

Cultura de osteoblastos sobre membranas de colágeno polianiónico: avaliação preliminar do potencial de indução da formação de tecido ósseo visando reparação tecidual

Culture of osteoblasts on polyanionic collagen membranes: a preliminary evaluation of the potential for induction of bone tissue formation aiming for tissue repair

Marcelo R. Cunha¹, Arnaldo R. Santos Jr.¹, Selma C. Genari¹²

RESUMO

Atualmente, observa-se a alta de incidência de lesões provocadas por traumas e choques mecânicos causados por diferentes fatores, caracterizadas principalmente pelas fraturas ósseas. Desta maneira, existe um interesse no desenvolvimento de biomateriais que possam ser utilizados como implantes no do tecido ósseo, e que atuem como indutores do processo de reparação óssea. Matrizes extracelulares tridimensionais compostas de colágeno apresentam a vantagem de poder ser modificadas em suas propriedades mecânicas e fisiológicas por métodos físicos ou químicos, resultando em matrizes carregadas positivo ou negativamente. O presente trabalho visa avaliar a capacidade das membranas tridimensionais de colágeno polianiónico e nativo no processo de consolidação de fraturas com perda de massa óssea. Utilizamos osteoblastos cultivados sobre esses biomateriais antes do implante no crânio de ratos linhagem *Rowett nude*. Observamos que os osteoblastos cultivados sobre o colágeno polianiónico foram capazes de formar tecido semelhante ao ósseo nas membranas e preencher a área lesada nos implantes realizados nos animais. Concluímos que as membranas de colágeno polianiónico são uma alternativa viável para a reconstrução tecidual e engenharia de tecidos.

¹ Docentes do Instituto de Ciências Biológicas, Centro Regional Universitário de Espírito Santo do Pinhal (UNIPINHAL), Espírito Santo do Pinhal, SP. CEP 13990-000, Espírito Santo do Pinhal, SP.

² Autor para envio de correspondência. e-mail: sgenari@nutricell.com.br

Palavras chave: Colágeno polianiónico, regeneração tecidual, cultura de células, osteoblastos, tecido ósseo.

ABSTRACT

At present, There are a high of incidence of wounds promoted by traumas and mechanical shocks caused by different factors, characterized mainly by bone fractures. Of this way, exist an interest in the development of biomaterials that can be used as implants in bone tissue for bone repair. Three-dimensional extracellular matrices composed of collagen present the advantage of be able to will be modified in his physiological and mechanical estates by physical or chemical approaches, resulting in positive or negatively loaded matrices. The present work is going to evaluate the capacity of the three-dimensional membranes of native and polyanionic collagen in the fractures consolidation trial with loss of bone mass. We used osteoblasts cultured on those biomateriais before of its implants in the skull of *Rowett nude* lineage mice. We observe that the osteoblasts cultured on polyanionic collagen were capable to form a bone-like tissue structure in the membranes and fill the damaged area in implants carried out in animals. We conclude that the polyanionic collagen membranes are a viable alternative for the tissue reconstruction and engineering.

Key words: Polyanionic collagen, tissue regeneration, cell culture, osteoblasts, bone tissue

INTRODUÇÃO

Defeitos com perda de massa óssea resultante de fraturas patológicas ou traumáticas, desenvolvimento anormal do esqueleto e ressecção de tumores, freqüentemente são reparados com utilização de enxertos ósseos autógenos. Os enxertos ósseos autógenos são considerados vantajosos uma vez que evitam complicações de rejeição imunológica e fornecem células que podem imediatamente começar o processo regenerativo (ISHAUG-RILEY ET AL., 1997). No entanto, eles apresentam algumas desvantagens como: morbidade da área doadora, reabsorção pós-operatório, contornos irregulares dos enxertos angulares (MARK ET AL., 1990) e complicações como dor crônica e lesões vasculares durante o procedimento cirúrgico (YOUNGER E CHAPMAN, 1989). Além disso, a incorporação deste enxerto pode sofrer influências de outros fatores como presença ou ausência do perióstio, orientação do enxerto, viabilidade do enxerto ósseo vascularizado, tipo de fixação, posição do enxerto em relação ao stress mecânico e origem embrionária (HARDESTY E MARSH, 1990). Outro ponto negativo dessa técnica é a difícil obtenção do enxerto, quando solicitado em grande quantidade (BROWN ET AL., 1976; RISH ET AL., 1976).

Diante das limitações da utilização dos enxertos ósseos autógenos, alguns materiais biocompatíveis vêm sendo pesquisados para substituí-los na aplicação clínica, tais como as cerâmicas, metais, silicone, polimetilmetacrilato, polietileno (BREITBART ET AL., 1998). Contudo, os efeitos citotóxicos de alguns desses biomateriais constitui uma contra-indicação ao seu uso (WEISS E REDDY, 1981), além da dificuldade do material em moldar o contorno do defeito ósseo, baixa resistência mecânica, demora na incorporação com o osso, estando também sujeitos ao processo de corrosão nos casos dos implantes metálicos, aumentando assim o prognóstico à reparação total da falha óssea.

O colágeno é considerado um dos mais proveitosos biomateriais (CHEN ET AL., 2000). A boa biocompatibilidade e segurança devido as suas características biológicas tornam-o um recurso fundamental à aplicação médica. Devido a sua atividade osteoindutiva, o colágeno é considerado um

bom substituto ósseo. Além disso, a matriz colagênica estimula a migração e infiltração celular, suporta a proliferação celular, ou seja, possui propriedades importantes para facilitar o processo regenerativo (TUAN ET AL., 1994). Uma atenção especial está voltada para membranas de colágeno na forma de Matrizes Extracelulares artificiais (MECa) devido a sua indução a mineralização e a síntese de células osteogênicas além de sua biocompatibilidade, características essenciais para um biomaterial quando utilizado como enxerto ósseo.

A utilização de MECa composta de colágeno/elastina ainda apresenta a vantagem de sofrer alterações nas propriedades por modificações químicas do colágeno que trazem melhora nas propriedades mecânicas e fisiológicas do MECa (SINGH ET AL., 1995; JAYASHRISHNAM E JAMELA, 1996). Com as vantagens das membranas poliméricas naturais, como o colágeno, em relação aos demais tipos de enxertia, o presente trabalho visa avaliar a capacidade das membranas tridimensionais de MECa de colágeno/elastina nativa e membranas de colágeno aniônico/elastina no processo de consolidação de uma fratura com perda de massa óssea, como será simulado em animais experimentais, definindo assim, as propriedades destes tipos de materiais e a sua respectiva viabilidade como substituto ósseo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção dos materiais – MECa

A matéria prima utilizada para a preparação das membranas tridimensionais de colágeno/elastina para a obtenção das Matrizes Extracelulares artificiais (MECa), foi obtida a partir de Pericárdio Bovino (PB), fornecido pela Braile Biomédica S/A de São José do Rio Preto. A MECa foi preparada e fornecida pelo Instituto de Química de São Carlos, da USP, sob supervisão do Prof. Dr. Gilberto Goissis. As amostras obtidas sob as quais serão cultivados osteoblastos são: membranas tridimensionais de MECa de colágeno/elastina aniônicas com tempo de tratamento alcalino de 48 horas.

Cultura Celular

As células utilizadas nesse trabalho foram a OF COLL II (linhagem de osteoblastos de camundongo, fornecidos pelo Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro). Essas células foram cultivadas em meio Ham F-12 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO - USA), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB - Nutricell, Campinas, SP - Brasil) a 37°C e mantidas no Laboratório de Cultura Celular do Departamento de Biologia Celular da UNICAMP. As células forma cultivadas sob membranas tridimensionais de MECa de colágeno/elastina aniônicas com tempo de tratamento alcalino de 48 horas.

Estudo *in vivo*

O presente trabalho utilizou-se animais da linhagem *Rowett nude*, fornecidos pelo CEMIB da UNICAMP. Para o procedimento cirúrgico, inicialmente os animais foram pesados e anestesiados com solução de Ketamina (Francootar) e Cloridrato de Xylazina (Virbaxyl 2%) na proporção 1:1 e na dose 0,10 ml/100 gramas de massa corporal, via muscular. Com os animais posicionados em decúbito ventral e com auxílio de bisturi, realizou-se uma incisão longitudinal mediana na pele da calota craniana. Com o osso parietal esquerdo exposto, foi feita uma falha no mesmo usando uma broca trefina de 6 mm de diâmetro acoplado a um mini-motor. Em seguida, a falha foi preenchida com uma membrana de colágeno com células osteoblásticas (ver cultura celular) em forma de disco tendo cerca de 7 mm de diâmetro. A pele foi repostada e suturada usando fio de algodão 4.0.

Estudo macroscópico

Imediatamente ao sacrifício, as calotas cranianas foram retiradas e fotografadas para observar a presença de sinais de rejeição ao implante e também o comportamento da membrana quanto a sua integração com o tecido ósseo.

Estudo histológico

Após 8 semanas, os animais foram sacrificados e as calotas cranianas retiradas e submetidas aos métodos histológicos de rotina (fixação, inclusão e corte) e coloração com hematoxilina e eosina. As amostras obtidas foram fotografadas em microscópio óptico Olympus modelo CX40.

Estudo radiográfico

As radiografias dos crânios dos animais foram feitas em um aparelho radiográfico Rigaku RU-200 com ponto focal de 0,8 x 0,8mm, com utilização de películas radiográficas odontológicas oclusais Kodak de tamanho 7,6 x 5,7mm.

RESULTADOS

Análise macroscópica

Não se observou a formação de calo ósseo após 8 semanas do implante. A membrana de colágeno/elastina implantada pôde ser facilmente identificada, sem evidências de alterações patológicas locais (Fig. 1). Assim sendo, pelos aspectos macroscópicos, este tipo de biomaterial colagênico demonstra apresentar uma boa interatividade com o tecido ósseo.

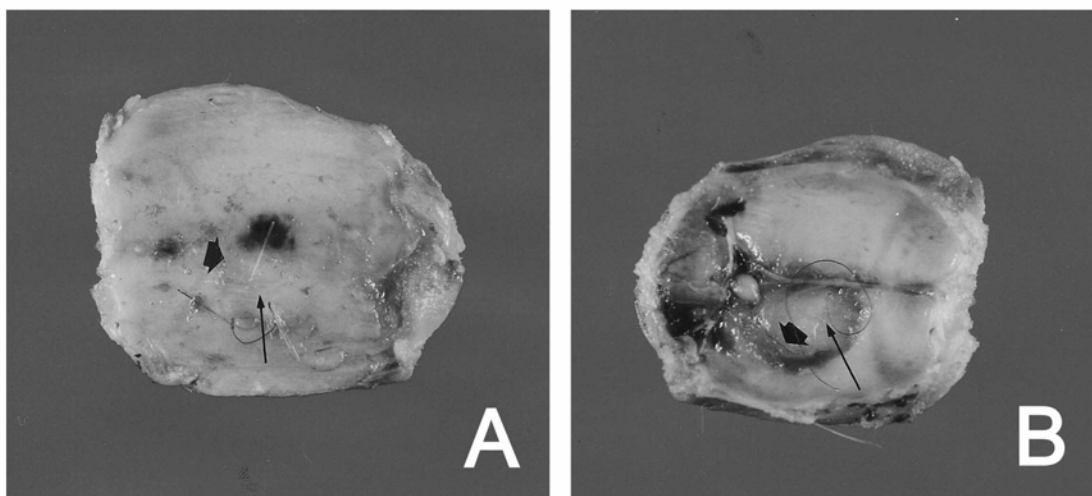
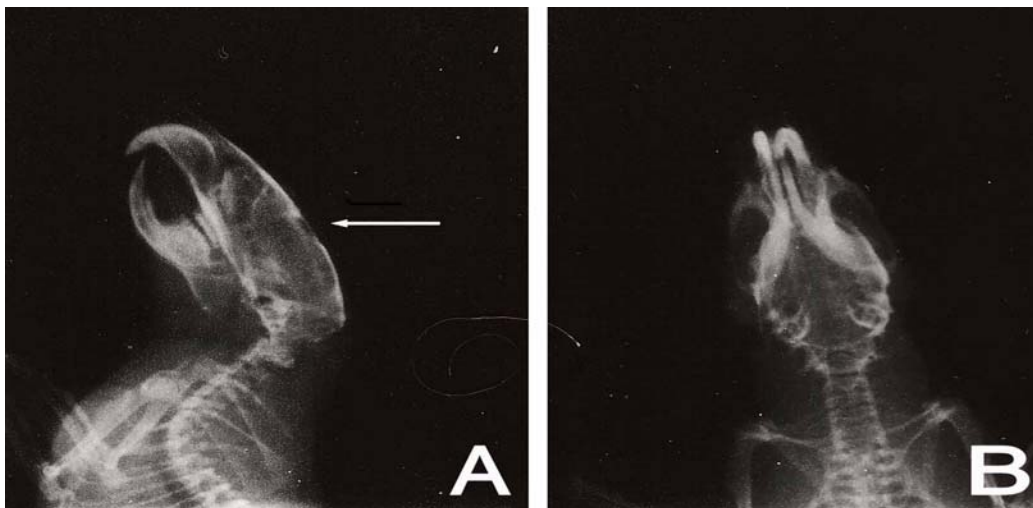


Figura 1. Calota craniana vista superior (A) e inferior (B). Notar o implante de membrana de colágeno com tempo de tratamento alcalino de 48 horas (seta fina) e a sua completa integração (seta espessa) com a margem óssea do osso parietal. Não há sinais de rejeição imunológica ao implante.

Análise radiológica

Nos animais que receberam por 8 semanas implantes de membranas de colágeno com 48 horas de tratamento alcalino ficou evidente, uma depressão na calota craniana devido à falha óssea produzida. Neste sítio pôde ser observada uma linha óssea radiopaca na parte superior unindo as margens ósseas do osso parietal, o que comprova a neoformação óssea e o início da reparação óssea. Na margem anterior da área receptora, observa-se também um ponto ósseo mais radiopaco e espesso (Fig. 2).

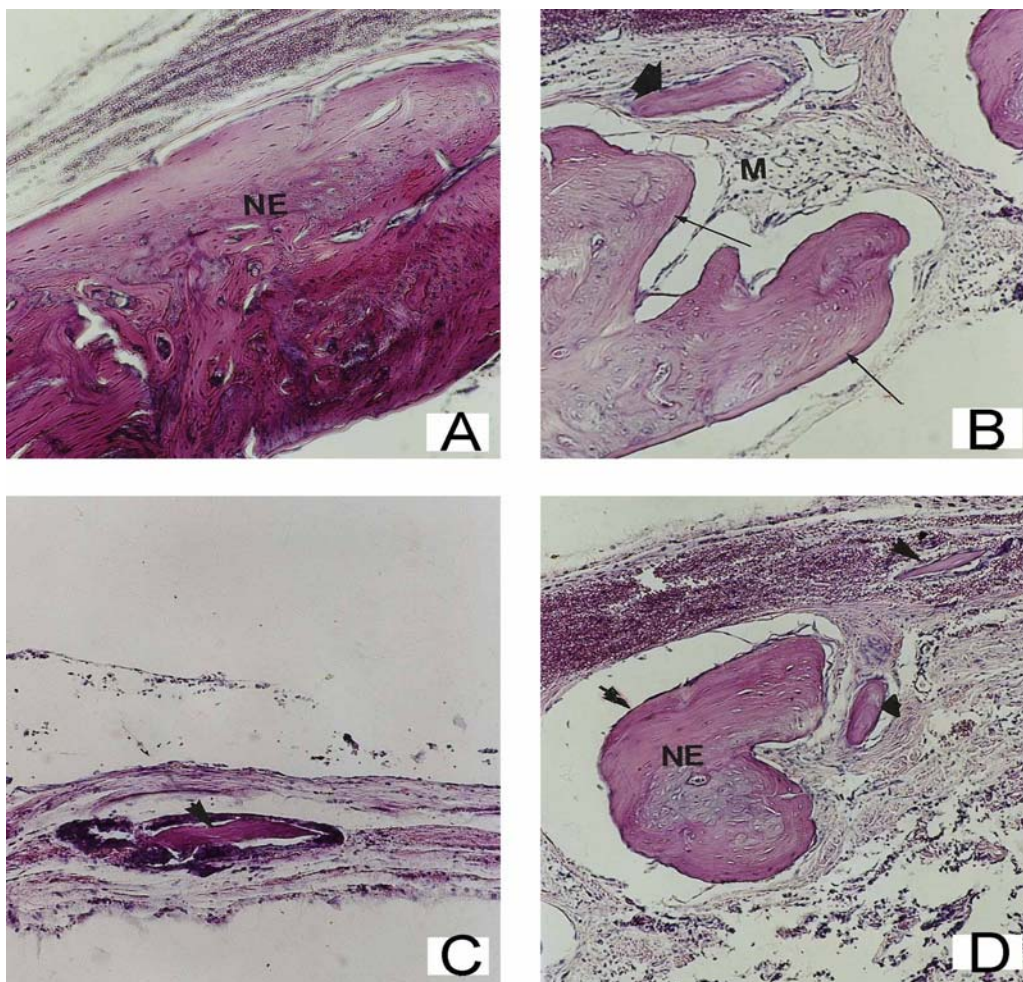


Figuras 2. Imagem radiográfica dos animais com 8 semanas de implante das membranas de colágeno de 48 horas de tratamento alcalino. Observe a vista lateral (A) e superior (B) da implantação na calota craniana. Note a depressão óssea (seta pequena) na calota craniana e pontos mais radiopacos do osso na parte anterior da falha óssea (seta espessa). Notar a linha óssea unindo a margem anterior com a posterior na área receptora (cabeça da seta).

Análise histológica.

Após 8 semanas da implantação da membrana de colágeno/elastina, notou-se a neoformação de tecido ósseo na área receptora. Nas margens da falha óssea observou que o osso jovem apresentava-se volumoso quando comparado com a cortical óssea do parietal. O osso formado havia áreas com características de osso imaturo, ou seja, com osteócitos volumosos, arredondados que se dispunham próximos uns aos outros e em várias direções, sem orientação definida. Em outras regiões, o osso neoformado apresentou características de osso maturo, com osteócitos achatados, dispostos organizadamente e em

pequena proporção (Fig. 3A). O osso formado projetava-se em direção a membrana de colágeno, obtendo assim uma boa osteointegração. Verificaram-se também pequenos pontos isolados de neoformação óssea no interior da membrana de colágeno (Fig. 3B e 3C). Em outros pontos do local do implante, puderam ser observados no interior das membranas, grandes pontos de neoformação óssea (Fig. 3D).



Figuras 3. Corte transversal do osso parietal do animal após 8 semanas da implantação de membrana de colágeno 48 horas de tratamento alcalino, corados com HE. Na figura 3A, notar osso neoformado (NE) volumoso comparado com a cortical do parietal (C). Na figura 3B, observar projeção (setas finas) do osso formado em direção a membrana de colágeno (M) e pontos ósseos isolados (setas espessas) no interior da membrana. Nas figuras 3C e 3D, verificar pequenos e grandes pontos (cabeças das setas) de neoformação óssea (NE) na membrana de colágeno (aumento 200x).

DISCUSSÃO

Atualmente, observa-se uma alta de incidência de lesões provocadas por traumas e choques mecânicos causados por diferentes fatores, sendo que pelo menos 2/3 das lesões que acometem o homem envolvem o sistema músculo-esquelético. Essas lesões são caracterizadas principalmente por fraturas ósseas e são responsáveis por grandes investimentos no setor da saúde (SALTER, 2001). Desta maneira, existe um interesse no desenvolvimento e aperfeiçoamento de biomateriais que possam ser utilizados na substituição do tecido ósseo, e mais ainda, que atuem como indutores do processo de reparação óssea. Grande interesse se apresenta também no desenvolvimento de metodologias que possibilitem uma melhor regeneração do osso lesado. Dentre essas novas tecnologias, a engenharia de tecidos tem obtido destaque.

As aplicações da bioengenharia de tecidos vêm permitindo a utilização de células autógenas (do próprio paciente) cultivadas sobre moldes de materiais biocompatíveis, os quais são posteriormente reimplantadas ao tecido lesado. Essa metodologia abre grandes perspectivas de aplicação na área médica, permitindo a realização de implantes de enxertos em tecidos lesados com maior benefício ao paciente, pois pela utilização desta metodologia, apenas um pequeno número de células serão necessárias inicialmente, as quais serão expandidas *in vitro*, e também pelo fato de que evitará problemas imunológicos como a rejeição dos transplantes não autógenos (TEMENOFF E MIKOS, 2000).

Desde 1960, membranas poliméricas têm sido usadas em animais para facilitar o reparo de defeitos ósseos. Tem sido aceito que essas membranas agem como barreira na prevenção do crescimento de tecido conjuntivo junto ao defeito, permitindo somente a neoformação óssea. Ultimamente, as aplicações de membranas poliméricas têm sido direcionadas ao tratamento de grandes defeitos na diáfise óssea. Essas membranas podem ser usadas de forma isolada ou associadas a substâncias osteogênicas. Tais membranas podem ser preparadas usando polímeros bioabsorvíveis ou não. Polímeros naturais como

colágeno, proteoglicanos, glicosamionoglicanos e elastina além de biocompatível, participam no controle da estrutura do tecido e na regulação do fenótipo celular. Assim, o colágeno, principal composto orgânico do tecido ósseo, vem sendo amplamente usado como material na fabricação de biomateriais (KIM E MOONEY, 1998).

Considerando que a matriz extracelular envolve as células e promove a integração morfofuncional dos tecidos, a utilização de implantes que simulam essa matriz é uma tendência na área de biologia regenerativa. A matriz extracelular do osso é composta por 90% de proteínas colagênicas (97% colágeno tipo I e 3% colágeno tipo V) e 10 % de proteínas não colágenas (osteocalcina, osteonectina, proteoglicanos, fibronectina, fatores de crescimento, proteínas morfogenéticas, e outros). Todas essas proteínas são sintetizadas por osteoblastos e muitas estão envolvidas na adesão. Num estudo clínico, membranas de colágeno foram implantadas em fissuras bucais de pacientes com o intuito de avaliar a ossificação do defeito ósseo após cirurgia na boca. Dentro de um período de observação de 9 meses observou maior formação óssea na membrana comparado com o controle. Além disso, a membrana não induziu resposta imunológica. Este resultado sugere essas membranas como uma nova ferramenta à aplicação em cirurgias dentais e guia para regeneração óssea (SCHLEGEL ET AL., 1997).

A utilização de uma MECa composta de colágeno/elastina ainda apresenta a vantagem de sofrer alterações nas propriedades por modificações químicas do colágeno, resultando em matrizes carregadas positivo ou negativamente (REID ET AL., 1993; SINGH ET AL., 1995; JAYHRISHNAM E JAMELA, 1996). Tais modificações podem melhorar as propriedades mecânicas e fisiológicas do MECa. A principal característica do aumento de cargas negativas está no melhoramento das propriedades dielétricas em relação àquelas encontradas no colágeno nativo. Krukowski et al. (1991) mostraram que superfícies carregadas positivamente induziram a formação de tecido conjuntivo. Por outro lado, quando carregadas negativamente estimularam a formação de tecido ósseo intramedular.

O colágeno em combinação com outros polímeros vem sendo usado como implante visando à correção de defeitos ortopédicos, promoção da

regeneração de fraturas, ou em processos de osteosíntese. Em um experimento clássico, colágeno obtido de osso desmineralizado foi usado, como material de enxertia óssea para o tratamento de alterações ósseas congênitas e adquiridas, na forma nativa ou em combinação com hidroxiapatita. O resultado deste estudo mostrou que o colágeno de osso desmineralizado enxertado em combinação com a hidroxiapatita, foi um excelente material osteoindutivo, podendo assim, ser usado como substituto ósseo (Takaoka et al, 1988).

Goissis et al. (2003) avaliando colágeno polianiónico como suporte à reconstrução de tecido ósseo, observou que colágeno aniônico *in vitro* foi capaz de induzir depósito de sais de fosfato de cálcio, sugerindo assim que mudanças dielétricas na matriz colagênica pode ter sido o indutor ao processo de mineralização do colágeno *in vitro*, como um sistema semelhante ao estágio de mineralização do osso.

Nesse trabalho observamos que as membranas de colágeno aniônico, submetidos a um tratamento alcalino por 48h, foram capazes de sustentar o crescimento de osteoblasto por cerca de 8 semanas. Além disso, observamos a formação de tecido ósseo no interior dessas membranas, sugerindo que as mesmas estimulam a formação de matriz óssea por parte dos osteoblastos. Com estes resultados pode-se notar que a membrana de colágeno apresenta osteocondutividade, caracterizando assim um método alternativo e promissor na área clínica de implantologia e na engenharia de tecidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BREITBART, A.S.; GRANDE, D.A.; KESSLER, R.; JAMES, RYABY, J.T.; FITZSIMMONS, R.J.; GRANT, R.T. Tissue engineered bone repair of calvarial defects using cultured peristeal cell. **Plastic Reconstruct. Surg**, v. 101, n.3, p.567-581, 1998.

BROWN, M.D.; MAILININ, T.I.; DAVID, P.B. A roentgenographic evaluation of frozen allografts versus autografts in anterior cervical spine fusions. **Clin. Orthop.**, v.119, p. 231-236, 1976.

CHEN, Y.S.; HSIEH, C.L.; TSAI, C.C.; CEHEN, T.H.; CHENG, W.C.; HU, C.L.; YAO, C.H. Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers

- filled with collagen, laminin and fibronectin. **Biomaterials**, v.21, p. 1541, 2000
- GOISSIS, G.; MAGINADOR, S.V.S.; MARTINS, V.C.A. Biomimetic mineralization of charged collagen matrix: in vitro and in vivo study. **Artif Organs**, v.27, p.437-443, 2003.
- HARDESTY, R.A.; MARSH, J.L. Craniofacial onlay bone grafting: a prospective evaluation of graft morphology orientation and embryonic origin. **Plastic Reconstruc. Surg**, v.85, nº1, p.5-14, 1990.
- ISHAUG-RILEY, S.L.; CRANE, G.M.; GURLEK, A.; MILLER, M.J.; YASKO, A.W.; YASZEMSKI, M.J.; MIKOS, A.G. Ectopic bone formation by marrow stromal osteoblast transplantation using poly(L-lactic-co-glycolic acid) foams implanted into the rat mesentery. **J. Biomed. Mater. Res**, v.36, p.1-8, 1997.
- JAYAKRISHNAM, A.; JAMELA, S.R. Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices. **Biomaterials**, v.17, p.471-484, 1996.
- KIM, B.S.; MOONEY, D.J. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. **Trends Biotechnol.**, v.16, p. 224-29, 1998.
- KRUKOWSKI, M. Hard and soft connective tissue growth and repair in response to charged surfaces. In: DAVIES, J.E., ed. **The bone – Biomaterial interface**. Toronto, University of Toronto Press, 1991. Cap.25, p.275-284.
- MARK, D.E.; HOLLINGER, J.O.; HASTINGS, C. Jr.; CHEN, G.; MARDEN, L.J.; REDDI, A.H. Repair of calvarial nonunions by osteogenin, a bone inductive protein. **Plastic Reconstruc. Surg**, v.86, nº4, p.623-630 1990.
- REID, G.G.; GORHAM, S.D.; LACKIE, J.M. The attachment, spreading and growth of baby hamster kidney cells on collagen, chemically modified collagen-composite substrata. **J. Mat. Sci. Mater. Med.**, v.4, p.201-209, 1993.
- RISH, B.L., McFADDEN, J.T., PENIX, J.O. Anterior cervical fusion using homologous bone grafts. A comparative study. **Surg. Neurol.**, v.5, p.119-121, 1976.
- SALTER, R.B. **Distúrbios e lesões do sistema musculoesquelético**, 3ª edição, ed. MEDSI, cap. 15, 2001.
- SCHLEGEL, A.K.; MOHLER, H.; BUSCH, F.; MEHL, A. Preclinical and clinical studies of a collagen membrane. **Biomaterials**, v. 18, p. 535- 538, 1997.
- SINGH, M.P.; STEFKO, J.; LUMPKIN, J.A.; ROSENBLATT, J. The effect of electrostatic charge interactions on release rates of gentamicin from collagen matrices. **Pharm. Res.**, v.12, p.1205-1210, 1995.

- TAKAOKA, K.; NAKAHARA, H.; YOSHIKAWA, H.; MASUHARA, K.; TSUDA, T.; ONO, K. 1988. Ectopic bone induction on and in porous hydroxyapatite combined with collagen and bone morphogenetic protein. **Clin. Ortoped.**, v. 234, p.250-254, 1988.
- TEMENOFF, J.S.; MIKOS, A.G. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. **Biomaterials**, v.21, p.431-440, 2000.
- TUAN, T.L.; KELLER, L.C.; SUN,D.; NIMNI, M.E.; CHEUNG, D. Dermal fibroblasts activate keratinocyte outgrowth on collagen gels. **J. Cell Sci.**, v.107, p. 2285–2289, 1994.
- WEISS, R.E.; REDDY, A.H. Appearance of fibronectin during the differentiation of cartilage, bone and bone marrow, **J. Cell Biol.**, v.88, p.630-636, 1981.
- YOUNGER, E.M.; CHAPMAN, M.N. Morbidity at bone graft donor sites. **J. Orthop. Trauma**. v.3, p.192-195, 1989.