

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

HENRIQUE MÜLLER DE QUEVEDO

MATRIZ COLAGENOSA EM SITUAÇÕES DE REGENERAÇÃO ÓSSEA

Porto Alegre

2012

HENRIQUE MÜLLER DE QUEVEDO

MATRIZ COLAGENOSA EM SITUAÇÕES DE REGENERAÇÃO ÓSSEA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Cirurgião-Dentista.

Orientador: Prof. Dra. Anna Christina
Medeiros Fossati

Porto Alegre

2012

CIP – Catalogação na Publicação

Quevedo, Henrique Müller de
Matriz colagenosa em situações de regeneração óssea / Henrique
Müller de Quevedo. – 2012.
40 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Curso
de Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

Orientador: Anna Christina Medeiros Fossati

1. Regeneração óssea. 2. Colágeno. 3. Células-tronco
I. Fossati, Anna Christina Medeiros II. Título.

Aos meus pais, que depositaram toda sua confiança, amor, dedicação e incentivos na minha formação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Professora Dr^a Anna Christina Medeiros Fossati pela orientação durante todo o curso.

Ao doutorando Me. Gerson Arysoly Acasigua, que colaborou para a realização deste trabalho com auxílio técnico-científico.

As funcionárias do Laboratório de Patologia Bucal, Alessandra Magnusson e Cris Krebs, pelo auxílio técnico neste trabalho.

Às funcionárias da biblioteca, pela paciência e dedicação em auxiliar na busca por periódicos e na formatação deste trabalho.

Ao meu irmão, Rafael, minha mãe, Daniela, e meu pai, Alexandre, pela compreensão e apoio durante todo o curso.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

QUEVEDO, H.M. **Matriz colagenosa em situações de regeneração óssea**. 2012. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

A Engenharia de Tecidos é um dos campos mais pesquisados na ciência atual, onde há a utilização de matrizes (*scaffolds*) que simulam uma matriz extracelular, funcionando como arcabouço para a adesão e proliferação de células tronco. Procura-se nesse estudo, verificar a expressão da porção colagenosa em situações de regeneração de perdas ósseas, utilizando-se *scaffolds* de PLGA com ou sem células tronco e estabelecer um protocolo preciso e eficaz de quantificação do tecido colagenoso através de um método histológico. Neste estudo foram utilizados ratos (n=9) Wistar machos, com 60 dias, e confeccionado cirurgicamente um defeito ósseo crítico (8mm) na calota craniana. Foram divididos em três grupos experimentais: Grupo 1- inserido somente *scaffold*, grupo 2 - inserido *scaffold* acompanhado de células tronco indiferenciadas provenientes da polpa de dentes decíduos e o grupo 3 - inserido *scaffold* acompanhado de células tronco diferenciadas em meio osteogênico. Aos 60 dias pós cirúrgicos, os ratos foram sacrificados e suas calotas cranianas contendo o defeito removidas para processamento histológico. Foi realizada a coloração de Tricrômico de Masson, onde as fibras colágenas se coram em azul, e as amostras analisadas através do software *Photofiltre* e *ImageJ* que calculou a porcentagem média de colágeno (total e compacto) nas áreas do defeito ósseo criado. A análise dos resultados indicou uma maior produção de colágeno total (88%) no grupo 3 (*scaffold* + células tronco diferenciadas), uma produção intermediária (49,9%) no grupo 1 (*scaffold*) e uma produção menor (20,6%) de colágeno no grupo 2 (*scaffold* + células tronco indiferenciadas), sendo estas diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$). O grupo 3 apresentou maior formação de colágeno compacto em relação aos grupos 1 e grupo 2 ($p < 0,05$), sendo que estes não apresentaram diferença estatística significativa entre si. O estudo concluiu que a utilização do *scaffold* acompanhado de células tronco diferenciadas em meio osteogênico promove uma produção maior de fibras colágenas que serão utilizadas no processo de regeneração óssea e que o método de análise criado para a análise e quantificação das fibras colágenas se mostrou eficaz e preciso, proporcionando resultados metodologicamente padronizados.

Palavras-chave: Regeneração Óssea. Colágeno. Células-Tronco.

ABSTRACT

QUEVEDO, H.M. **Colagenous matrix during bone regeneration**.2012. 40p. Final Paper (Graduation in Dentistry) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

Tissue engineering is one of the most researched fields in modern science, where artificial matrices (scaffolds) are used to simulate the extracellular matrix. These scaffolds work as a site for the adhesion and proliferation of stem cells. The objective of this study was to evaluate the expression of the collagen tissue in situations of bone regeneration, utilizing scaffolds with or without stem cells, and create an efficient and precise protocol for the quantification of the collagen fibers through an histological method. In this study, 60 days old male Wistar mice (n=9) were utilized and an 8mm critical-size bone defect was surgically made. The mice were divided into three experimental groups: Group 1 – inserted only scaffold, group 2 – inserted scaffold with undifferentiated stem cells removed from the pulp of deciduous teeth, group 3 – inserted scaffold with stem cells differentiated into an osteogenic medium. Sixty days after surgery, the mice were killed and its calvaria containing the defect removed for histological processing. The samples were colored through Masson stain and a consistent methodology was established to quantify the collagen fibers (total and compacted) through the software *Photofiltre* and *ImageJ* in the created critical-size bone defects. The analysis showed a significantly higher production of collagen in group 3 (scaffold + differentiated SC), group 1 showed an intermediate production, and group 2 (scaffold + undifferentiated SC) showed a smaller production of collagen, with statistical difference amongst all groups ($p < 0,05$). Group 3 showed a significantly higher ($p < 0,05$) presence of compacted collagen compared to groups 1 and 2, which did not show statistical difference between them. The study concluded that the utilization of scaffolds with pre-differentiated stem cells promotes a higher production of collagen fibers (which will be utilized further on to bone regeneration), and that the created protocol for collagen fiber quantification was precise and efficient, producing methodologically standardized results.

Keywords: Bone Regeneration. Collagen. Stem Cells.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1	ESTRUTURA DO TECIDO ÓSSEO.....	9
2.2	MATRIZ ÓSSEA.....	10
2.3	HISTOGÊNESE DO OSSO.....	12
2.4	MECANISMO DE CALCIFICAÇÃO.....	12
2.5	REPARO ÓSSEO.....	13
2.6	DEFEITO ÓSSEO CRÍTICO	13
2.7	ENXERTOS ÓSSEOS.....	14
3	OBJETIVOS	15
3.1	GERAL.....	15
3.2	ESPECÍFICOS.....	15
4	METODOLOGIA	16
4.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	16
4.2	EQUIPE DE TRABALHO.....	16
4.3	LOCAL DE REALIZAÇÃO	16
4.4	ANIMAIS	16
4.5	TÉCNICA CIRÚRGICA.....	17
4.7	PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS	19
4.8	ANÁLISE DOS RESULTADOS	20
5	RESULTADOS	28
6	DISCUSSÃO	30
7	CONCLUSÃO	33
	REFERÊNCIAS	34
	ANEXO A – PROTOCOLO DE COLORAÇÃO TRICRÔMICO DE MASSON	37

ANEXO B - ORÇAMENTO	38
ANEXO C – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE PESQUISA FO-UFRGS .	39
ANEXO D – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA UFRGS	40

1 INTRODUÇÃO

O que diferencia o osso de outros tecidos é que seus componentes extracelulares se encontram calcificados o tornando duro e resistente, o que é essencial para suas funções de suporte e proteção. O osso possui diversas funções como suporte interno ao corpo humano, adesão de músculos e tendões essenciais para locomoção, proteção de órgãos vitais, abriga a medula óssea e serve como reserva de cálcio que pode ser absorvido pelo organismo sempre que preciso para regulação homeostática do corpo. O osso possui componentes celulares (osteoblastos e osteócitos) que fazem a deposição e manutenção de sua matriz extracelular. A parte orgânica dessa matriz é composta em sua grande maioria por colágeno tipo I e certa quantidade de proteoglicanas e glicoproteínas (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2008).

Entre as técnicas utilizadas para a Engenharia de Tecidos, há a utilização de estruturas, ou moldes, também conhecidos como *scaffolds*, que quando associados à células, simulam uma matriz extracelular, funcionando como arcabouço para a adesão e proliferação das células. Os *scaffolds* podem ser produzidos a partir de diferentes materiais, naturais ou sintéticos, tais como colágeno ou polímeros, que devem ser biocompatíveis e biodegradáveis para serem introduzidos no organismo animal (EL AMIN, 2003).

As células-tronco são um tipo celular não-especializado (indiferenciado), que pode fazer auto-renovação e manter-se por um longo período de tempo com o potencial de derivar para uma linhagem celular com funções especializadas. O ser humano possui diferentes nichos de células-tronco adultas: entre as populações estudadas existem as células-tronco identificadas na polpa de dentes decíduos, que são provenientes de uma fonte de fácil acesso (BERNARDI, 2009). O uso das células-tronco associadas aos *scaffolds*, tem se constituído em um dos meios de sucesso na bioengenharia de tecidos (CONRAD, 2005).

Este estudo procurou analisar a produção de fibras colágenas em situações de regeneração de perdas ósseas, utilizando se *scaffolds* de PLGA com ou sem células tronco e estabelecer um protocolo preciso e eficaz de quantificação do tecido colagenoso através de um método histológico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ESTRUTURA DO TECIDO ÓSSEO

O osso humano, bem como outros tecidos, é composto por células, e substância extracelular (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2008). Macroscopicamente, é possível se observar dois tipos de osso: compacto e esponjoso. O osso esponjoso é composto por espículas ósseas num arranjo tridimensional delimitando um sistema de canais ocupados pela medula óssea, enquanto o osso compacto é composto por uma massa contínua e sólida, em que seus canais podem somente ser observados através de um microscópio. Esses dois tipos de ossos se intercalam dependendo da maturidade do osso, sem que haja uma barreira os separando. Também é possível observar uma camada de tecido conjuntivo especializada com capacidade osteogênica chamada periósteo. Esse periósteo envolve quase todo tecido ósseo com certas exceções como áreas cobertas por cartilagem em ossos longos e inserções de ligamentos e tendões. Onde há falta desse periósteo funcional o osso não possui potencial osteogênico, não contribuindo na regeneração de fraturas nesses locais. (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2008; PAWLINA, 2008)

Microscopicamente o osso é composto por uma matriz mineralizada depositada em camadas chamadas lamelas. O osso esponjoso, devido à sua espessura reduzida, é composto por lamelas paralelas, através das quais pode se observar pequenas lacunas espalhadas nas quais se encontram osteócitos. Saindo em todas as direções das lacunas podem se observar canalículos nutricionais que penetram nas lamelas e se anastomosam com os canalículos vizinhos, sendo essenciais para a nutrição das células do osso. No osso compacto, as lamelas são organizadas concêntricamente ao redor de canais vasculares, formando unidades cilíndricas chamadas de sistema de Havers. No centro desses sistemas se encontram canais longitudinais chamados de canais de Havers que possuem de um a dois vasos sanguíneos. Os canais de Havers estão conectados entre si, com a superfície e com a medula através de canais oblíquos chamados canais de Volkman. Entre as lamelas concêntricas, se pode observar os osteócitos, com os canais nutricionais voltados para a região vascular (TEN CATE, 2001; BERKOVITZ, 2004).

A ancoragem do periósteo ao osso é auxiliada por fibras colágenas espessas chamadas de fibras de Sharpey, essas fibras surgem da parte externa fibrosa do periósteo e penetram na lamela se calcificando. As cavidades internas do osso

também são recobertas por uma camada de células osteogênicas semelhantes ao periósteo, porém muito mais fina, chamada de endósteo. Todas as cavidades internas do osso incluindo os canais de Havers e cavidades da medula são cobertas pelo endósteo (KATCHBURIAN, ARANA, 2004; TEN CATE, 2001; BERKOVITZ, 2004).

2.2 MATRIZ ÓSSEA

A substância intersticial do osso é composta principalmente de 2 componentes, uma matriz orgânica compondo em torno de 35% de sua estrutura, e uma matriz inorgânica compondo 65%, sendo composta por sais de cálcio e fosfato sob a forma de cristais de hidroxiapatita principalmente. A parte orgânica da matriz é formada por fibras colágenas contituídas em sua grande maioria (95%) de colágeno tipo I e certa quantidade de proteoglicanas e glicoproteínas. Estas moléculas não colagenosas encontradas no osso tem participação no processo de mineralização da matriz pois outros tecidos ricos em colágeno I, que não contêm as mesmas moléculas, acabam não se mineralizando (KATCHBURIAN E ARANA, 2004; VAN DER REST, GARRONE, 1991). A associação da hidroxiapatita com as fibras colágenas é responsável pela dureza e resistência do tecido ósseo, sendo a parte orgânica (colágeno) responsável pela flexibilidade e resiliência do osso (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2008)

A matriz orgânica do osso apesar de ser formada principalmente por colágeno tipo I também possui em menor extensão o colágeno tipo V e quantidades residuais de colágeno tipo III, XI e XIII. A matriz não colagenosa do osso contém diversas proteínas que constituem a substância fundamental, essenciais no desenvolvimento, crescimento, remodelação e reparos ósseos. As proteoglicanas contribuem para a força compressiva do osso, sendo responsáveis também por se ligar aos fatores de crescimento. As glicoproteínas, como a osteonectina, ligam o colágeno aos cristais de hidroxiapatita já formados. As proteínas vitamina K-dependentes, como a osteocalcina, capturam o cálcio da circulação e estimulam osteoclastos para a remodelação óssea. As citocinas, entre elas os fatores de crescimento, como o grupo das BMPs que induzem a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos, atualmente são utilizadas (BMP-7) para induzir crescimento ósseo em cirurgias de grandes defeitos ósseos e implantes (PAWLINA, 2008; VAN DER REST, GARRONE, 1991).

Em ossos maduros, as fibras colágenas são altamente organizadas, sendo paralelas umas as outras em cada lamela de um ósteon, mas mudam de direção em relação as lamelas sucessivas vizinhas. Essa mudança de orientação é responsável pelas áreas mais claras e escuras nos sistemas de Havers, quando observados em microscopia de luz. Ao longo do eixo dos canais de Havers, as fibras colágenas correm helicoidalmente, mudando levemente de direção entre um canal e outro. A parte mineral do osso se organiza em forma de longos bastões de cristal de hidróxiapatita, que se organizam dependendo da conformação das fibras colágenas. Como as fibras de colágeno tipo I têm um arranjo paralelo, os cristais de hidróxiapatita se organizam nos espaços deixados entre uma fibra colágena e outra (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2008; REISER et al., 1992; TEN CATE, 2001).

O esqueleto mamífero consiste de ossos que são formados de duas formas diferentes. Ossos longos são formados através da ossificação endocondral e ossos chatos sofrem ossificação intramembranosa sendo que esses dois modos de formação acabam resultando em diferentes composições. Ao ser analisada as diferentes composições de ossos chatos e longos se observou que ossos chatos possuem 8x mais colágeno solúvel e 4x mais osteoglicina (proteína de matriz expressa por osteoblastos envolvida com a inibição da mineralização), enquanto ossos longos possuem 3x mais condrocalcina (peptídeo que participa na calcificação da cartilagem), 4x mais trombospondina-1 (atua na proliferação e migração celular) e 3x mais fosfoproteína secretada 24 (parte do complexo fetuína-mineral que inibe a mineralização captando cálcio e fósforo). As variações de solubilidade do colágeno coincidiram com diferenças no *crosslinking* do colágeno, essas diferenças no *crosslinking* do colágeno podem explicar as diferentes cadeias proteolíticas que os osteoclastos utilizam para degradar o osso. Essas distinções de composição protéica sugerem diferenças funcionais na formação, reabsorção e propriedades mecânicas desses dois tipos ósseos. Essas variações de composição são extremamente relevantes para o entendimento dos defeitos de formação óssea, pois algum defeito em uma proteína ou enzima específica afetaria mais a formação de um tipo de osso e menos a de outro (VAN DEN BOS, 2008).

Para se entender melhor a etiologia das doenças ósseas, a matriz extracelular deve ser considerada. A matriz extracelular modula a força de tensão e as propriedades de crescimento celular ósseo, sendo essas duas propriedades

essenciais para o desenvolvimento de um osso mecanicamente forte, resistente e bem estruturado (VELLEMAN, 2000).

2.3 HISTOGÊNESE DO OSSO

Quando o osso é formado diretamente de um tecido conjuntivo embrionário ocorre ossificação intramembranosa, e quando a formação óssea é sobre um molde de cartilagem pré-existente, ocorre a ossificação endocondral. A deposição de matriz óssea nas duas formas é a mesma, a diferença é que na ossificação endocondral a matriz cartilaginosa deve ser removida primeiramente para que a matriz óssea possa ser depositada. Nas duas formas, o osso primeiramente é formado como osso trabecular esponjoso com fibras colágenas dispostas em varias direções, muito celularizado, chamado de osso primário ou imaturo, e depois é substituído por um osso mais compacto, maturo, com fibras colágenas organizadas paralelamente formando lamelas concêntricas pelo preenchimento dos espaços intersticiais entre as trabéculas (PAWLINA, 2008; JUNQUEIRA, CARNEIRO 2008).

2.4 MECANISMO DE CALCIFICAÇÃO

Após formada a matriz orgânica, se inicia a deposição mineral. No tecido ósseo que se forma pela primeira vez, a mineralização envolve a secreção de vesículas de matriz na matriz óssea. Para que isso ocorra é necessário que a concentração de íons de Ca^{2+} e PO_4^{-3} superem o limiar normal. O mecanismo de mineralização é composto por diversos estágios: Primeiro a ligação do Ca pela osteocalcina cria uma alta concentração da Ca^{2+} que estimula os osteoblastos a agregar a fosfatase alcalina que aumenta a concentração de PO_4^{-3} . Devido a alta concentração extracelular de Ca^{2+} e PO_4^{-3} , os osteoblastos liberam pequenas vesículas da matriz para dentro da matriz óssea por exocitose. Essas vesículas contém fosfatase alcalina e pirofosfatase que clivam os íons PO_4^{-3} resultando na cristalização do fosfato de cálcio nas vesículas da matriz circunvizinhas. Os cristais de CaPO_4 iniciam a mineralização da matriz através da formação e deposição de cristais de Hidroxiapatita na matriz que circunda os osteoblastos (PAWLINA, 2008; BERKOVITZ, 2004).

Quando todas as vesículas da matriz estão calcificadas, o processo de mineralização progride para as fibrilas colágenas e para as regiões interfibrilares. Os primeiros cristais de mineral são depositados nos espaços entre as moléculas de

tropocolágeno. Uma vez que estes cristais iniciais são depositados, a formação das partículas minerais progride pela nucleação secundária por consequência do contato com a solução de cálcio e fosfato. Para que ocorra a nucleação heterogênea deve haver uma íntima relação entre o nucleador e os cristais a serem nucleados, e os espaços entre as moléculas de tropocolágeno proporcionam essa íntima relação tanto como um requisito geométrico tridimensional com uma distribuição de cargas elétricas essencial para que os cristais de cálcio e fosfato possam ser nucleados (KATCHBURIAN, ARANA, 2004; BERKOVITZ, 2004).

2.5 REPARO ÓSSEO

No caso de uma fratura, primeiramente é formado um coágulo sangüíneo no local da fratura e logo é organizado pela formação de um tecido de granulação. Esse tecido é condensado e se transforma em um calo fibrocartilaginoso que ajuda a unir e estabilizar o osso fraturado. Durante a formação desse tecido, o periósteo e o endósteo respondem com intensa proliferação formando um tecido rico em células osteoprogenitoras. Nesse tecido conjuntivo que circunda a área fraturada, surge um tecido ósseo primário tanto pela ossificação endocondral por pedaços de cartilagem que aí se formam tanto por ossificação intramembranosa. Esse processo acaba criando um calo ósseo que envolve a extremidade dos ossos fraturados. As trações e pressões exercidas sobre o osso ao poucos causam a remodelação do calo ósseo e posteriormente a completa substituição de tecido ósseo imaturo por osso secundário. Em um defeito ósseo crítico isso não acontece pois esse é o menor diâmetro intra-osseo de feridas que não cicatrizam espontaneamente, e seu tamanho varia entre cada animal (JUNQUEIRA, CARNEIRO 2008; PAWLINA, 2008).

2.6 DEFEITO ÓSSEO CRÍTICO

O defeito de tamanho crítico em calvária de rato é um modelo para avaliar a cicatrização óssea. Esse defeito é o menor diâmetro intra-ósseo de feridas que não cicatrizam espontaneamente. Em cães, o defeito de tamanho crítico é de 20 mm; em macacos, ele é de 25 mm; em coelhos, ele é de 15mm (URIST, 1984; RIPAMONTI, 1992). Defeitos de 8 mm criados cirurgicamente em calvária de ratos por Takagi e Urist, mostraram uma cicatrização por tecido conjuntivo fibroso após seis meses. Hollinger e Kleinschmidt relataram que um defeito ósseo craniano de 8 milímetros em calvária de ratos em 13 meses pós-cirurgia não cura espontaneamente.

2.7 ENXERTOS ÓSSEOS

As perdas ósseas causadas por malformações congênitas, ressecção de tumores, infecções ou traumas representam um desafio na cirurgia reparadora da face (SHANG 2001). Nesses procedimentos, a utilização de enxertos ósseos é frequente. Como fonte de tecido ósseo, pode-se, então, recorrer a áreas doadoras como regiões da maxila e mandíbula, costelas ou crista ilíaca (LEMPERLE, 1998; FERREIRA, 1997). No entanto, a disponibilidade de áreas doadoras de osso pode se tornar restrita em alguns pacientes (BRODIE, 2005; LUCARELLI, 2004). Existe como alternativa à busca de regeneração óssea, a utilização de bancos de ossos, que por sua vez disponibiliza tecidos provenientes de pacientes com morbidade inerente (ZHENG, 2009). O osso homólogo não é um tecido privilegiado imunologicamente, como já foi pensado. Ao contrário, tem demonstrado a ocorrência de resposta imunológica mediada por células e reação antígeno-anticorpo ao enxerto (HARDIN, 1994). Atualmente, uma área de pesquisa biomédica, denominada Engenharia de Tecidos, ou Bioengenharia, estuda novas formas de produção de tecidos, inclusive para uso em cirurgias reparadoras (CHANG, 2003). O uso de métodos de bioengenharia pode ser um caminho apropriado para promover geração ou regeneração tecidual *in vitro* e *in vivo*, para tratamentos de lesões teciduais. Assim, na recuperação de tecido ósseo perdido, o uso das células-tronco associadas ou não a *scaffolds*, tem sido apontado pela literatura (SYLVESTER, 2004; JONES, 2004).

Pelo relatado, procurou-se nesse estudo, verificar a expressão da porção colagenosa em situações de regeneração de perdas ósseas, fazendo o uso de *scaffolds* com ou sem células tronco.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Quantificar a matriz colagenosa formada em defeitos ósseos críticos em calota craniana de ratos.

3.2 ESPECÍFICOS

- Estabelecer um protocolo preciso e eficaz de quantificação do tecido colagenoso através de um método histológico.
- Quantificação da matriz colagenosa em situação de regeneração óssea através de análise histológica o tecido colagenoso total e compacto:
 - Na presença de *scaffold* composto por nanofibras de PLGA.
 - Na presença de *scaffold* + célula tronco indiferenciada derivada de polpa de dente decíduo em processo de rizólise.
 - Na presença de *scaffold* + célula tronco diferenciada em osteoblasto.

4 METODOLOGIA

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente trabalho é uma análise complementar dos dados obtidos no trabalho de mestrado de Gerson Arisoly Xavier Acasigua intitulado "**Avaliação da regeneração óssea, em calota craniana de ratos, com a utilização de matrizes de nanofibras poliméricas semeadas com células-tronco provenientes de tecido pulpar de dentes decíduos hígidos, em estágio de rizólise**" com o número de protocolo 19273 estando subordinado portanto à análise do CEP daquele projeto.

A obtenção das células tronco provenientes dos dentes decíduos, a confecção dos *scaffolds* e a obtenção dos ratos são de responsabilidade do mestrando.

4.2 EQUIPE DE TRABALHO

Pesquisador: Henrique Müller de Quevedo, aluno de Graduação de Odontologia, UFRGS.

Orientação: Profa. Dra. Anna Christina Medeiros Fossati

Colaborador: Dr. Gerson Arisoly Xavier Acasigua, Aluno do Curso de Doutorado em Clínicas Odontológicas – Odontopediatria, UFRGS

4.3 LOCAL DE REALIZAÇÃO

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Biotério do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório – ICBS-UFRGS.

A etapa de confecção e análise das lâminas histológicas foram realizada no Laboratório de Biologia Bucal – FO-UFRGS e Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da UFRGS.

4.4 ANIMAIS

Amostra de Ratos e Grupos Experimentais

Para realização deste estudo foram utilizados 9 ratos de espécie Wistar, machos, com 60 dias de vida peso médio de 225g,. Os animais foram divididos em três grupos:

Grupo 1 – Controle (n=3): confecção do defeito ósseo e colocação de somente *scaffolds* no local do defeito ósseo criado. Período experimental de 60 dias;

Grupo 2 – Teste (n=3): confecção do defeito ósseo e colocação de *scaffolds* semeados com células-tronco indiferenciadas no local do defeito ósseo criado. Período experimental de 60 dias;

Grupo 3 – Teste (n=3): confecção do defeito ósseo e colocação de *scaffolds* semeados com células-tronco já diferenciadas em osteoblasto no local do defeito ósseo criado. Período experimental de 60 dias.

Os animais de todos os grupos foram submetidos aos mesmos procedimentos pré, trans e pós-operatórios, diferindo somente na colocação ou não dos materiais em teste nos locais dos defeitos ósseos.

4.5 TÉCNICA CIRÚRGICA

Os ratos foram submetidos à cirurgia experimental conforme protocolo que segue:

Assepsia

Durante a realização da fase cirúrgica, o cirurgião manteve todos os critérios de assepsia, mantendo-se paramentado com avental cirúrgico, luvas cirúrgicas estéreis, propés, máscara, gorro e óculos de proteção. O instrumental cirúrgico foi individualizado para cada animal operado, sendo previamente esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Anestesia

Sob orientação de um Médico Veterinário, devidamente registrado no Conselho Regional de Veterinária, cada animal foi submetido à anestesia intraperitoneal conforme protocolos clínicos veterinários, utilizando-se Cloridrato de Xilazina e Cloridrato de Ketamina a 10 % respectivamente na dosagem de 0,1 ml/Kg e 1,0 ml/Kg de peso corporal do animal.

Tricotomia, Colocação de Campos Operatórios e Incisão

Após a realização da anestesia no animal, este foi colocado em decúbito ventral sobre uma superfície rígida e fixa para realização da tricotomia manual da região da calota craniana. Seguiram-se a assepsia do campo operatório por meio de solução aquosa de digluconato de clorexidina a 2 % e a colocação do campo cirúrgico estéril com fenestração na área de calota craniana.

Na pele, sobre a calota craniana, uma incisão de aproximadamente 15 mm foi realizada no sentido ântero-posterior, seguindo uma linha imaginária longitudinal ao

corpo do animal. A incisão foi realizada por meio de bisturi cabo número três, montado com uma lâmina número quinze.

Divulsão e Descolamento dos Tecidos

Após a incisão em pele, foi realizada a divulsão desta com sindesmótomo delicado, e foi realizada uma incisão no periósteo com lâmina número quinze, seguindo-se o descolamento do mesmo com espátula esculpadora 3S, permitindo assim, o acesso à cortical óssea da calota craniana.

Afastamento dos Tecidos

O afastamento dos tecidos no campo operatório foi realizado por um auxiliar com afastadores do tipo Senn Müller, permitindo, assim, a visualização adequada do campo operatório.

Ostectomias na Calota Craniana

Após a incisão dos tecidos, a sutura fronto-parietal foi localizada, e 2,0 mm a frente desta, realizou-se a ostectomia que criou o defeito ósseo crítico para posterior análise do reparo ósseo em calota craniana do rato. A ostectomia do orifício central foi realizada de forma bicortical por meio de uma broca trefina com diâmetro de 8,0 mm.

Inserção do *Scaffold* no Defeito Crítico

Após a confecção do defeito ósseo crítico, os scaffolds acompanhados ou não de células tronco, de acordo com o grupo, foram posicionados diretamente sobre o defeito ósseo com o auxílio de um instrumento adequado, de maneira a preencher toda a dimensão da lesão (Figura 1). Foi realizada a irrigação abundante da ferida operatória com solução fisiológica e sutura a pontos isolados com fio de Nylon 4-0.

Figura 1- Cirurgia e inserção dos *scaffolds*



Fonte: Acasigua (2011)

Cuidados Pós-Operatórios

A analgesia (Flunixinina meglumina 1,66 g – Banamine® Injetável Pet, 1,1 mg/Kg de peso corporal) pós-operatória foi realizada conforme indicação e orientação do médico veterinário. Em todos os grupos (1, 2 e 3), as seguintes etapas foram realizadas: os tecidos moles da cabeça foram suturados com pontos simples interrompidos; a limpeza da região foi realizada com gaze umedecida em soro fisiológico; os animais foram colocados na posição de decúbito ventral em gaiolas individuais para recuperação.

Morte dos Animais

A morte dos animais foi realizada sessenta dias após a cirurgia, por overdose anestésica, respeitando a lei estadual de proteção aos animais n° 11.915, de 23 de maio de 2003. Após a coleta das amostras, os ratos foram encaminhados até o Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para serem descartados por meio de incineração.

Coleta das Amostras

Após a morte, as cabeças dos animais foram colocadas sobre superfície rígida, sendo realizado o acesso ao crânio, conforme descrito anteriormente no procedimento cirúrgico. Os tecidos moles foram dissecados e um segmento do crânio, que continha o defeito ósseo cirurgicamente criado, foi removido em bloco por meio de secções realizadas com instrumental rotatório – discos de corte – sob irrigação contínua com solução fisiológica. As peças coletadas foram imediatamente colocadas em recipiente plástico com solução de formalina neutra tamponada 10%, durante 24 horas.

4.6 PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS

Após a fixação em formaldeído a 10% por 24h, os fragmentos de calota craniana foram descalcificados em ácido nítrico a 5%. A troca da solução descalcificadora foi feita diariamente até a completa descalcificação.

Cada fragmento foi submetido ao processamento histológico para inclusão em parafina. Foram realizados os cortes em micrótomo, onde a superfície de corte conteve a face longitudinal do defeito em sua região mais central. De cada bloco de parafina foram selecionados dois cortes histológicos com espessura de 5 µm e cada corte contemplou toda a extensão do defeito anteriormente criado.

Um dos cortes foi submetido à técnica histoquímica de Tricrômico de Masson, outro a técnica de coloração hematoxilina-eosina (HE). A observação foi feita em microscópio óptico para diferenciação apropriada das fibras colágenas do defeito ósseo.

Técnica de coloração com Tricrômico de Masson

Tricrômico de Masson é uma das colorações mais usadas para visualização diferencial de fibras colágenas. Como descrito por Junqueira (1983), a coloração é composta por azul de anilina, orange G, ácido fosfotungstíco e hematoxilina (contra coloração) e colore as fibras colágenas de azul, fibras musculares de vermelho e fibras elásticas de amarelo ou rosa. No presente estudo esta coloração foi utilizada para diferenciação e quantificação do colágeno total presente no defeito ósseo crítico nos grupos estudados.

4.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS

A análise quantitativa das fibras colágenas foi conduzida usando o *software Photofiltre 6.5.3* (CRUZ, 2012) e *ImageJ. 1.46r* (RASBAND, 2012) com *color deconvolution plugin*, com vetores calibrados. As imagens da coloração com Tricrômico de Masson foram decompostas e convertidas por este *software*. Este *software* irá calcular a porcentagem média de colágeno nas áreas marcadas. Uma análise observacional foi realizada com microscópio óptico para a coloração HE.

Durante a revisão de literatura foram encontradas algumas formas de análise gráfica do colágeno presente no tecido. A mais utilizada é a análise da porcentagem de colágeno presente em uma área de interesse delimitada somente através do programa ImageJ, que através do *color deconvolution plugin* faz a identificação das fibras colágenas coradas em azul no tecido. Ao iniciar a quantificação do colágeno no defeito ósseo crítico foram encontrados diversos entraves metodológicos que dificultaram a quantificação do colágeno através desse simples método. Para padronizar a análise, foi necessário adaptar e criar uma metodologia específica para que o tecido colagenoso fosse quantificado com maior precisão e com o mínimo revés metodológico possível.

Para que essa quantificação precisa fosse possível foi criado um protocolo com passos específicos que foram seguidos durante toda a análise e serão descritos a seguir:

Passo 1: Corte dos blocos de parafina

Todos os cortes dos blocos em parafina devem conter a mesma espessura. Para esta análise, foi necessária uma espessura de 4 μ m, para que a coloração se mantivesse padrão para todos os cortes e mantivesse uma ótima definição para uma análise precisa das fibras. Foram realizados testes no Laboratório de Biologia Bucal da FO-UFRGS, onde foram feitos cortes de 6 μ m, e foi observado que a espessura dos cortes não era apropriada, pois havia muita sobreposição de fibras colágenas e tecido não colagenoso, o que prejudicava a coloração, diferenciação e quantificação das fibras colágenas. Por isso, se fez necessário realizar o corte dos blocos de parafina no laboratório de patologia da FO-UFRGS, onde foi possível realizar cortes de menor espessura (4 μ m).

Passo 2: Coloração das lâminas com tricrômico de Masson

Todas as lâminas foram devidamente deparafinizadas e coradas com exatamente o mesmo protocolo de coloração com tricrômico de masson. Para coloração foi usado um kit de coloração de tricrômico de masson pronto da *Easy Path* e todas as lâminas foram coradas no mesmo momento com o mesmo protocolo de tempo e a mesma temperatura ambiente. Este passo é importante para que não haja variações nos tons de coloração das fibras colágenas, pois além do colágeno total foi realizada uma avaliação das áreas com colágeno mais compacto que foi estimado pelas regiões de maior intensidade de coloração no tecido.

Passo 3: Captura das imagens

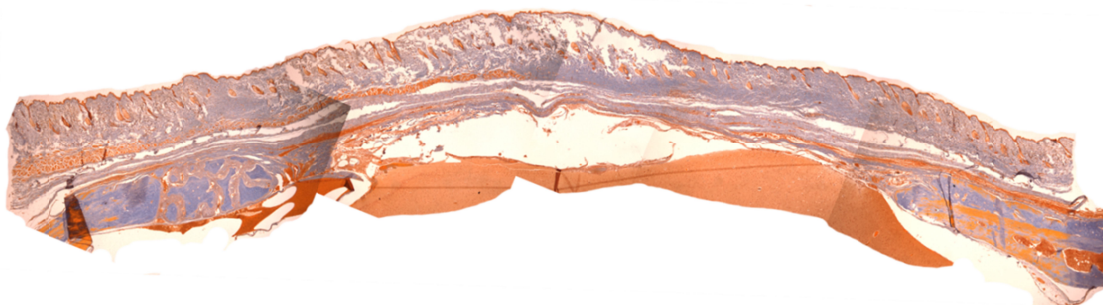
Todas as imagens das lâminas foram capturadas em um aumento de 40x e sob a mesma intensidade de luz (essencial para que todas as imagens contenham o mesmo brilho e contraste). Como o defeito ósseo não poderia ser capturado em uma só imagem, cerca de 11 imagens sequenciais de cada lâmina foram capturadas para serem posteriormente unidas formando uma imagem completa do defeito ósseo. Foi importante realizar a captura de todas as imagens de todas as lâminas sob a mesma intensidade de luz e no mesmo momento no microscópio, pois alterações na intensidade poderiam causar diferenças no contraste da coloração do colágeno entre as lâminas, alterando assim os resultados durante a análise gráfica. Outro procedimento necessário para uma correta análise foi o salvamento das imagens no formato *.tiff* para que as imagens não percam qualidade ao serem salvas, e todas as imagens foram salvas com uma resolução de 96 dpi (pixels por polegada) pois o

programa quantifica o tecido colágeno por seu número de pixels presentes na imagem.

Passo 4: União das imagens através do programa *Photofiltre 6.5.3*

Em análises de tecido muito extensos, como neste caso de análise de um defeito ósseo de 8mm, não é possível capturar todo o tecido em uma só imagem por isso foi necessária a captura de em torno de 11 imagens por lâmina. A correta técnica de união destas imagens é crucial para uma análise precisa do tecido de cada lâmina. As imagens tem que ser perfeitamente encaixadas para que não haja algum aumento/diminuição de tecido não condizente com a imagem observada no microscópio. Outro aspecto importante é que todas as imagens unidas tenham o mesmo contraste, brilho e saturação, o que foi um dos problemas encontrados durante a união das imagens. Toda a lâmina poderia ser capturada em apenas 5 imagens mas como os valores de brilho, contraste e saturação não são os mesmos no centro e nas bordas da imagem devido a fonte de luz central do microscópio, quando as imagens eram unidas as diferenças destes valores eram visíveis e era possível perceber claramente a área de união entre as imagens (figura 2). O que prejudicaria a análise gráfica pelo programa ImageJ.

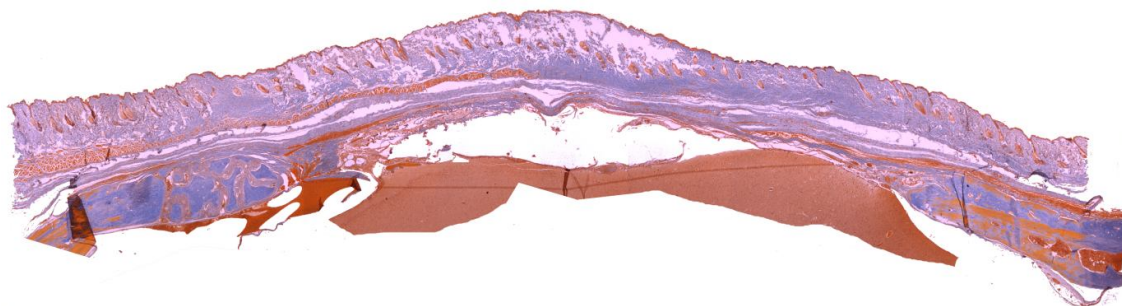
Figura 2 - União incorreta das imagens capturadas do defeito ósseo



Fonte: Autor

Para solucionar esse problema, 11 imagens de cada lâmina foram capturadas e somente o centro de cada imagem foi usada para realizar a união criando uma imagem totalmente homogênea e com o mesmo contraste por toda lâmina (Figura 3). Possibilitando uma consistente análise das fibras colágenas a partir da intensidade de sua coloração.

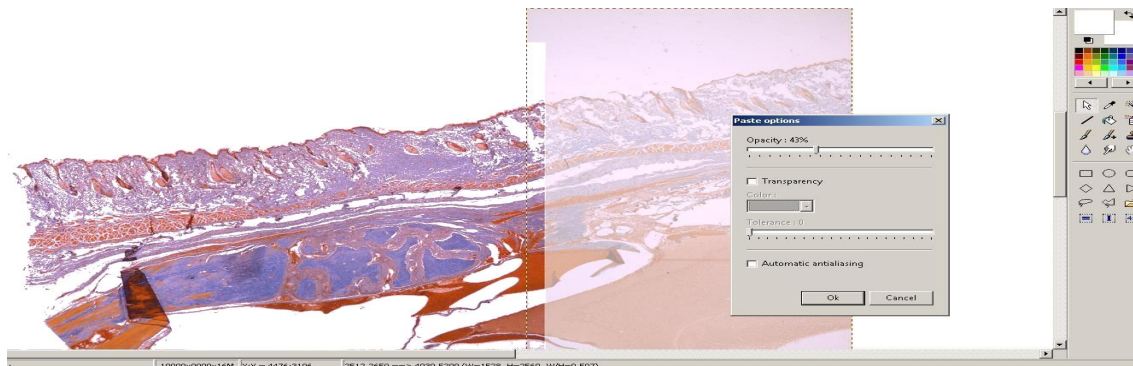
Figura 3 - Correta união das imagens capturadas do defeito ósseo



Fonte: Autor

Para que houvesse uma perfeita união entre as imagens capturadas de cada lâmina, ao colar cada fragmento de imagem sua opacidade foi diminuída através do programa *Photofiltre* para que pudesse ser minuciosamente ajustada até se tornar uma imagem só (Figura 4). Com essa alteração de opacidade temporária é possível perceber exatamente quando as imagens se encaixam pois os limites dos tecidos passam de difusos para bem definidos. Após o encaixe perfeito, a opacidade do fragmento é novamente modificada para 100%.

Figura 4 - Técnica de perfeita união dos fragmentos da imagem

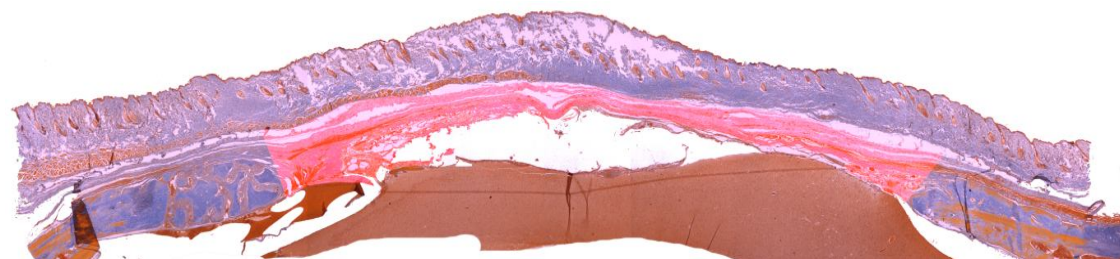


Fonte: Autor

Passo 5: Seleção da área de análise

A área de interesse para análise foi restrita à região do defeito ósseo criado entre as duas bordas da calota craniana. Essa região foi delimitada lateralmente por uma linha que parte das bordas da calota craniana e segue perpendicularmente a orientação das fibras colágenas, superiormente pelo limite da camada de tecido muscular e inferiormente pelo limite do tecido nervoso (Figura 5). Essa demarcação

da área de interesse não foi realizada à mão livre com o *mouse*, foi utilizado o *selection tool + polygon* presente no programa *Photofiltre*, em que foi feita uma marcação dos pontos nas áreas limites de interesse e esses pontos são unidos pelo programa delimitando exatamente o desenho do tecido com precisão.

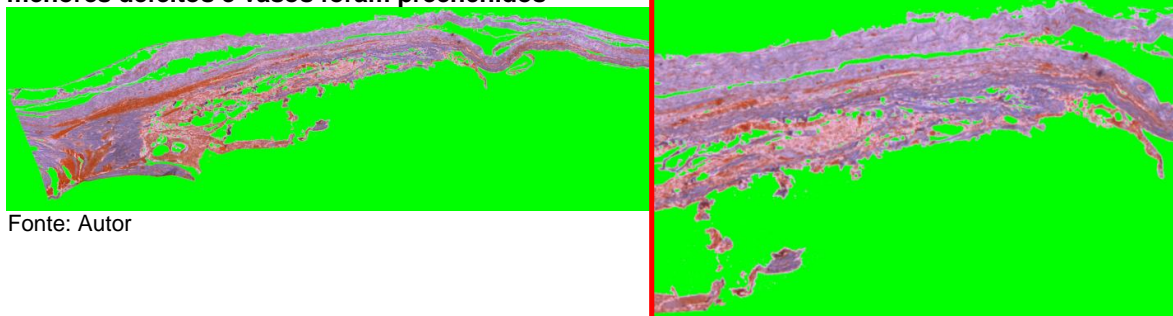


Fonte: Autor

Passo 6: Determinando as zonas de exclusão

Outro grande problema encontrado durante a análise foi como fazer a exclusão dos defeitos de técnica (áreas de tecido destacado, dobras no tecido, etc) e o lúmen dos vasos (seu espaço vazio não foi contado como tecido para esta análise). As técnicas de análise encontradas na literatura baseiam-se no cálculo da porcentagem de área ocupada pelo colágeno, referente à uma determinada região escolhida. Isso seria um problema nesse estudo, pois as regiões de defeito de técnica e lúmen de vasos ocupariam uma porcentagem de área selecionada adicionando uma variável não desejada entre as lâminas. Para a exclusão dessa variável indesejada foi utilizada a ferramenta *pipette tool* do programa *Photofiltre* e selecionado a cor branca mais pura possível dentro de um vaso ou defeito de técnica e através da ferramenta *replace color* (com tolerância de 30%) tudo o que era defeito e lúmen de vasos foi substituído pela cor verde (qualquer cor fora do espectro de coloração de Masson poderia ser utilizada) e tudo o que se encontra em verde será excluído da análise da porcentagem do tecido colágeno (Figura 6).

Figura 6 - Zonas de exclusão em verde. Em maior aumento é possível observar que os menores defeitos e vasos foram preenchidos

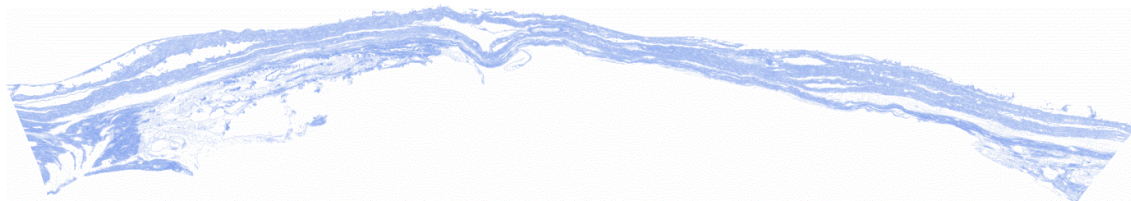


Fonte: Autor

Passo 7: Análise do colágeno total, colágeno compacto e tecido não colagenoso através do programa *Photofiltre 6.5.3* e *ImageJ 1.46r*

Colágeno total - Após realizado todos os procedimentos anteriores com o programa *Photofiltre*, foi realizada a etapa de análise do colágeno total presente na área selecionada com o programa *ImageJ 1.46r*. Este programa possui um *plugin* (*colour deconvolution*) que é capaz de decompor os vetores de cor da imagem e isolar somente as fibras colágenas presentes (em azul) no tecido (Figura 7). Para o cálculo dos pixels de colágeno total foi usado o *threshold* máximo (254) (escala entre branco e preto absoluto que varia de 0-255) para que o programa reconhecesse todos os pixels de colágeno isolados previamente pelo *plugin*. Após a aplicação do *threshold* a ferramenta *analyze particles* fez a quantificação precisa dos pixels de colágeno.

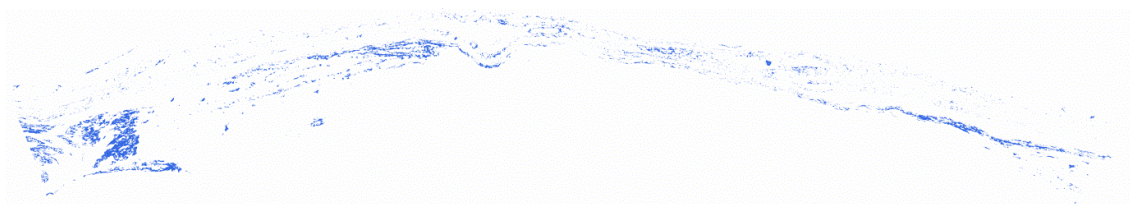
Figura 7 - Fibras colágenas isoladas pelo programa *ImageJ* antes da aplicação do *threshold* máximo



Fonte: Autor

Colágeno compacto – Similar à análise de colágeno total, foi utilizado o *colour deconvolution plugin* que isolou as fibras colágenas no tecido (podemos observar na figura 7 que algumas fibras colágenas estão mais fortemente coradas, concluindo que a maior concentração de corante nestas regiões indica uma maior concentração de fibras em uma mesma área). Para a quantificação desse colágeno que se encontra mais compacto foi utilizado um *threshold* intermediário (200) fazendo com que o programa excluísse os pixels que continham uma coloração mais próxima ao branco e isolando assim somente as fibras que se encontravam mais coradas (Figura 8). Após o isolamento das fibras compactas o programa fez a quantificação destes pixels. O mesmo *threshold* (200) foi usado para todas as imagens, garantindo uma comparação efetiva entre os grupos.

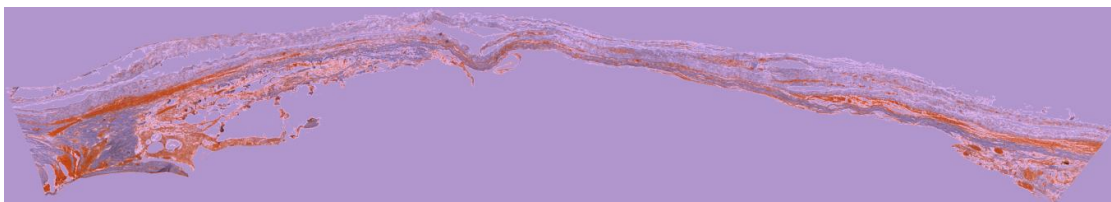
Figura 8 - Fibras colágenas compactas após a aplicação do *threshold* intermediário (200)



Fonte: Autor

Tecido não colagenoso – A quantificação do tecido não colagenoso presente no tecido é realizada de uma forma distinta, pois o programa *ImageJ* não tem como isolar somente o tecido não colagenoso devido a sua grande variação de tons e cores e por não ser formado somente por um tecido específico. Para que o programa *ImageJ* faça a análise deste tecido é preciso preparar a imagem previamente através do programa *Photofiltre*. Na imagem em que as zonas de exclusão foram todas substituídas pela cor verde, foi selecionada a cor presente no colágeno (azul) através do *pipette tool* e com a ferramenta *replace color* tudo que estava corado em verde (defeitos e vasos) foi corado com exatamente a mesma cor das fibras colágenas (Figura 9).

Figura 9 - Defeitos de técnica e vasos substituídos com a mesma cor das fibras colágenas



Fonte: Autor

Esse preparo prévio da imagem faz com que o programa *ImageJ* reconheça os defeitos de técnica e vasos como tecido colagenoso, e após a aplicação do *color deconvolution plugin* e *threshold*, acaba deixando somente o tecido não colagenoso em cor branca. Após o isolamento do colágeno, defeitos e vasos, foi feito o negativo dessa imagem (através da ferramenta *edit > invert* no program *ImageJ*), deixando assim evidenciado somente o tecido não colagenoso (Figura 10). Para quantificação do tecido não colagenoso foi usada a ferramenta *analyze particles* e seus pixels foram quantificados.

Figura 10 - Tecido não colagenoso isolado pelos programas *Photofiltre* e *ImageJ*

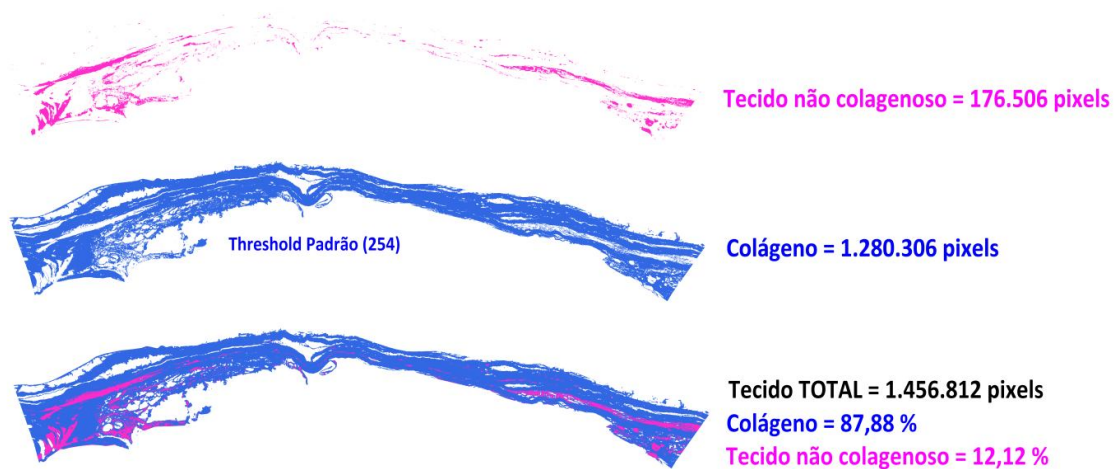


Fonte: Autor

Passo 8: Análise da porcentagem de cada tecido na imagem.

Para que a porcentagem de cada tecido fosse mensurada, as quantidades de pixels de tecido colagenoso e não colagenoso foram somadas e resultaram na quantidade de pixels de tecido total presente no defeito ósseo (Figura 11). Com a quantidade total de tecido, e as parciais de tecido colagenoso e não colagenoso, a porcentagem de cada um pode facilmente ser mensurada excluindo assim as variáveis indesejadas dos defeitos de técnica e lúmen dos vasos. Já a porcentagem de colágeno compacto foi mensurada a partir da quantidade total do tecido colagenoso, e não do tecido total presente no defeito.

Figura 11 - Imagens isoladas e sobrepostas do tecido colagenoso (azul) e não colagenoso (rosa)



Fonte: Autor

5 RESULTADOS

Este estudo procurou analisar as fibras colágenas localizadas no local do defeito ósseo criado. Foram analisados os grupos que foram utilizados somente *scaffold* (grupo 1), *scaffold* acompanhado de células tronco indiferenciadas (grupo 2) e *scaffold* acompanhado de células tronco diferenciadas em meio osteogênico (grupo 3). Foram utilizados 3 blocos por grupo (cada bloco contendo a região de defeito de um animal) e duas lâminas por bloco foram confeccionadas sendo que sua média determinou a porcentagem final de colágeno para cada animal.

Os resultados numéricos obtidos pelo protocolo descrito anteriormente constam na tabela a seguir (Tabela 1):

Tabela 1 - Porcentagem de colágeno presente nos grupos avaliados na área de regeneração óssea

GRUPOS	Colágeno Total (%)	Colágeno Compacto (%)
Animal 1 - scaffold + CT indiferenciadas	16,68	12,96
Animal 2 - scaffold + CT indiferenciadas	21,4	1,52
Animal 3 - scaffold + CT indiferenciadas	23,78	6,1
Animal 1 - scaffold	38,24	9,78
Animal 2 - scaffold	52,22	43,13
Animal 3 - scaffold	59,31	38,96
Animal 1 - scaffold + CT diferenciadas	83,18	52,39
Animal 2 - scaffold + CT diferenciadas	87,88	75,73
Animal 3 - scaffold + CT diferenciadas	93,14	88,64

Para a análise estatística foram utilizados testes paramétricos para comparação das médias entre os grupos. O testes utilizados foram o Anova Oneway e teste Post Hoc de Tukey (tabela 2). Através do teste Anova foi possível identificar diferenças significativas entre os 3 grupos avaliados para as variáveis colágeno total ($p < 0,01$) e colágeno compacto ($p = 0,005$).

Como existem diferenças entre os grupos o teste de Post Hoc de Tukey foi utilizado para identificar dentre quais grupos existem diferenças. Foi identificada diferença significativa entre todos os grupos para a variável colágeno total. Já para a variável colágeno compacto o grupo 3 (*scaffold* + CT diferenciada) se difere para mais, dos grupos 1 (*scaffold*) e grupo 2 (*scaffold* + CT indiferenciada), sendo que estes não apresentam diferença estatística significativa.

Tabela 2 - Análise estatística descritiva

		n	Média	Desvio padrão
Colágeno Total	Grupo 2 ^a	3	20,6	3,6
	Grupo 1 ^b	3	49,9	10,7
	Grupo 3 ^c	3	88,0	4,9
	Total	9	52,8	29,9
Colágeno Compacto	Grupo 2 ^a	3	6,8	5,7
	Grupo 1 ^a	3	30,6	18,1
	Grupo 3 ^b	3	72,2	18,3
	Total	9	36,5	31,5

*Letras diferentes indicam diferenças significativas (Post Hoc de Tuckey)

6 DISCUSSÃO

Em nosso trabalho, decidimos escolher o modelo de calvária de rato, pois se trata de um modelo bem documentado e estudado na literatura para avaliação de cicatrização óssea. É um animal de fácil manipulação, não havendo a necessidade de estabilizar a ferida pela sua posição privilegiada e não apresentando camadas musculares na região. Além disso, o rato é um animal de fácil alojamento, alimentação e menos dispendioso. A capacidade limitada de regeneração de um defeito ósseo craniano em ratos pode ser devido ao deficiente fornecimento de sangue e uma deficiência na medula óssea (PROLO, 1982).

Muitos trabalhos avaliaram a regeneração óssea com células tronco (YOON, 2007; JUKES, 2008) mas durante a busca na literatura não foram encontrados trabalhos que avaliassem o colágeno total presente, molécula fundamental para a síntese da matriz orgânica óssea. O presente estudo analisou a expressão das fibras colágenas em situações diferentes de reparo. Foram criados defeitos ósseos de 8 mm nos quais se empregou *scaffolds* com ou sem a adição de células tronco, diferenciadas ou não. Observou-se uma maior e significativa ($p < 0,05$) presença de fibras colágenas quando se comparou o grupo 3, onde a célula já diferenciada foi semeada em *scaffolds* e colocadas no defeito ósseo, em comparação ao grupo 2, onde foi utilizado o *scaffold* com a célula indiferenciada. Esses dados confirmam o fato de que a célula necessita de seu maquinário de síntese já desenvolvido para a produção da proteína colágeno que constituirá a matriz orgânica do futuro osso (KATCHIBURIAN, ARANA, 2004).

Interessantemente o grupo 1, em que foi utilizado somente o *scaffold* preenchendo o defeito, apresentou uma maior ($p < 0,05$) concentração de fibras colágenas do que o grupo 2 (*scaffold* + CT indiferenciada). Segundo Singer (2011) e Mei (2010) a célula tronco possivelmente modula negativamente o processo inflamatório que se instala na região, sugerindo que devido à esse fato, neste estudo, a célula deixou de se diferenciar em osteoblasto e retardou assim a produção de colágeno. A utilização do *scaffold* sem células atuaria como arcabouço para as células do ambiente e do tecido de granulação formado no processo de cicatrização da ferida de acordo com o que é relatado por Bottaro (2002), Liuyun (2009) e Badylak (2010).

Quanto ao colágeno compacto, que é aquele em que as fibras colágenas se apresentam mais condensadas, sugerindo uma região onde a matriz óssea

começasse a ser secretada, também apresentou uma maior e significativa ($p < 0,05$) presença no grupo 3 (CT diferenciadas), confirmando os dados acima relatados. Já entre os grupos 1 e 2, não houve diferença estatística em relação à presença de colágeno mais compacto.

A avaliação da matriz colagenosa feita por este estudo foi uma análise complementar ao trabalho de Acasigua (2012) em que foi observado uma maior e significativa neoformação óssea no grupo em que haviam sido implantadas células já diferenciadas acompanhadas por *scaffold*. Yoon (2007) utilizou células tronco provenientes de tecido adiposo para testar a regeneração óssea em defeitos críticos na calota craniana de ratos e observou que houve uma maior formação óssea no defeito em que as células tronco previamente diferenciadas em meio osteogênico foram implantadas. Os 2 estudos citados acima não avaliaram a formação da matriz colagenosa, mas provavelmente os resultados de formação óssea no grupo com células já diferenciadas seguiriam a mesma tendência de formação da matriz colagenosa encontrada por esse estudo.

Murphy (2009) utilizou *scaffolds* compostos de colágeno, que foram originalmente criados para regeneração de lesões na pele, e os combinou com osteoblastos avaliando a adesão celular em *scaffolds* de colágeno com diferentes porosidades variando entre 96 e 151 μm . O autor concluiu que os *scaffolds* com menores poros obtiveram melhor adesão de osteoblastos, estressando a importância e eficiência do colágeno para o processo de neoformação óssea através da terapia celular.

Durante a revisão de literatura foram encontradas algumas formas de análise gráfica do colágeno presente no tecido. A mais utilizada é a análise da porcentagem de colágeno presente em uma área de interesse delimitada somente através do programa ImageJ, que através do color *deconvolution plugin* faz a identificação das fibras colágenas coradas em azul no tecido. Ao iniciar a quantificação do colágeno no defeito ósseo crítico foram encontrados diversos entraves metodológicos que dificultaram a quantificação do colágeno através desse simples método. Potrich (2011), Meyer (2007) e Rich (2005) analisaram a distribuição espacial de fibras colágenas em diversos tecidos. Nestes estudos não foi realizada uma quantificação do tecido colágeno e sim a análise da porcentagem de distribuição do colágeno dentro de uma área delimitada da imagem. Apesar de esta técnica ser efetiva para a distribuição do colágeno, neste estudo foi necessário adaptar e criar uma

metodologia específica para que o tecido colagenoso fosse quantificado com maior precisão e com o mínimo revés metodológico possível, excluindo fatores que poderiam alterar os dados (defeitos de técnica, espaços intersticiais, lúmen de vasos). Através da técnica utilizada neste estudo foi possível fazer uma quantificação precisa das fibras colágenas obtendo a porcentagem do próprio tecido presente no defeito ósseo, e não a porcentagem da área que esse tecido ocupava na imagem capturada.

7 CONCLUSÃO

Através da análise dos resultados o estudo concluiu que a utilização do *scaffold* acompanhado de células tronco diferenciadas em meio osteogênico promove uma produção maior de fibras colágenas que serão utilizadas no processo de regeneração óssea.

O método de análise criado para a análise e quantificação das fibras colágenas se mostrou eficaz e preciso, proporcionando resultados metodologicamente padronizados. Um método preciso de análise das fibras colágenas é pouco documentado na literatura, sendo que esse método pode ser inclusive adaptado para análise de outros tecidos.

REFERÊNCIAS

- Acasigua GAX. Avaliação da regeneração óssea, em calota craniana de ratos, com a utilização de matrizes de nanofibras poliméricas semeadas com células-tronco provenientes de tecido pulpar de dentes decíduos hígidos, em estágio de rizólise [dissertação]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia; 2011.
- Badylak SF, Brown BN, Gilbert TW, Daly KA, Huber A, Turner NJ. Biologic scaffolds for constructive tissue remodeling. *Biomaterials*. 2011 Jan; 32(1):316-9.
- Berkovitz BKB. Anatomia, embriologia e histologia bucal. 3. ed. Porto Alegre: Artmed; 2004.
- Bernardi, L. Células-tronco da polpa de dentes decíduos humanos: isolamento relacionado à rizólise dentária [dissertação]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Odontologia; 2010.
- Brodie JC, Goldie E, Connel G, Merry J. Osteoblast interactions with calcium phosphate ceramics modified by coating with type I collagen. *J Biomed Mater Res A*. 2005 June; 15;73(4):409-21.
- Bottaro DP, Liebmann-Vinson A, Heidarman MA. Molecular signaling in bioengineered tissue microenvironments. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 June; 961:143-53.
- Chang SC, Wei FC, Chuang H. Ex vivo gene therapy in autologous critical-size craniofacial bone regeneration. *Plast Reconstr Surg*. 2003 Dec; 112(7):1841-50.
- Conrad EU, Ericksen DP, Tencer AF. The effects of freeze-drying and rehydration on cancellous bone. *Clin Orthop Rel Res*. 1993; 290:279-84.
- Cruz A. Photofiltre 6.5.3 [Internet]. 2012 [acesso em set 15]. Disponível em <http://www.photo-filtre-studio.com>.
- El-Amnin SF, Lu HH, Khan Y, Burems J, Mitchel J. Extracellular matrix production by human osteoblasts cultured on biodegradable polymers applicable for tissue engineering. *Biomaterials*. 2003; 24:1213-21.
- Ferreira JCR. Avaliação cintilográfica e histopatológica de transplantes ósseos autógenos, homogêneos frescos e homogêneos congelados do arco zigomático [dissertação]. São Paulo (SP): Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina; 1997.
- Jones JR, Hench LL. Factors affecting the structure and properties of bioactive foam scaffolds for tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2004 Jan; 68(1):36-44.
- Jukes JM, Both SK, Leusink A, Sterk LMT, Blitterswijk CA, Boer J. Endochondral bone tissue engineering using embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2008 May 13; 105(19): 6840-5.

Junqueira LC, Carneiro J. Histologia básica. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.

Katchburian E, Arana V. Histologia e embriologia oral. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

Lemperle SM, Calhoun CJ, Curran RW, Holmes RE. Bony healing of large cranial and mandibular defects protected from soft-tissue interposition: A comparative study of spontaneous bone regeneration, osteoconduction, and cancellous autografting in dogs. *Plast Reconstr Surg*. 1998 Mar; 101(3):660-72.

Liuyun J, Yubao L, Chengdong X. Preparation and biological properties of a novel composite scaffold of nano-hydroxyapatite/chitosan/carboxymethyl cellulose for bone tissue engineering. *J Biomed Sci*. 2009 July; 16:65.

Lucarelli E, Donati D, Cenacchi A, Fornasari PM. Bone reconstruction of large defects using bone marrow derived autologous stem cells. *Transfus Apher Sci*. 2004 Apr; 30(2):169-74.

Mei SH, Haitsma JJ, Dos Santos CC, Deng Y, Lai PF, Slutsky AS. Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial clearance and improving survival in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Oct; 182(8):1047-57.

Meijer GJ, de Bruijn JD, Koole R, van Blitterswijk CA. Cell-based bone tissue engineering. *Plos Med*. 2007 Feb; 4(2):e9.

Meyer AL, Berger E, Monteiro Jr O, Alonso PA, Stavale JN, Gonçalves MP. Quantitative and qualitative analysis of collagen types in the fascia transversalis of inguinal hernia patients. *Arq Gastroenterol*. 2007 July-Sep; 44(3):230-4.

Montes G.S. Structural biology of the fibers collagenous and elastic systems. *Cell Biol Int*. 1996 Jan; 20(1):15-27.

Murphy CM, Haugh MG, O'Brien FJ. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2010 Jan; 31(3):461-6.

Pawlina W. Histology: a text and atlas. 5. ed. Florida: Lippincott Williams & Wilkins; 2008.

Potrich ARV. Diferenças macroscópicas e microscópicas entre as glândulas parótida e exorbital lacrimal em ratos [trabalho de conclusão de curso]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia; 2011.

Prolo DJ, Pedrotti PW. Superior osteogenesis in transplanted allogenic canine skull following chemical sterilization. *Clin Orthop*. 1982 Aug; (168):230-42.

Rasband W. ImageJ 1.46r [Internet]. Maryland: National Institute of Mental Health; 2012 [acesso em 2012 set 15]. Disponível em <http://rsbweb.nih.gov/ij>.

Reiser JM, McComick RJ. The enzymatic and non-enzymatic crosslinking of collagen and elastin. *Faseb J.* 2002 April; 6:2439–49.

Rich L, Whittaker P. Collagen and picosirius red staining: A polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. *Braz. Journ. Morphol.* 2005; 22(2):97-104.

Singer NG, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu Rev Pathol.* 2011; 6:457-78.

Ten Cate R. *Histologia bucal: desenvolvimento, estrutura e função.* 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

Van DB, Speiger D. Differences in matrix composition between calvaria and long bone in mice suggest differences in biomechanical properties and resorption special emphasis on collagen. 2008 Sept; 43(3):459-68.

Van der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins. *Faseb J.* 1991; (5):2814-23.

Vellman SG. The role of the extracellular matrix in skeletal development. *Poult. Sci.* 2000 July; 79 (7): 985–9.

Yoon E, Dhar S, Chun DE, Gharibjanian NA, Evans GR. In vivo osteogenic potential of human adipose-derived stem cells/poly lactide-co-glycolic acid constructs for bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model. *Tissue Eng.* 2007 Mar; 13(3):619-27.

ANEXO A – PROTOCOLO DE COLORAÇÃO DE TRICRÔMICO DE MASSON

Para coloração com tricrômico de Masson foi utilizado o kit pronto Easy Path, o qual contém quatro diferentes corantes: hematoxilina férrica de Weigert para núcleos, ácido pícrico para eritrócitos, uma mistura de corantes ácidos (fucsina ácida e vermelho de xilidina) para citoplasma e azul de anilina para tecido conjuntivo.

Protocolo de coloração:

Xilol I – 15'

Xilol II – 10'

Álcool absoluto I – 5'

Álcool absoluto II – 2'

Hematoxilina férrica – 10'

Lavagem

Solução alcoólica de ácido picrico – 6'

Lavagem

Fucsina de Panceau – 4'

Lavagem

Solução ácida fosfomobilídica – 5'

Azul de anilina de Masson – 5'

Álcool I – 3'

Álcool II – 3'

Xilol I – 10'

Xilol II – 10'

ANEXO B – ORÇAMENTO

MATERIAL	QUANTIDADE	VALOR DA UNIDADE (R\$)	VALOR TOTAL (R\$)
Luvas tamanho M	5 caixas	20,00	100,00
Etanol 70%	2 litros	9,00	18,00
Broca Trefina	6 unidades	35,00	210,00
Broca Tronco Cônica nº 702	6 unidades	2,00	12,00
Cabo de Bisturi nº 3	6 unidades	30,00	180,00
Campo Cirúrgico	6 unidades	1,00	6,00
Cinzel Reto	6 unidades	30,00	180,00
Clorexidina 2% gel	3 unidades	15,00	45,00
Contra Ângulo	1 unidade	600,00	600,00
Descolador de molt	6 unidades	30,00	180,00
Destaca Periósteo	6 unidades	30,00	180,00
Etiquetas Pequenas	1 caixa	10,00	10,00
Fio de Sutura 000 – Seda Ethicon	20 unidades	2,50	50,00
Gaze	2 pacotes	12,00	24,00
Lâmina de Bisturi nº 15	1 caixa	19,00	19,00
Luminária	1 unidade	30,00	30,00
Lupa	1 unidade	20,00	20,00
Máscara	1 caixa	10,00	10,00
Motor Elétrico de Baixa Rotação	1 unidade	500,00	500,00
Papel Alumínio	4 unidades	2,50	10,00
Papel Toalha	3 unidades	2,50	7,50
Pinça	6 unidades	25,00	150,00
Porta Agulha Castro Viejo	6 unidades	50,00	300,00
Potes	6 unidades	1,00	6,00
Seringa Descartável 20ml	6 unidades	1,50	9,00
Sonda Exploradora	6 unidades	25,00	150,00
Soro Fisiológico 0,9 %	500 ml	3,00	3,00
Tesoura Cirúrgica Reta	6 unidades	40,00	240,00
Tesoura Gr. Mundial	1 unidade	15,00	15,00
Tesoura p/ Sutura	6 unidades	40,00	240,00
Hematoxilina de Harris Pro Cito	1 litro	63,00	63,00
Eosina amarelada Pro Cito	1 litro	30,00	30,00
Kit Easy Path – Tricrômico de Masson	1 Kit	-	240,00
Total Geral (R\$)	-	-	3.441,00

ANEXO C – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE PESQUISA FO-UFRGS**Sistema Pesquisa - Pesquisador: Anna Christina Medeiros Fossati****Projeto Nº:** 23540**Título:** MATRIZ COLAGENOSA EM SITUAÇÕES DE REGENERAÇÃO OSSEA

COMISSÃO DE PESQUISA DE ODONTOLOGIA: Parecer

Trata-se de um estudo que tem como objetivo estudar a formação da matriz colagenosa em defeitos ósseos críticos em calota craniana de ratos. O projeto caracteriza-se por um subprojeto de um projeto maior aprovado pela Compesq e CEUA previamente. Serão avaliados os mesmos cortes. O projeto encontra-se metodologicamente adequado.

ANEXO D – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA UFRGS



UFRGS

UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética Na Utilização De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética Na Utilização De Animais analisou o projeto:

Número: 19273

Título: Avaliação da regeneração óssea, em calota craniana de ratos, com a utilização de matrizes de nanofibras poliméricas semeadas com células-tronco provenientes de tecido pulpar de dentes deciduos hígidos

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

ANNA CHRISTINA MEDEIROS FOSSATI - coordenador desde 29/06/2010

MANOEL SANTANA FILHO - pesquisador desde 29/06/2010

PATRICIA HELENA LUCAS PRANKE - pesquisador desde 29/06/2010

LISIANE BERNARDI - pesquisador desde 29/06/2010

Gerson Arisoly Xavier Acasigua - pesquisador desde 29/06/2010

Daikelly Iglesias Braghirolli - pesquisador desde 29/06/2010

Comissão De Ética Na Utilização De Animais aprovou o mesmo, em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Quinta-Feira 30 de Setembro de 2010

FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAÚJO
Coordenador da comissão de ética