

DEFEITO DE TAMANHO CRÍTICO COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA ANÁLISE DA OSTEOCONDUTIVIDADE DE XENOENXERTOS

Jesús Alberto Pérez Guerrero¹; Fábio Lima Cavalcante²; Morsyleide de Freitas Rosa³; Men de Sá Moreira de Souza Filho⁴; Igor Iuco Castro-Silva⁵

¹Estudante do Curso de Mestrado em Biotecnologia – PPGB – UFC Sobral; jesus24p@gmail.com, ²Estudante do Curso de Doutorado em Química – PPGQ – UFC Fortaleza; fabiolima2008@hotmail.com, ³Pesquisadora da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA/CNPAT; morsyleide.rosa@embrapa.br, ⁴Pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA/CNPAT; men.souza@embrapa.br, ⁵Docente/Orientador do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia – FAMED – UFC Sobral; igor.iuco@sobral.ufc.br

Resumo: O defeito de tamanho crítico pode estar presente em múltiplos protocolos experimentais cirúrgicos *in vivo*, sendo usado para caracterização biológica de biomateriais aplicáveis ao reparo ósseo. Diferentes espécies animais como camundongos, ratos, coelhos e cães têm sido usadas, bem como uma ampla gama de diâmetros que dependem da espécie animal e do local do defeito. O objetivo desse trabalho foi descrever o procedimento experimental de indução do defeito de tamanho crítico em crânios de ratos como modelo de estudo da osteocondutividade de biomateriais. De acordo com as normalizações vigentes, foram usados como tempos cirúrgicos 1 mês e 3 meses após enxerto de diferentes materiais-teste derivados de subprodutos da indústria avícola (compostos por colágeno, queratina e apatita) para comparação com seus controles: osso autógeno, positivo e coágulo sanguíneo, negativo. A análise histopatológica permite avaliação intergrupos dos fenômenos de inflamação, reparo e biodegradação, bem como a quantificação de área de tecido ósseo neoformado. A alta reprodutibilidade torna este modelo experimental adequado para testes *in vivo* de novos biomateriais xenógenos com potencial osteocondutor.

Palavras-Chave: Experimentação Animal. Teste de Materiais. Regeneração Óssea. Engenharia Tecidual.

INTRODUÇÃO

A incidência mundial de distúrbios ósseos tem crescido exponencialmente, em especial associada a traumatismos e ao envelhecimento populacional (CASTRO-SILVA; ZAMBUZZI; GRANJEIRO, 2009). Técnicas para substituir, restaurar ou regenerar ossos usando a enxertia de biomateriais tornam-se uma necessidade clínica nos campos de cirurgia ortopédica e crânio-maxilo-facial (GONÇALVES *et al.*, 2009).

Biomaterial é uma substância ou uma mistura de substâncias, de origem natural ou sintética, utilizada em contato com um sistema biológico com o objetivo de promover o reparo ou substituição de defeitos estruturais de órgãos ou tecidos lesados, permitindo auxiliar nas atividades fisiológicas dos mesmos (SAKAGUCHI; POWERS, 2012). A osteocondutividade é característica essencial para aplicação de biomateriais aplicáveis à regeneração de tecidos mineralizados. Entende-se por osteocondução o crescimento de osso na superfície do material de enxerto, que é precedido por infiltração do enxerto por tecido fibrovascular (TANG *et al.*, 2016).

Define-se como Defeito de Tamanho Crítico (*Critical Size Defect* ou *CSD*) o menor tamanho de ferida intraóssea em um osso particular ou espécie animal que não cicatrizará

espontaneamente durante o tempo de vida do animal (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986). Defeitos de 8 mm de diâmetro criados em calvária de ratos velhos na região interparietal do crânio não regeneraram espontaneamente em 12 semanas, sendo observada uma formação óssea inferior a 50% do defeito, por técnicas radiográficas e histopatológicas (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986, SILVA *et al.*, 2009). O modelo de defeito ósseo de tamanho crítico permite a caracterização biológica *in vivo*, sendo recomendável para avaliar o potencial osteocondutor de biomateriais para regeneração óssea (BITTENCOURT *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2009). Tal defeito é preenchido com algum possível promotor de crescimento ósseo ou deixado sem tratamento (controle), sendo a resposta biológica frente ao material avaliada em diferentes tempos experimentais (BITTENCOURT *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2009).

O objetivo desse trabalho foi descrever o modelo experimental de defeito de tamanho crítico induzido em crânios de ratos, como parte de pesquisa corrente visando a análise histopatológica do potencial osteocondutor de biomateriais xenógenos derivados da indústria avícola.

METODOLOGIA

Este trabalho original integra uma dissertação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), *Campus* de Sobral, intitulada “Caracterização da osteocondutividade de hidrogéis compostos de colágeno, nanoqueratina e bioapatita derivados da indústria avícola”, com previsão de defesa em fevereiro de 2019, e teve aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFC (protocolo n. 04/2017).

O modelo experimental foi constituído por *Rattus norvegicus albinus* da linhagem Wistar, machos e adultos jovens (com 8 semanas de idade e peso entre 200 e 220 g). Os animais foram anestesiados por aplicação intraperitoneal de 100 mg/kg de ketamina e 12 mg/kg de xilazina, com duração de efeito entre 30 e 40 minutos. A região frontoparietal dos animais foi tricotomizada mecanicamente e degermada com clorexidina alcoólica 0,5%. Em cada espécime, foi realizada uma incisão semilunar, seguida de retalho total com o auxílio de descolador do tipo Molt e cinzel de Ochsenbein n. 1, expondo a cortical óssea da região interparietal do crânio. Com uma broca trefina cirúrgica de 8 mm de diâmetro acoplada a um contra ângulo redutor com rotação de 1:16 e irrigação externa abundante, foi realizada uma craniotomia bicortical, expondo a dura-mater sem lesão da mesma ou do encéfalo. O fragmento osteotomizado foi retirado delicadamente e efetuado o preenchimento do defeito com o material-teste cobrindo totalmente a área do defeito. Todos os materiais-teste foram produzidos através de subprodutos da indústria avícola (pele, penas e ossos), bem como caracterizados previamente através de análises físico-químicas pela EMBRAPA-CNPAT (Fortaleza, CE, Brasil). Quatro grupos de hidrogéis foram habilitados para teste, com distintas

concentrações: Grupo 1 (100% de colágeno avícola), Grupo 2 (90% colágeno e 10% apatita), Grupo 3 (90% de colágeno e 10% de queratina) e Grupo 4 (90% de colágeno, 5% de queratina e 5% de apatita). Como controle positivo, foi usado o osso autógeno fragmentado proveniente da calvária, enquanto que o controle negativo constou do próprio coágulo sanguíneo (sem enxertia). Foram operados 5 animais por condição experimental (grupo/tempo), perfazendo um total de 60 animais utilizados neste estudo. Em seguida, cada retalho foi reposicionado e suturado com fio de nylon 4.0. As etapas do procedimento cirúrgico podem ser observadas na **Figura 1**.

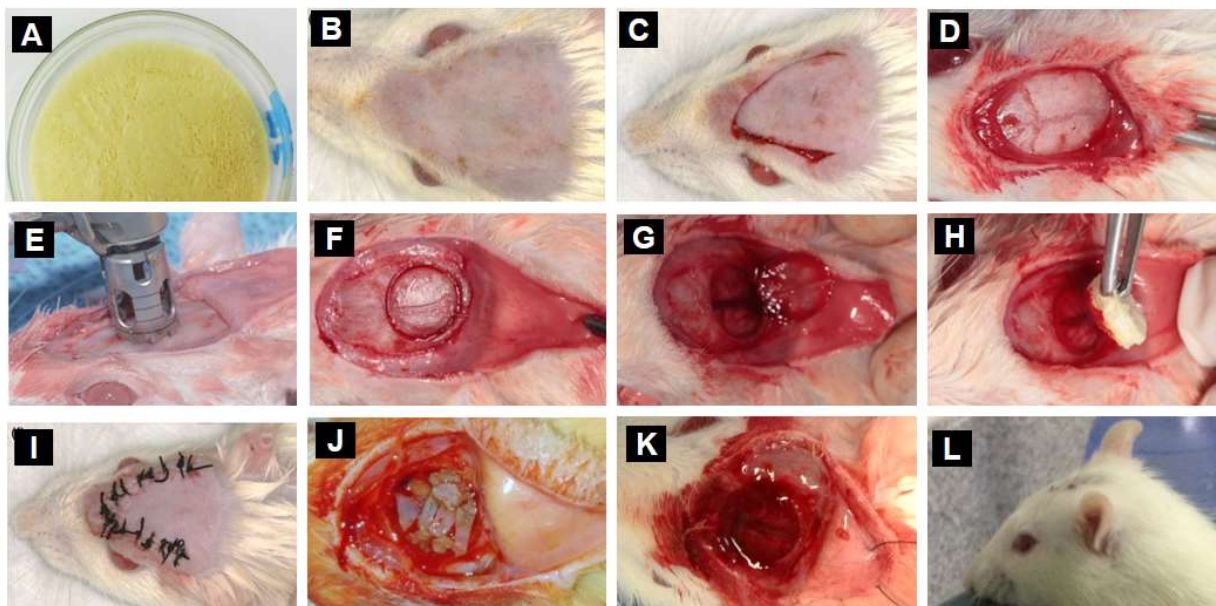


Figura 1 – Teste ortópico de biomaterial com potencial osteocondutor em CSD de ratos. A-Amostra de hidrogel liofilizado. B- Tricotomia. C- Incisão. D- Retalho total. E- Trepanação com broca trefina. F- Delimitação do CSD. G- Remoção da tábua óssea. H- Enxerto de hidrogel. I- Sutura. J- Controle positivo: osso autógeno. K- Controle negativo: coágulo sanguíneo. L-Acompanhamento pós-cirúrgico de 1 semana. Fonte: própria

Os animais foram eutanasiados por overdose anestésica através de aplicação intraperitoneal usando 5 vezes a dose normal, nos tempos experimentais de 1 mês e 3 meses após as cirurgias para acompanhar os efeitos sobre a regeneração óssea *in situ*. Constatada a morte do animal, foi realizada a necropsia excisional, contendo a área do defeito e uma margem de segurança de 5 mm, utilizando um micromotor odontológico com disco de Carborundum.

Cada amostra seguiu para processamento histológico, permitindo inicialmente avaliações descritivas dos processos gerais de inflamação, reparo e persistência do enxerto nas diferentes condições experimentais. Avaliações quantitativas ou histomorfométricas por meio do *software* Image ProPlus 6.0 (Media Cybernetics, MD, EUA) estão em curso, onde será possível contabilizar a área de tecido ósseo neoformado e comparações estatísticas intergrupos por ANOVA em intervalo de confiança de 95% (SOUSA *et al.*, 2013).

RESULTADOS PARCIAIS E DISCUSSÃO

O padrão de preenchimento do *CSD* nos grupos experimentais e controles demonstrados na **Figura 2** confirma a validade desse modelo *in vivo* para teste de materiais osteocondutores.

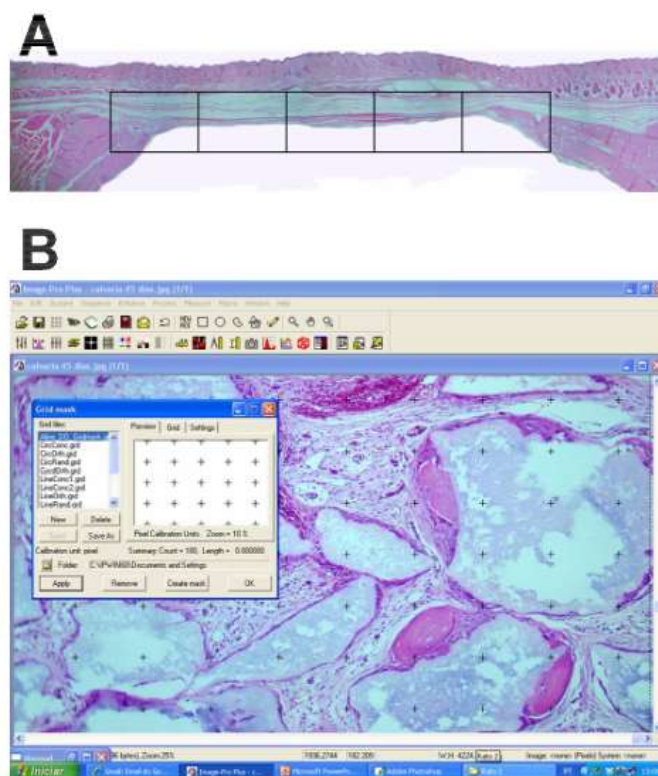


Figura 2 – Imagens representativas da extensão do *CSD* em corte coronal sem enxertia (A) e com enxertia de hidrogel contendo apatita no centro do *CSD* e calibração para a etapa de quantificação da presença de osso neoformado, tecido conjuntivo e biomaterial (B). Fonte: própria.

Diferentes modelos animais de *CSD* como camundongos (COWAN, et al. 2004), ratos (SCHLIEPHAKE, et al. 2004), coelhos e cães (SATO; URIST, 1985) têm sido usados. Em ratos, um defeito ósseo em calvaria é de profundidade completa e tipicamente introduzido na linha média interparietal com uma broca trefina. Uma gama de diâmetros já foi relatada, incluindo 3, 4, 5, 6, 7, 8 e até de 9 mm (ARNAUD, 2000; LOMELINO *et al.*, 2012); embora 8 mm seja a dimensão mais comum e segura segundo a literatura para se alcançar o defeito ósseo desejável, uma vez que a regeneração é dependente do tamanho da ferida (BITTENCOURT *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2009; SCHMITZ; HOLLINGER, 1982).

As normalizações internacionais 10993-1 e 10993-6 sugerem avaliações temporais em ratos com duração de contato prolongada (até 30 dias) a permanente (entre 1 e 12 meses, em média 3 meses ou um sexto da sua expectativa de vida) após enxerto do material-teste. (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2007; BITTENCOURT *et al.*, 2014).

Uma variedade de técnicas analíticas tem sido usada para quantificar o crescimento ósseo, após a cirurgia, dentro do defeito. Mais comumente, essas investigações envolvem análises histológicas ou radiográficas de espécimes extirpados. A análise descritiva, comparativa da resposta biológica intergrupos, pode ser baseada na presença de tecido conjuntivo, vasos sanguíneos, tecido ósseo neoformado, tecido ósseo antigo, biomaterial enxertado e outras estruturas que não se enquadram nessas definições (PAULO *et al.*, 2011). Já a análise histomorfométrica do osso da calvária envolve tipicamente a determinação da fração do defeito que foi coberto por osso novo. Esse valor da Área Fracional Óssea é determinado após o sacrifício e é usado como uma indicação quantitativa do crescimento ósseo neste modelo pela avaliação das secções histológicas de calvária, validando assim o potencial osteocondutor do material enxertado, se existente (COWAN *et al.*, 2004).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A alta reprodutibilidade do defeito de tamanho crítico em ratos torna este modelo experimental adequado para testes *in vivo* de novos biomateriais xenógenos com potencial osteocondutor.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará – *Campus* de Sobral, por meio do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Programa Internacional PAEC-OEA-GCUB edição 2017 e Grupo de Estudos em Morfologia, por viabilizarem esta pesquisa de mestrado. À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA-CNPAT) pela parceria técnico-científica. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (bolsa de mestrado CAPES-DS), ao Governo do Estado do Ceará e à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (bolsa de produtividade FUNCAP-BPI processo n. BP3-0139-00270.01.00/18) pelo financiamento desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ARNAUD, E. Advances in cranioplasty with osteoinductive biomaterials: summary of experimental studies and clinical prospects. **Child's Nervous System**, v. 16, n. 10-11, p. 659-668, 2000.
- BITTENCOURT, R., *et al.* Preclinical evaluation of a xenogenic hydroxyapatite/collagen-based bone substitute material. **Revista Odonto Ciência**, v. 29, n. 1, p. 6-13, 2014.
- CASTRO-SILVA, I. I.; ZAMBUZZI, W. F.; GRANJEIRO, J. M. Panorama atual do uso de xenoenxertos na prática odontológica. **Innovations implant journal**, v. 4, n. 3, p. 70-75, 2009.

COWAN, C. et al. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. **Nature biotechnology**, v. 22, n. 5, p. 560-567, 2004.

GONÇALVES, F., *et al.* Regeneração óssea em Odontologia com a utilização do substituto ósseo composto xenogênico Gen Mix. **Implant News**, v. 6, n. 4, p. 373-379, 2009.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Part 6: Tests for local effects after implantations. In: **Biological Evaluation of Medical Devices**. 2. ed. Switzerland, 2007.

LOMELINO, R., *et al.* The association of human primary bone cells with biphasic calcium phosphate (β TCP/HA 70: 30) granules increases bone repair. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 23, n. 3, p. 781-788, 2012.

PAULO, A. O. et al. Repair of critical-size defects with autogenous periosteum-derived cells combined with bovine anorganic apatite/collagen: an experimental study in rat calvaria. **Brazilian dental journal**, v. 22, n. 4, p. 322-328, 2011.

SAKAGUCHI, R. L.; POWERS, J. M. **Capítulo 6: Biocompatibilidade e reação tecidual a biomateriais**. In: _____. **CRAIG Materiais dentários restauradores**. Tradução de Igor Iuco Castro da Silva. 13. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012, p. 117-144.

SATO, K.; URIST, M. Induced regeneration of calvaria by bone morphogenetic protein (BMP) in dogs. **Clinical orthopaedics and related research**, n. 197, p. 301-311, 1985.

SILVA, I. I. C. *et al.* Natural bovine anorganic apatite and collagen presents osteoconductivity and contribute to bone repair of rat calvaria critical size defect. **Key Engineering Materials**, v. 396, n. 2009, p. 249-252, 2009.

SOUSA, B. *et al.* Osteoconduction and Bioresorption of Bone Allograft versus Anorganic Bovine Bone Xenograft: A Histomorphometric Study in Humans. **Journal of Biomimetics, Biomaterials and Tissue Engineering**, v. 18, p. 85-95, 2013.

SCHLIEPHAKE, H. *et al.* Use of a mineralized collagen membrane to enhance repair of calvarial defects in rats. **Clinical oral implants research**, v. 15, n. 1, p. 112-118, 2004.

SCHMITZ, J.; HOLLINGER, J. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clinical orthopaedics and related research**, n. 205, p. 299-308, 1986.

TANG, D. *et al.* Biofabrication of bone tissue: approaches, challenges and translation for bone regeneration. **Biomaterials**, v. 83, p. 363-382, 2016.