposite as a biocompatible multifunctional drug delivery system for bone tissue engineering. **Nanotechnology.** v.25, n.42, p.425701, 2014.

RADER, B.A. Alkaline Phosphatase, an Unconventional Immune Protein. **Front Immunol.** v.3, n.8, p.897, 2017.

REMYA, N.S., SYAMA, S., SABAREESWARAN, A., MOHANAN, P.V. Investigation of chronic toxicity of hydroxyapatite nanoparticles administered orally for one year in wistar rats. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.** v.1, n.76, p.518-527, 2017.

RODELLA, L.F., FAVERO, G., LABANCA, M. Biomaterials in Maxillofacial Surgery: Membranes and Grafts. **Int J Biomed Sci.** v.7, n.2, p.81-88, 2011.

ROHANIZADEH, R., CHUNG, K. Hydroxyapatite as a carrier for bone morphogenetic protein. **J Oral Implantol.** v.37, n.6, p.659-672, 2011.

ROSKAMP, L.L., VAZ, R.S., LIMA, J.H.C. Immunological factors involved on hard tissue resorption in the periodontal disease. **Rev. Bras. Alerg. Imunopatol.** v.29, n.6, p. 250-255, 2006.

SALAZAR, V.S., GAMER, L.W., ROSEN, V. BMP signaling in skeletal development, development, disease and repair. **Nat Rev Endocrinol.** v.12, n.4, p.203-221, 2016.

SHARMA, U., PAL, D., PRASAD, R. **Alkaline phosphatase: an overview.** **Indian J Clin Biochem.** v.29, n.3, p.269-278, 2014.

SHEN, J., NAIR, A., SAXENA, R., ZHANG, C.C., BORRELLI, J. J.R., TANG, L. Tissue engineering bone using autologous progenitor cells in the peritoneum. **PLoS One.** 2014 Mar 28;9(3):e93514. doi: 10.1371/journal.pone.0093514.

SRIVASTAVA, S., GORHAM, S.D, FRENCH, D.A, SHIVAS, A.A, COURTNEY, JM. In vivo evaluation and comparison of collagen, acetylated collagen and collagen/glycosaminoglycan composite films and sponges as candidate biomaterials. **Biomaterials.** v. 11, n.3, p.155-161, 1990.

SUVIK, A., EFFENDY A. W. M. The use of modified Masson's trichrome staining in collagen evaluation in wound healing study. **Malaysian Journal of Veterinary Research (Malaysia).** v.3, n.1, p. 39-47, 2012.

SWEENEY, L.; LANCASTER, W.P.; DEAN, N.R.; MAGNUSON, J.S.; CARROLL, W.R.; LOUIS, P.J.; ROSENTHAL, E.L. Use of recombinant bone morphogenetic protein 2 in

free flap reconstruction for osteonecrosis of the mandible. **J Oral Maxillofac Surg.** V.70, p.1991-1996, 2012.

TATHE, A., GHODKE, M., NIKALJE, A.P. A brief review: biomaterials and their application. **International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences.** v.2, n.4, p.19-23, 2010.

TIAN H, TANG Z, ZHUANG X, CHEN X, JING X. Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. **Progress in Polymer Science.** v.37, n.2, p.237-280, 2012.

TURNER, M.D., NEDJAI, B., HURST, T., PENNINGTON, D.J. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochim Biophys Acta.** v.1843, n.11, p.2563-2582, 2014.

TSAY, J. et al. Bone loss caused by iron overload in a murine model: importance of oxidative stress. **Blood.** v.116, n.14, p.2582-2589, 2010.

VERÍSSIMO, DM. **Avaliação da biocompatibilidade e bioatividade de membranas colágeno polianiónico mineralizadas e reticuladas em modelos de animais.** 2012. 168 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, 2012.

WANG, H., LI, Y., ZUO, Y., LI, J., MA, S., CHENG, L. Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic nano-hydroxyapatite/polyamide composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials.** v.28, n., p.3338-3348, 2007.

WEITZMANN, M.N. The Role of Inflammatory Cytokines, the RANKL/OPG Axis, and the Immunoskeletal Interface in Physiological Bone Turnover and Osteoporosis. **Scientifica (Cairo).** 2013. doi: 10.1155/2013/125705.

WILLARD, J.J. Et al. Plant-derived human collagen scaffolds for skin tissue engineering. **Tissue Eng Part A.** v.19, n.13-14, p.1507-1518, 2013.

YOSHIDA, T., KIKUCHI, M., KOYAMA, Y., TAKAKUDA, K. Osteogenic activity of MG63 cells on bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite sponges. **J Mater Sci Mater Med.** v.21, n.4, p.1263-1272, 2010.

YUN, P.Y., KIM, Y.K., JEONG, K.I., PARK, J.C., CHOI, Y.J. Influence of bone morphogenetic protein and proportion of hydroxyapatite on new bone formation in biphasic calcium phosphate graft: two pilot studies in animal bony defect model. **J Craniomaxillofac Surg.** v.42, n.8, p.1909-1917, 2014.

ZHAO, X. et al. Evaluating the toxicity of hydroxyapatite nanoparticles in catfish cells and zebrafish embryos. **Small.** v.27, n.9, p.1734-1741, 2013.

ZHOU, H. & LEE, J. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. **Acta Biomater.** v.7, n.7, p.2769-2781, 2011.

APENDICE



Universidade Federal do Ceará
 Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
 Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
 Cep: 60430-270 Fortaleza-CE

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "ESPONJAS DE COLÁGENO IMPREGNADAS COM NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA EM MODELO DE REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA EM DEFEITO CRÍTICO NA CALVÁRIA DE RATOS : ESTUDO DA BIOCAMPATILIDADE E BIOATIVIDADE ", protocolo nº 25/2017, sob-responsabilidade da Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de nº8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 17 de agosto de 2017.

Vigência do projeto	01/09/2017 a 31/03/2018
Espécie/Linhagem	Ratos heterogênico Wistar
Nº de Animais	114
Peso/Idade	180/200g
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 18 de agosto de 2017.

Alexandre Havt Bindá

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
 Coordenador do CEUA - UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
 ALEXANDRE HAVT BINDÁ
 COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E USO DE ANIMAIS - CEUA/UFC - MATRÍCULA SIAPF-1622001