

## CAPACIDADE OSTEOGÊNICA DE MEMBRANAS DE COLÁGENO DERIVADAS DA SEROSA DO INTESTINO BOVINO NO TRATAMENTO DE FALHAS ÓSSEAS PROVOCADAS NO CRÂNIO DE RATOS

M. S. Pettian\*, G. R. Santos\*, P. Lenise\*, A. M. G. Pleppis\*\*, V. C. A. Martins\*\*, M.R. Cunha\*

\*Faculdade de Medicina de Jundiaí – FMJ, Jundiaí/SP, Brasil.

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

e-mail: maripettian@gmail.com

**Resumo:** Atualmente há um interesse no desenvolvimento e aperfeiçoamento de biomateriais que possam ser utilizados como alternativa para o reparo de lesões ósseas. A utilização de biomateriais constituídos de elementos de matriz extracelular tridimensionais (MECA) compostos de colágeno apresenta capacidade osteoindutiva além da vantagem de poder sofrer alterações nas propriedades por modificações químicas. Desta maneira novos materiais estão sendo desenvolvidos a partir da serosa do intestino delgado bovino e os resultados esperados são promissores na área de traumatologia, principalmente quando essas membranas são mineralizadas.

**Palavras-chave:** Biomateriais, serosa bovina, membrana aniônica.

**Abstract:** *Currently there is interest in the development and improvement of biomaterials that can be used as an alternative for the repair of bone lesions. The use of biomaterials consisting of elements of three-dimensional extracellular matrix (MECA) composed of collagen has osteoinductive capacity beyond the advantage that it can be changed in the properties by chemical modifications. In this way new materials are being developed from the serosa of the small intestine beef and expected results are promising in the field of traumatology, especially when these membranes are mineralized.*

**Keywords:** *Biomaterials, bovine serous, membrane anion.*

### Introdução

O objetivo principal de um biomaterial é substituir órgão ou tecidos, para isso, é necessário proceder a uma investigação intensa e exaustiva sobre a sua biocompatibilidade e segurança biológica [1]. Nas terapias regenerativas, torna-se fundamental que os biomateriais permitam boa adesão celular a superfícies, tenha resistência adequada, não possua características oncogênicas, seja hemostático, esterilizável e, por fim, que sua produção em larga escala seja fácil e de custo aceitável [2]. Além disso, o material deve apresentar características que estimulem (osteoindução) e/ou guiem (osteocondução) para que estimulem as células indiferenciadas da lesão a converterem-se fenotipicamente em células osteoprogenitoras

essenciais para o processo da neoformação de tecido ósseo [3].

O colágeno apresenta muitas vantagens como biomaterial. Ele pode ser preparado em diferentes formas como membranas, filmes e esferas. As suas vantagens se devem às características como não-tóxico, biocompatível e biodegradável, facilmente reabsorvido pelo corpo [4-7] e baixa antigenicidade. No entanto, seu custo de purificação é extremamente alto e, quando isolado, apresenta alguma variabilidade quanto ao tamanho das fibras, impurezas e densidade de ligações cruzadas que estabilizam a estrutura de suas fibrilas [4].

Os biomateriais poliméricos de colágeno têm como vantagens alterações nas propriedades por modificações químicas nas fibras colagênicas, resultando em matrizes carregadas positiva ou negativamente [8,9]. Cunha *et al.* (2008) observaram boa neoformação óssea ao utilizar matrizes de colágeno polianiónico implantadas em defeitos provocados no fêmur de ratos [10]. Resultados promissores deste biomaterial também foram relatados por Moreira *et al.* (2013) ao observar a proliferação de células ósseas sobre essas matrizes [11]. Um semelhante material promissor para a regeneração tecidual é a utilização das membranas de colágeno derivadas da serosa do intestino delgado (Small Intestinal Submucosa – SIS).

A camada submucosa do intestino delgado está presente entre as camadas mucosa e muscular do intestino, proporcionando elasticidade devido ao colágeno presente em sua estrutura. Devido às suas características, a SIS é apropriada para suportar a incorporação de tecidos em muitos procedimentos cirúrgicos e é preparada de modo a servir de base para o processo de remodelamento cicatricial [12]. Este material demonstrou ser absorvido rapidamente além de suportar a formação de vasos sanguíneos e servir como base para um remodelamento na construção de alguns tecidos do corpo incluindo estruturas músculo-esqueléticas, pele, parede abdominal, dura-máter, bexiga urinária e vasos sanguíneos [12]. Além disso, apresenta-se como um tecido resistente e maleável podendo ser útil como suporte para a proliferação de células no reparo e substituição de tecidos lesados [13].

Segundo Lin *et al.* (2008), a membrana derivada da submucosa do intestino delgado suíno é um material que tem demonstrado baixa imunogenicidade e a

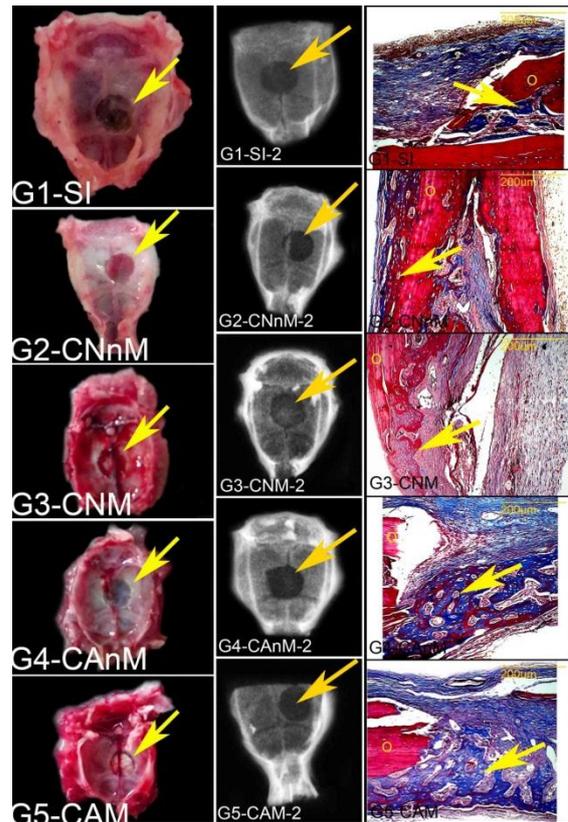
capacidade de aumentar a angiogênese através da liberação de fator de crescimento endotelial vascular durante a biodegradação *in vivo*, tornando seu uso ideal para engenharia de tecidos ósseos [14].

### Materiais e métodos

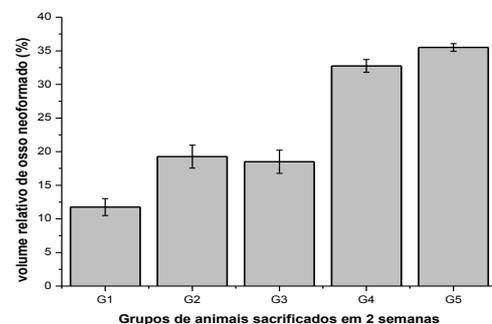
Foram utilizados 30 ratos (*Rattus norvegicus*, Wistar) machos, com aproximadamente 12 semanas de idade e peso médio de 310 gramas, os quais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para criação de um defeito na calvária e sacrificados após duas semanas. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: grupo 1 (SI, controle – sem implante); grupo 2 (CNnM) preenchido com membrana de colágeno nativa não mineralizada; grupo 3 (CNM) usando membrana de colágeno nativa mineralizada; grupo 4 (CANM) com membrana de colágeno aniônica não mineralizada e grupo 5 (CAM) membrana de colágeno aniônica mineralizada. Os animais foram sacrificados após 2 semanas da cirurgia e as calotas retiradas para análises macroscópicas, radiológicas e histomorfométricas. Os dados do volume relativo da neoformação óssea na área óssea lesada foram submetidos ao teste ANOVA seguida de Tukey. Este projeto foi aprovado na Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Jundiaí (CEUA/FMJ), protocolo 327/11.

### Resultados

Nas análises macroscópicas e radiológicas observou-se a integridade do tecido ósseo da área cirúrgica sem indícios de alterações patológicas. Histologicamente notou-se em todos os grupos que a neoformação óssea de natureza imatura projetava as margens do defeito, porém a falha ainda permaneceu aberta e preenchida na maior parte por tecido conectivo (Figura 1). Os valores em percentual (%) do volume relativo do osso jovem dos grupos G1 a G5 foram:  $11,75 \pm 1,25$ ;  $19,25 \pm 1,70$ ;  $18,5 \pm 1,73$ ;  $32,75 \pm 0,95$ ;  $35,5 \pm 0,57$  respectivamente. Na análise estatística observou-se diferenças estatísticas ( $p < 0,01$ ) entre os grupos sendo os maiores valores encontrados para aqueles que receberam as membranas aniônicas (G4 e G5). Além disso, não houve diferença quanto aos valores encontrados para as membranas mineralizadas e não mineralizadas (Figura 2).



**Figura 1:** Coluna 1: Análise macroscópica da calota craniana em vista interna dos grupos (G1 a G5) sacrificados duas semanas pós-operatório. Notou-se a integridade anatômica dos ossos parietais e ausência de deformidades e sinais clínicos sugestivos de processos infecciosos (setas). Coluna 2: Radiografia das calotas dos grupos (G1 a G5) sacrificados após duas (2). Observou-se a arquitetura anatômica íntegra e a definição do defeito (seta) não regenerado. Coluna 3: Fotomicrografias dos grupos G1 a G5 sacrificados duas semanas após cirurgia. Observou-se a nitidez das lacunas (seta) de osteócitos na matriz óssea de natureza imatura corada em azul, osso original em vermelho (O) e também as fibras de colágeno na matriz extracelular. Coloração de Tricrômico de Masson. Objetiva 10x.



**Figura 2:** Estereologia do volume relativo da matriz óssea formada nas áreas cirúrgicas dos grupos sacrificados duas semanas.

## Discussão

Na ortopedia, traumatologia, cirurgia plástica reconstrutora e odontologia existem diversos desafios clínicos quanto ao tratamento dos graves defeitos ósseos decorrentes de anomalias congênitas e adquiridas, ressecções extensas de tumores ósseos, seqüela de infecções ósseas e fraturas gravemente cominutivas com perda de massa óssea [10,15].

O reparo dessas variadas lesões ósseas depende de alguns pré-requisitos biológicos essenciais para consolidação [15,16].

Nesta pesquisa, avaliou a viabilidade de uma nova matriz de colágeno derivada da serosa do intestino delgado (SIS) bovino como biomaterial para o reparo ósseo visto que várias pesquisas têm estudado a propriedade osteogênica de esponjas biológicas derivadas da serosa do intestino suíno, porém ainda há incerteza quanto a sua real capacidade osteoregenerativa [17-22].

Segundo Spector *et al.* (1979), nas primeiras semanas do reparo de defeito ósseo enxertado com biomateriais porosos ocorre uma resposta inflamatória e formação de coágulo que posteriormente torna-se organizado e contendo fibrina e plaquetas [23]. Em seguida, já a proliferação de células osteoprogenitoras promovendo a formação de osso trabeculado após quatro semanas da implantação do biomaterial, completando assim, o primeiro estágio de crescimento ósseo. O segundo estágio é caracterizado pelo remodelamento do osso jovem sendo influenciado pelas características do biomaterial [24]. Essas descrições estão de acordo com os achados histológicos desta pesquisa onde se notou osso neoformado de natureza trabeculada e imatura nas áreas cirúrgicas dos animais sacrificados em duas semanas. Entretanto, nos achados radiológicos não foi possível a visualização radiopaca desta neoformação óssea, pois segundo Fehlberg (2001), em todo processo de reparação óssea, desenvolve-se, inicialmente, tecido conjuntivo no foco da lesão, cuja radiopacidade é insuficiente para ser perceptível ao exame radiográfico, pelo fato de os constituintes químicos do tecido neoformado serem de baixo número atômico [25,26].

Os resultados radiológicos desta pesquisa também foram similares ao descrito na literatura quanto a radiolucidez do tecido ósseo neoformado. Além disso, não se visualizou as membranas de colágeno implantadas assim como também relatado por Keskin *et al.* (2008) que notaram imagem radiográfica totalmente translúcida das matrizes derivadas da SIS [19, 27]. Entretanto, esses mesmo autores observaram imagem radiopaca da neoformação óssea ocorrida no centro e periferia do defeito. Desta maneira, demonstraram que a favorável função osteogênica da submucosa intestinal e a sua capacidade como arcabouço para o reparo ósseo merece maior atenção quanto ao seu uso nas terapias regenerativas.

Apesar dos resultados promissores obtidos nessa pesquisa quanto a capacidade osteoregenerativa da SIS

bovina, ainda notou-se a presença de tecido fibroso nas áreas cirúrgicas. Desta maneira, a busca do biomaterial ideal para enxertia ainda é um desafio, pois o seu processo de osteointegração depende da sua constituição biológica capaz de mimetizar as favoráveis propriedades dos enxertos autólogos que ainda é o “padrão ouro” na cirurgia ortopédica e bucomaxilofacial.

## Conclusão

A membrana de colágeno aniônica apresentou maior capacidade osteogênica e a mineralização das membranas não estimulou a neoformação óssea durante o reparo do defeito.

## Agradecimentos

Aos professores doutores Marcelo Rodrigues da Cunha, Ana Maria de Guzzi Pleppis, Virgínia da Conceição Amaro Martins e Sérgio Yoshioka.

A Faculdade de Medicina de Jundiaí (FMJ) e ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ/USP), campus São Carlos/SP.

Ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

## Referências

- [1]. Afonso AS. Interação entre biomateriais e tecido ósseo. Dissertação (Doutorado) – Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto. 1998.
- [2]. Gutierrez M, Lopes MA, Hussain NS, Cabral AT, Almeida L, Santos JD. Substitutos ósseos: conceitos gerais e estado atual Arq. Med. 2006;19:153-163.
- [3]. Cardoso AKMV, Barbosa AA, Miguel FB, Marcantonio E, Farina M, Soares GD, Rosa FP. Histomorphometric analysis of tissue responses to bioactive glass implants in critical defects in rat calvaria. Cells Tissues Organs. 2006;184(3-4):128-137.
- [4]. Werkmeister JA and Ramshaw JA. Collagen-based biomaterials. Clin Mater. 1992;9:137-138.
- [5]. Friess W. Collagen-biomaterial for drug delivery. Eur J Pharm Biopharm. 1998;45:113-136.
- [6]. Sano A, Hojo T, Maeda M, Fujioka K. Protein release from collagen matrices. Adv Drug Deliv Rev. 1998;31:247-266.
- [7]. Maeda M, Tani S, Sano A, Fujioka K. Microstructure and release characteristics of the minipellet, a collagen-based drug delivery system for controlled release of protein drugs. J Control Release. 1999;62:313-324.
- [8]. Rumi NM, Deol GS, Sinagpuri KP, Pellegrini HJ. The origin of osteoprogenitor cells responsible for heterotopic ossification

- following hip surgery: na animal model in the rabbit. *J Orthop Res*. 2005;23:34-40.
- [9]. Noguti J. Estudo do efeito do ozônio diluído em água na reparação óssea através de avaliação imunoistoquímica. Dissertação (Mestre) Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. 2010.
- [10]. Cunha MR, Goissis G, Genari SC. Implants of polyanionic collagen matrix in bone defects of ovariectomized rats. *J. Mater. Sci: Mater Med*. 2008.
- [11]. Moreira PL, Genari SC, Goissis G, Galemberck F, Yuehei H, Santos AR. Bovine osteoblasts cultured on polyanionic collagen scaffolds: na ultrastructural and immunocytochemical study. *Society for Biomaterials*. 2013;101B;18-27.
- [12]. Girardi RCG. Comportamento de matrizes de colágeno utilizadas no tratamento de feridas planas induzidas em pele de rato. Dissertação (Mestrado) Universidade de São Carlos. 2005 apud Badylak S, et al. Endothelial cell adherence to small intestinal submucosa: na acelular bioscaffold. *Biomater* Guildford. 1999;20(21):2257-2263.
- [13]. Girardi RCG. Comportamento de matrizes de colágeno utilizadas no tratamento de feridas planas induzidas em pele de rato. Dissertação (Mestrado) Universidade de São Carlos. 2005.
- [14]. Lin Z, Jun-Li Z, Lin W, Shuan-Ke W. The study of the feasibility of segmental bone defect. Repair with tissue engineered bone membrane: a qualitative observation. *Strategies Trauma Limb Reconstr*. 2008;3(2):57-64.
- [15]. Dimitriou R, Mataliotakis GL, Calori GM, Giannoudis PV. The role of barrier membranes for guided bone regeneration and restoration of large bone defects: current experimental and clinical evidence. *BMC Medicine*. 2012;10:81.
- [16]. Zimmermann GA and Moghaddam A. Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. *Injury, Int. J. Care Injured*. 2011;42;S16-S21.
- [17]. Suckow MA, Voytik-Harbin SL, Terril LA, Badylak SF. Enhanced bone regeneration using porcine small intestinal submucosa. *J Invest Surg*. 1999;12:277-287.
- [18]. Soccoll AT, Bettega S, Noronha L, Sass S, Soccol VT, Scholz MR, Mocelin M. Defect repair in rat mandible with hydroxyapatite cement compared to small intestine submucosa. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2006;72(2):195-199.
- [19]. Keskin M, Kelly CP, Moreira AG, Loboeki C, Yarim M, Kaplan S, Jackson IT. Repairing critical-sized rat calvarial defects with a periosteal cell-seeded small intestinal submucosal layer. *Plast Reconstr Surg*. 2008;122(2):400-409.
- [20]. Kim BS and Mooney DJ. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends Biotechnol*. 1998;16:224-230.
- [21]. Moore DC, Pedrozo HA, Crisco JJ, Ehrlich MG. Preformed grafts of porcine small intestine submucosa (SIS) for bridging segmental bone defects. *J Biomed Mater*. 2004;69:259.
- [22]. Zhao L, Zhao J, Wang S, Wang J, Liu J. Comparative study between tissue-engineered periosteum and structural allograft in rabbit critical-sized radial defect model. *J Biomed Mater Res Appl Biomater*. 2011;97(1):1-9.
- [23]. Spector M, Harmon SL, Kreutner A. Characteristics of tissue growth into proplast and porous polyethylene implants in bone. *J Biomed Mater Res*. 1979;13(5):677-692.
- [24]. Weinans H, Huiskes R, Rietbergen B, Summer DR, Turner TM, Galante JO. Adaptive bone remodeling around bonded noncemented total hip arthroplasty: a comparison between animal experiments and computer simulation. *J Orthop Res*. 1993;11(4):500-513.
- [25]. Fehlberg AF. Hidroxiapatita sintética na regeneração da falha óssea provocada em fratura completa de terço intermédio de tíbia imobilizada pela fixação percutânea em cães. 2001. 42f Tese (Mestrado) – Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- [26]. Vital CC, Borges APB, Fonseca CC. Biocompatibilidade e comportamento de comósitos de hidroxiapatita em falha óssea na ulna de coelhos. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2006;58:175-183.
- [27]. Cunha MR, Gushiken VO, Issa JPM, Iatecola A, Pettian MS, Santos AR. Osteoconductive capacity of hydroxyapatite implanted into the skull of diabetics. *J Craniofac Surg*. 2012;22(6):2048-2052.