

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Avaliação *in vivo* dos Efeitos do Resveratrol em
Processos de Neoformação Óssea em Coelhos

Tese apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular
e Molecular como requisito para
obtenção do grau de Doutor.

Autor
Sérgio Alexandre Gehrke

Orientador
Prof. Dr. André Arigony Souto

Porto Alegre, RS
09, 2010

*À minha Família:
Manúcia, Arthur,
Luisa e Henrique.*

Agradecimentos

- Aos meus pais, pelos valores que me ensinaram.
- À minha esposa pela colaboração e paciência durante mais esses quatro anos...
- Aos meus filhos, que são minha fonte de inspiração e força.
- Ao grupo do LACHEN da Universidade Federal de Santa Maria, pelo apoio no desenvolvimento do trabalho.
- Ao Professor André Arigony Souto, meu orientador, pelo grande estímulo e amizade durante esses anos.

Índice

Dedicatória	i
Agradecimentos	ii
Índice	iii
Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	vii
Lista de Gráficos	vii
Lista de Abreviaturas e Siglas	ix
Resumo	xi
Abstract	xii
1 – Capítulo 1	01
1.1 Introdução	02
1.1.1 Estrutura celular e molecular do tecido ósseo	04
1.1.2 Metabolismo ósseo	06
1.1.3 Neoformação óssea (Modelagem e remodelagem óssea)	07
1.1.3.1 Mecanismo celular e molecular da neoformação óssea	08
1.1.4 Conceitos e classificação dos materiais e mecanismos para a neoformação óssea	10
1.1.5 Eventos moleculares do mecanismo de diferenciação celular durante a neoformação óssea e o mecanismo de estresse ósseo	12
1.1.6 O NF-kB e o estresse oxidativo	15
1.1.7 Bioatividade do resveratrol	17
1.1.8 Ação do resveratrol na diferenciação de osteoblastos	20
1.1.9 Ação do resveratrol sobre rotas que ativam o NF-kB	22
1.2 Hipóteses e Objetivos	24
1.2.1 Hipóteses	24
1.2.2 Objetivo Geral	24
1.2.3 Objetivos Específicos	24
2 – Capítulo 2	25
2.1 Publicação	26
2.1.1 Patente internacional: Pharmaceutical product for modulating bone formation	26
3 – Capítulo 3	39
3.1 Materiais e Métodos	40
3.1.1 Modelo animal, manejo e cuidados	40
3.1.2 Técnica anestésica e medicação pós-operatória	41
3.1.3 Estudo histológico inicial dos efeitos do resveratrol na neoformação óssea em animais	41
3.1.4 Estudo para a determinação da quantidade de resveratrol na associação com biomateriais	41
3.1.4.1 Divisão dos grupos	42
3.1.4.2 Materiais utilizados	43
3.1.4.3 Protocolo cirúrgico experimental	45
3.1.4.4 Preparação histológica das amostras	46
3.1.4.5 Avaliação histológica das amostras	47
3.1.5 Estudo dos efeitos do resveratrol na atividade do NF-kB	49
3.1.5.1 Grupo de determinação da curva de ativação do NF-kB	49

3.1.5.2 Grupos controle e verificação da técnica	50
3.1.5.3 Grupos experimentais	51
3.1.5.4 Técnica cirúrgica	52
3.1.5.5 Processamento histológico	53
3.1.5.6 Imunohistoquímica	58
3.1.5.7 Análise estatística	60
3.1.6 Estudo para a avaliação em diferentes tempos da associação de biomateriais com resveratrol através da injeção de marcadores de fluorescência	61
3.1.6.1 Divisão dos grupos	61
3.1.6.2 Protocolo cirúrgico experimental	62
3.1.6.3 Processamento histológico	63
3.1.7.4 Histomorfometria	64
3.1.6.5 Análise quantitativa	64
4 – Capítulo 4	65
4.1 Resultados	66
4.1.1 Introdução ao capítulo dos resultados	66
4.1.2 Resultados do estudo para a determinação da concentração de resveratrol na associação com biomateriais	66
4.1.3 Resultados do estudo dos efeitos do resveratrol na regulação de NF-kB	77
4.1.5 Resultados do estudo para a avaliação em diferentes tempos da utilização de resveratrol para a neoformação óssea através da injeção de marcadores de fluorescência	96
5 – Capítulo 5	102
5.1 Discussão	103
5.1.1 Discussão do estudo inicial	104
5.1.2 Discussão dos grupos para a determinação da concentração de resveratrol associado ao material para enxerto	106
5.1.3 Discussão do efeito do resveratrol na regulação do NF-kB	108
5.1.4 Discussão dos resultados com a injeção de marcadores de crescimento ósseo em diferentes períodos	115
5.1.4 Considerações finais	116
6 - Conclusões	118
7 - Anexos	119
Referências Bibliográficas	121

Lista de Figuras

Figura 1 a – Organização lamelar do osso com aumento de 100 vezes	5
Figura 1 b – Organização lamelar do osso com aumento de 400 vezes	5
Figura 2 – Estruturas dos derivados de resveratrol	17
Figura 3 – Evolução do número de publicações sobre resveratrol ao longo dos anos	18
Figura 4 – Processos celulares ativados pela proteína sirtuína	20
Figura 5 – Aspecto dos leitos cirúrgicos preparados nas tíbias dos animais	43
Figura 6 – Imagem obtida em MEV do osso bovino inorgânico <i>Bonefill</i> com aumento de 50 vezes	44
Figura 7 – Aspecto do frasco onde foi feita a mistura e esterilização do material	44
Figura 8 – Esquema utilizado para a contagem de osteócitos por mm ²	49
Figura 9 – Esquema das posições e regiões determinadas para a avaliação do dano cirúrgico	53
Figura 10 – Imagem do programa de computador utilizado para a marcação e contagem das células imunomarcadas	60
Figura 11 a – Fotomicrografia do grupo Gexp 1 com aumento de 4 vezes	68
Figura 11 b - Fotomicrografia do grupo Gexp 1 com aumento de 10 vezes	68
Figura 12 a - Fotomicrografia do grupo Gexp 1 com aumento de 40 vezes	68
Figura 12 b - Fotomicrografia do grupo Gexp 1 com aumento de 10 vezes	68
Figura 12 c - Fotomicrografia do grupo Gexp 1 com aumento de 40 vezes	68
Figura 13 a - Fotomicrografia do grupo Gexp 2 com aumento de 4 vezes	70
Figura 13 b - Fotomicrografia do grupo Gexp 2 com aumento de 10 vezes	70
Figura 14 a - Fotomicrografia do grupo Gexp 2 com aumento de 4 vezes	70
Figura 14 b - Fotomicrografia do grupo Gexp 2 com aumento de 10 vezes	70
Figura 14 c - Fotomicrografia do grupo Gexp 2 com aumento de 40 vezes	70
Figura 15 a - Fotomicrografia do grupo Gexp 3 com aumento de 4 vezes	72
Figura 15 b - Fotomicrografia do grupo Gexp 3 com aumento de 10 vezes	72
Figura 16 a - Fotomicrografia do grupo Gexp 3 com aumento de 4 vezes	72
Figura 16 b - Fotomicrografia do grupo Gexp 3 com aumento de 10 vezes	72
Figura 16 c - Fotomicrografia do grupo Gexp 3 com aumento de 40 vezes	72
Figura 17 a – Aspecto da distribuição das fibras colágenas com	74

aumento de 40 vezes na coloração por <i>TM</i>	
Figura 17 b – Aspecto da distribuição das fibras colágenas com aumento de 100 vezes na coloração por <i>TM</i>	74
Figura 17 c – Aspecto da distribuição das fibras colágenas com aumento de 400 vezes na coloração por <i>TM</i>	74
Figura 18 a - Fotomicrografia do grupo Gexp 4 com aumento de 4 vezes	76
Figura 18 b - Fotomicrografia do grupo Gexp 4 com aumento de 10 vezes	76
Figura 19 a - Fotomicrografia do grupo Gexp 4 com aumento de 4 vezes	76
Figura 19 b - Fotomicrografia do grupo Gexp 4 com aumento de 10 vezes	76
Figura 19 c - Fotomicrografia do grupo Gexp 4 com aumento de 40 vezes	76
Figura 20 – Figura indicando imunorreatividade para o NF-kB no grupo controle não operado	78
Figura 21 – Imagem representado o grupo controle do processo	79
Figura 22 a – Imagem relacionado ao grupo controle positivo realizado em câncer de próstata	80
Figura 22 b - Imagem relacionado ao grupo controle positivo realizado em câncer de próstata com maior aumento	80
Figura 23 – Imagem representando o grupo curva de ativação 6h	83
Figura 24 – Imagem onde é possível notar a imunorreatividade na região periostal	83
Figura 25 – Lâmina contra-corada com hematoxilina de <i>Mayer</i>	84
Figura 26 – Imagem indicando uma possível organização da ativação do NF-kB	85
Figura 27 – Imagem formada tem semelhança com um triangulo com base voltada para a região periostal	85
Figura 28 a – Imagem do grupo controle 1 na região periostal	88
Figura 28 b - Imagem do grupo controle 1 na região média	88
Figura 28 c - Imagem do grupo controle 1 na região endostal	88
Figura 29 a - Imagem do grupo controle irrigado na região periostal	91
Figura 29 b - Imagem do grupo controle irrigado na região média	91
Figura 29 c - Imagem do grupo controle irrigado na região endostal	91
Figura 30 a - Imagem do grupo controle resveratrol na região periostal	94
Figura 30 b - Imagem do grupo controle resveratrol na região média	94
Figura 30 c - Imagem do grupo controle resveratrol na região endostal	94
Figura 31 a – Fotomicrografia do grupo GC1	97
Figura 31 b – Fotomicrografia do grupo GC1	97
Figura 32 a - Fotomicrografia do grupo GC2	99
Figura 32 b - Fotomicrografia do grupo GC2	99
Figura 33 a - Fotomicrografia do grupo GC3	101
Figura 33 b - Fotomicrografia do grupo GC3	101
Figura 34 – Radiografia demonstrando uma área enxertada com osso bovino inorgânico após 3 anos	106
Figura 35 - Radiografia demonstrando da perda óssea 30 dias após a colocação do implante	113

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Desidratação	46
Tabela 2 – Desidratação	55
Tabela 3 – Embebição	56
Tabela 4 – Desidratação e Diafanização	59
Tabela 5 – Sequência de injeção dos marcadores de fluorescência	62
Tabela 6 – Análise semi-quantitativa do Gexp 1(30 dias)	66
Tabela 7 – Análise semi-quantitativa do Gexp 1(60 dias)	67
Tabela 8 – Análise semi-quantitativa do Gexp 2(30 dias)	69
Tabela 9 – Análise semi-quantitativa do Gexp 2(60 dias)	69
Tabela 10 – Análise semi-quantitativa do Gexp 3(30 dias)	71
Tabela 11 – Análise semi-quantitativa do Gexp 3(60 dias)	71
Tabela 12 – Análise semi-quantitativa do Gexp 4(30 dias)	75
Tabela 13 – Análise semi-quantitativa do Gexp 4(60 dias)	75
Tabela 14 – Tabela das marcações para NF-kB do grupo Gcon 1	86
Tabela 15 – Tabela das marcações para NF-kB do grupo Gcon 2	89
Tabela 16 – Tabela das marcações para NF-kB do grupo Gres 3	92
Tabela 17 – Tabela das marcações para NF-kB entre os grupos experimentais	95

Lista de Gráficos

Gráfico 1	– Resultados da semi-quantificação entre todas as posições	81
Gráfico 2	– Resultados da semi-quantificação para a posição 0	81
Gráfico 3	– Resultados da semi-quantificação para a posição Joelho	82
Gráfico 4	– Resultados da semi-quantificação do grupo Gcon 1	87
Gráfico 5	– Resultados da semi-quantificação do grupo Gcon 2	90
Gráfico 6	– Resultados da semi-quantificação do grupo Gres 3	93
Gráfico 7	– Indica os resultados encontrados nas diversas regiões estudadas fazendo comparações entre os grupos experimentais	96

Lista de Abreviaturas e Siglas

AMPc	Adenosina monofosfato-cíclico
Amp1	Amostra piloto 1
Amp2	Amostra piloto 2
Amp3	Amostra piloto 3
BMP	Proteína morfogenética óssea
BMP-2	Proteína morfogenética óssea -2
BMP-4	Proteína morfogenética óssea -4
BSP-1	Sialoproteína óssea
cox-2	Ciclooxigenase
DAB	Diaminobenzidina
E2	Estradiol
ECM	Matriz Extracelular
ERK	Quinase regulada pela sinalização extracelular
Et	Etanol 70%
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
GC1	Grupo controle 1
GC2	Grupo controle 2
GccC	Grupo controle com cirurgia
Gcon1	Grupo controle 1
Gcon2	Grupo controle 2
GCp+	Grupo controle positiva
GE1	Grupo experimental 1
Gexp1	Grupo experimental 1
Gexp2	Grupo experimental 2
Gexp3	Grupo experimental 3
Gexp4	Grupo experimental 4
GR	Receptores de glicocorticóides
Gres3	Grupo resveratrol 3
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular -1
IGF-1	Fator de crescimento Insulina-dependente-1
IL-1	Interleucina-1
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
M-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófagos
MSC	Células mesenquimais indiferenciadas
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro
NF-kB	Fator Nuclear kappa B
OCN	Osteocalcina
OPN	Ostepontina – ou (BSP-1) – sialoproteína óssea-1
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PGI	Endoperóxido de prostaglandina – Prostaciclina
PPARy	Receptor para fator de proliferação ativado de peroxissomo

RANK	Receptor ativador do NF-kB
RANKL	Ligantes do receptor ativador do NF-kB
SEM	Microscopia eletrônica de varredura
Sir	Sirtuínas
SSRE	Elemento de resposta a estresse
TGF	Fator de crescimento de Transformação
TGF- β	Fator de crescimento de Transformação beta
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral -alfa
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular-1

Resumo

Esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do resveratrol na neoformação óssea em defeitos criados na tíbia de coelhos, tanto celular como molecularmente. Foram utilizados coelhos *New Zeland* de ambos os sexos, pesando, em média, 3500 g, em cada etapa desse estudo. Para a determinação da concentração de resveratrol adicionado ao peso total de osso bovino inorgânico, esse utilizado como veículo, foram separados 4 grupos: grupo experimental 1, onde foi adicionado resveratrol em 20% do peso do osso bovino; grupo experimental 2, onde foi adicionado resveratrol em 40% do peso do osso bovino; grupo experimental 3, onde foi adicionado resveratrol em 60% do peso do osso bovino; grupo experimental 4, onde foi adicionado resveratrol em 80% do peso do osso bovino. Para a avaliação do comportamento e atividade celular foram utilizados marcadores de crescimento ósseo em diferentes tempos (Alizarina – 14 e 21 dias; Calceína – 28 e 35 dias; Tetraciclina – 42 e 49 dias), foram criados 3 grupos: grupo controle 1, onde o defeito foi preenchido somente com o coágulo; grupo controle 2, onde o defeito foi preenchido somente com o osso bovino inorgânico; grupo experimental 1, onde os defeitos foram preenchidos pelo material preparado com 60% de resveratrol em relação ao peso de osso bovino inorgânico. Para o estudo molecular de verificação da possibilidade de modulação do estresse cirúrgico pelo resveratrol, foram elaborados grupos para a determinação da curva de ativação do NF-κB e para controle do processo utilizado e, grupos para o estudo da atividade do resveratrol nesse processo. Os resultados demonstraram que o resveratrol apresenta um potencial modulador para o processo de neoformação óssea, aumentando a resposta desse tecido. Entretanto, a quantidade adicionada a essa mistura demonstrou melhores resultados quando colocado em uma quantidade de 60% em relação ao material utilizado como veículo, nesse caso o osso bovino inorgânico. Diversos grupos foram propostos após a determinação do pico de ativação da NF-κB, tais como, o grupo irrigado e grupo resveratrol, sendo que no grupo irrigado observou-se uma redução da ativação do NF-κB na posição zero na região periosteal, porém, os resultados estatísticos não indicaram significância em relação ao controle (animais do grupo determinação da curva de ativação, nos quais o pico de ativação do NF-κB em cortical óssea foi atingido em 6h); no grupo resveratrol, observou-se uma redução da ativação do NF-κB na posição 0 e 1, com a queda de ativação sendo mais significativa na posição 0. Nesse trabalho, também foi observado que a imunorreatividade para o NF-κB não se restringiu à região lesada, mas se estendeu por toda a cortical óssea, aumentando na região do joelho. Conclui-se, então, nesse estudo: 1- que o resveratrol pode influenciar o processo de reparação óssea, aumentando significativamente a qualidade da resposta; 2- o resveratrol pode modular o NF-κB quando aplicado *in loco* nos processos ósseos; 3 – pelos resultados obtidos pode-se propor que o controle do trauma cirúrgico está diretamente relacionado com a qualidade e quantidade de resposta do tecido ósseo; 4 – a quantidade de resveratrol adicionada a um material osteocondutor deve ser equilibrada e quantificada para a obtenção de resultados adequados.

Palavras-chave: Biomateriais – Enxerto ósseo – Resveratrol – NF-κB

Abstract

This study aimed at evaluating the effect of resveratrol on bone neoformation in bone defects created in the tibias of rabbits, in both cellular and molecular levels. New Zealand rabbits of both sexes were used, weighing 3500g. For the determination of the resveratrol concentration added to the total weight of the inorganic bovine bone (used as the main vehicle of this study), 4 experimental groups were established. The percentages added to the total weight of the inorganic bovine bone of each experimental group were: experimental group 1 – 20%; experimental group 2 – 40%; experimental group 3 – 60%; experimental group 4 – 80%. For the evaluation of behavior and cellular activity, bone growth marks were used in three control groups at different periods (Alizarin – 14 and 21 days; Calcein – 28 and 35 days; Tetracycline – 42 and 49 days). In control group 1, the defect was only filled with clot; in control group 2, the defect was only filled with the inorganic bovine bone; and in control group 3, the defects were filled by the material prepared with 60% of resveratrol in relation to the weight of the inorganic bone (experimental group 3). For the molecular study of verification of possible surgical stress modulation by the resveratrol, groups were prepared to determine the NF-kB activation curve and control the process used, and also to study the resveratrol activity in this process. The results demonstrated that resveratrol acted as a potential modulator of bone formation, increasing the response of this tissue. However, the concentration mixture demonstrated better results when used in quantities of 60% in relation to the material used as vehicle, which in this case was the inorganic bovine bone. Several groups were proposed after the determination of the peak activation of NF-kB such as, the irrigated group and the resveratrol group. It was observed that in the irrigated group, a reduction of the activation of the NF-kB in the zero position in the periosteal region, even though there was no significant statistical results in relation to the control (animals of the activation curve determination group, in which the peak of NF-kB activation achieved the cortical bone in 6h). In the resveratrol group, the reduction of the activation of the NF-kB was observed in the zero and one position, with the activation fall being more significant at position zero. In this study, it was also observed that the immunoreactivity for NF-kB was not restricted to the injured region, but it spread throughout the bone cortex, increasing at the knee region. We concluded in this study: 1 – that the resveratrol may influence the process of bone repairing, significantly increasing the quality of response; 2 – resveratrol may modulate NF-kB when applied *in situ* in bone processes; 3 – with the obtained results, it may be proposed that the surgical trauma control is directly related to the quality and quantity of the bone tissue response; 4- the amount of resveratrol added to an osteoconductive material must be balanced and measured to obtain adequate results.

Key Words: Biomaterials – Bone graft – Resveratrol - NF-kB

Capítulo 1

1.1 Introdução

A reparação dos defeitos decorrentes de perdas ósseas devido a sequelas de traumas, infecções, malformações congênitas, ressecções tumorais e alongamento ósseo de grande porte ainda constituem um problema de difícil solução na prática ortopédica e traumatológica.

A busca de um substituto ósseo confiável e previsível para a realização de enxertos ósseos tem recebido grande atenção pela comunidade científica internacional nos últimos anos. Até o momento, os melhores resultados nessa área têm sido obtidos com a utilização de enxertos autógenos (MICH, 2000) ou, com a incorporação de fatores osteoindutores, tais como as BMPs (*Bone Morphogenetic Proteins*), aos materiais e técnicas aplicadas nos tratamentos (URIST *et al.*, 1985a; ZÉTOLA *et al.*, 2010). Entretanto, o uso de enxertos autógenos apresenta o inconveniente da necessidade de dois leitos cirúrgicos, o que, além de acentuar a agressão cirúrgica ao paciente, muitas vezes aumenta os custos do procedimento (ZÁRATE-KALFÓPULOS, REYES-SÁNCHEZ, 2006).

Ultimamente, as pesquisas têm se voltado para o entendimento dos processos de incorporação do enxerto ao tecido adjacente. Mais recentemente, passou-se a dar maior atenção aos mecanismos moleculares que integram a fisiologia desse processo (ZÁRATE-KALFÓPULOS, REYES-SÁNCHEZ, 2006).

Muitas vezes, o isolamento do tecido ósseo permite avaliar as particularidades existentes; porém, é imprescindível a compreensão de sua extensão global de funcionamento. Essa concepção, que se interpõem e se contrapõem em um determinado mecanismo ou processo, pode levar a seu controle mais adequado, direcionando-o para uma condição mais desejável.

Nesse contexto, as técnicas de engenharia tecidual e terapia gênica têm o objetivo de criar um melhor substituto para enxerto ósseo, combinando substâncias com as propriedades de osteocondução, do osteogênese e de osteoindução (ZÁRATE-KALFÓPULOS, REYES-SÁNCHEZ, 2006).

Assim, após a descoberta de uma família de enzimas, as sirtuínas, e da determinação de algumas de suas atuações em vários processos fisiológicos de diferentes órgãos e células, surgiu a possibilidade de intervir nos eventos relacionados à diferenciação celular, com a utilização de uma substância de origem não autógena, o resveratrol, que modula essa enzima (MIZUTANI *et al.*, 1998; BÄCKESJO *et al.*, 2006; DAI *et al.*, 2007).

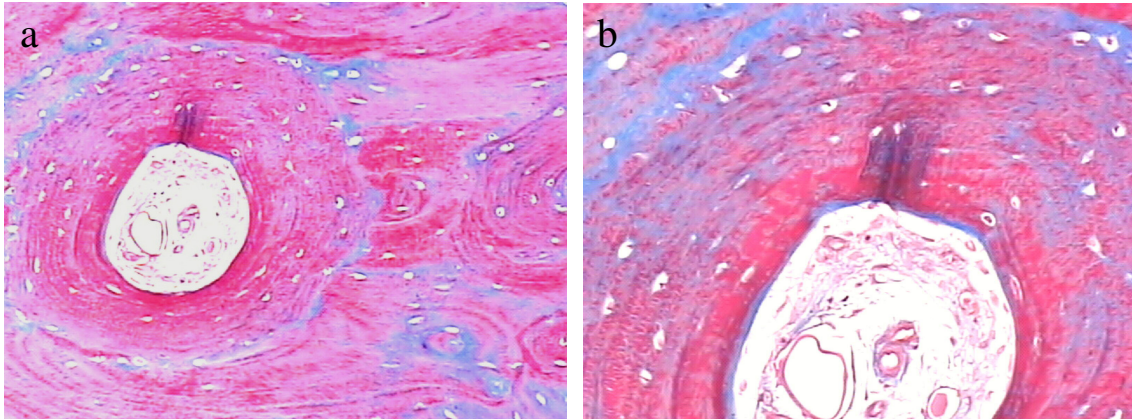
Entende-se por modulador de sirtuínas, os compostos que regulam positivamente (ativando ou estimulando), negativamente (inibindo ou suprimindo), as mudanças nas propriedades funcionais ou atividades biológicas dessas proteínas.

O osso exibe um potencial inigualável para regeneração, capaz de reparar fraturas ou defeitos locais com uma organização estrutural altamente semelhante ao seu estado normal, sem deixar cicatriz. Esse mecanismo reparador assemelha-se à osteogênese embrionária e do crescimento (BUSER *et al.*, 1996), sendo por isso, necessário, conhecer os fatores básicos de estrutura, metabolismo e neoformação do osso, como base biológica para o conhecimento do padrão de regeneração.

Com a idéia de estudar e avaliar o comportamento dessa molécula quando aplicado *in situ*, foi realizado anteriormente à defesa do projeto de doutoramento, o qual apresentou excelentes resultados do ponto de vista biológico.

1.1.1 Estrutura celular e molecular do tecido ósseo

O tecido ósseo tem uma organização estrutural e disposição de seus constituintes de forma que possa atender suas funções o mais adequadamente possível. A maior parte do osso compacto é constituída de muitos canais ou sistemas osteônicos onde, frequentemente, o canal osteônico se bifurca ao longo de seu comprimento, formando os canais interosteônicos. Uma osteona se liga a outra por meio de uma fina linha cementante, constituída, principalmente, de substância fundamental calcificada, com uma pequena quantidade de fibras colágenas conhecidas por lamelas intersticiais (JUNQUEIRA et al, 1984). Os feixes de fibras colágenas são paralelos entre si; porém, dispostos quase que perpendicularmente às lamelas adjacentes. Este arranjo se torna possível porque as fibras colágenas seguem um arranjo helicoidal ao redor dos canais osteônicos; porém, este arranjo não é congruente com as lamelas vizinhas, proporcionando assim um embricamento mecânico entre os sistemas lamelares, como descrevem Gartner et al. (1999) e como demonstrado nas figuras 1 a e b (GEHRKE et al, 2009).



Figuras 1 a e b: Imagens histológicas demonstrando a organização das lamelas do tecido ósseo, onde pode-se verificar no interior a presença dos vasos sanguíneos que nutrem o sistema FONTE: GEHRKE et al, 2009.

Os canais osteônicos são revestidos por uma camada de osteoblastos e células osteoprogenitoras, abrigando também fibras nervosas e vasos sanguíneos. O diâmetro destes canais varia de 20 a 100 μm . À medida que as lamelas são formadas, o diâmetro dos canais se reduz e o sistema de osteonas aumenta (GARTNER et al., 1999). Em decorrência deste arranjo estrutural no osso cortical, ocorre uma deficiência de nutrição dos osteócitos. A nutrição que deriva dos canais maiores, osteônicos ou interosteônicos, deve necessariamente atingir as lacunas através dos canalículos e, estes, atingem outras lacunas, sucessivamente, até que todos os nutrientes perfundam até os osteócitos mais periféricos. Esta perfusão de nutrientes se faz através da matriz extracelular, contida em uma estreita faixa, entre a matriz calcificada e o citoesqueleto dos osteócitos. A transmissão de sinais se faz por meio de junções comunicantes ou “*gaps*”, contidos nas extremidades das extensões citoplasmáticas, entre os canalículos contíguos (GARTNER et al., 1999). Este arranjo estrutural sugere uma intensa comunicação ente os osteócitos contidos nas lacunas (TURNER et al., 1994).

Ao nível molecular, o osso é um material composto. Ele é uma matriz de colágeno entrelaçado, que apresenta um arranjo tridimensional múltiplo de fibras matrizes. A orientação das fibras colágenas determina a mineralização. A parte orgânica ocupa 35% da matriz e é primariamente formada por fibras osteocolágenas, que são semelhantes às fibras colágenas do tecido conjuntivo. Essas fibras são unidas por uma substância parecida com um cimento, constituído principalmente de glucoaminoglicose (proteína – polissacarídea). A matriz orgânica do osso inclui diferentes tipos de macromoléculas, principalmente colágeno tipo I (90% do peso), mas também fosfoproteínas tais como sialoproteínas e glicoproteínas (osteonectina e proteoglicanos) (FRANZEN & HEINEGARD, 1985).

1.1.2 Metabolismo ósseo

Quando os osteoblastos depositam matriz óssea, esses elementos também excretam BMP na matriz mineral. Essa proteína, insolúvel em ácido, mantém-se até que seja liberada por reabsorção osteoclástica. Esse ácido insolúvel é um mecanismo evolutivo, porque o pH 1 gerado pelos osteoclastos é capaz de dissolver o osso mineral sem afetar as BMPs (URIST *et al.*, 1985b). A liberação de BMPs é, então, levada às superfícies das células mesenquimais indiferenciadas, onde é originada uma membrana protéica ativada por alta energia proveniente do fosfato. Essa membrana afeta a sequência genética do núcleo, causando diferenciação osteoblástica e estímulo na produção de novo osso (CHEN *et al.*, 2004).

O processo de renovação do osso lamelar trabecular ou esponjoso acontece através das cavidades reabsorção criadas pelos osteoclastos, que são em forma de concha, chamadas de cone de desgaste, a qual é preenchida por matriz óssea produzida pelos osteoblastos. Essa renovação óssea (ativação, reabsorção, formação) é perene e constante, porém com diferente velocidade nas distintas fases da vida. No osso compacto adulto, a proporção de renovação é de cerca de 5% ao ano, enquanto no osso esponjoso pode atingir 15% (TEN CATE, 2000).

1.1.3 Neoformação óssea (Modelagem e remodelagem óssea)

Modelagem óssea é definida como qualquer mudança na forma, no tamanho ou no contorno do osso. Ela pode ser um processo anabólico com deposição de osso sobre a superfície ou, pode ser um processo catabólico, com reabsorção da superfície.

Quando ocorre algum tipo de trauma no tecido ósseo, inicia-se um processo de reparo ou renovação óssea (remodelagem óssea). Esse trauma pode ser provocado por eventos de naturezas diversas, como a própria abordagem cirúrgica que, por vezes, requer osteotomias para tratamento de irregularidades da arquitetura óssea, por intervenções com a finalidade de se realizar implantes endósseos ou, fenômenos físicos. Portanto, para alcançar a compreensão dos fenômenos que envolvem a terapia de regeneração e crescimento ósseo, bem como das vantagens e desvantagens dos diferentes materiais disponíveis para

enxertos, é necessário o conhecimento das capacidades de regeneração, reparação e remodelação do tecido ósseo (ELLIS III, 1996).

Atualmente, as pesquisas indicam que os osteócitos são verdadeiros mecanosensores que trabalham em conjunto, influenciando na remodelação do tecido ósseo, transformando este tecido em um verdadeiro sincício, onde a perfusão dos fluidos dentro dos sistemas de canais pode influenciar na dinâmica da remodelação e neoformação do tecido ósseo (MARK et al., 2000), indicando que os osteócitos têm uma participação efetiva na remodelação óssea (LANYON, 1993). Embora a remodelação e neoformação óssea estejam ligadas diretamente aos osteoblastos e osteoclastos, a biologia molecular demonstrou a ocorrência de inúmeras alterações na atividade e em níveis de expressão de alguns genes dentro dos osteócitos durante o processo de remodelação e reparação tecidual (NOMURA et al., 2000).

1.1.3.1 Mecanismo celular e molecular da neoformação óssea

O osso é produzido pelos osteoblastos, os quais são caracterizados por sua inabilidade em se locomover ou se dividir, sendo, portanto, incapazes de proliferar para dentro dos defeitos. Assim, a cicatrização do defeito ósseo depende da presença de células precursoras osteogênicas (mesenquimais) ao redor do osso ou tecido mole, e da habilidade dessas células para deslocarem-se para o interior do defeito e se diferenciarem em osteoblastos (LINDHE *et al.*, 2003).

Após a invasão, a regeneração óssea é induzida pela influência do osso produzido sistêmica e localmente, e é dependente de fatores como: fatores de

crescimento, hormônios e vitaminas (TRIFFITT, 1987). Salienta-se que, nesse processo, o ambiente local apropriado para essa proliferação e diferenciação celular deverá existir (LANE & SARDHU, 1987).

A osteoindução envolve a formação de um novo osso pela diferenciação local das células mesenquimais, indiferenciadas em células formadoras de osso, sob a influência de um ou mais agentes indutores. As proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) são exemplos desses agentes (BOWERS *et al.*, 1989a e b; SINGURDSSON *et al.*, 1994).

São três as condições básicas como pré-requisitos para a neoformação óssea (LINDHE, 2003):

- 1) Uma fonte de células formadoras de osso ou células com a capacidade de se diferenciarem em células formadoras de osso;
- 2) A presença de estímulos osteoindutores para iniciar a diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos;
- 3) A presença de um meio osteocondutor formando uma matriz sobre a qual o tecido invasor possa proliferar e as células osteoprogenitoras estimuladas possam se diferenciar em osteoblastos e formarem osso.

Atualmente, as pesquisas indicam que os osteócitos são verdadeiros mecanossensores que trabalhando em conjunto, influenciando a remodelação do tecido ósseo e transformando esse tecido em um verdadeiro sincício, no qual a perfusão dos fluidos dentro dos sistemas de canais pode influenciar a dinâmica da remodelação e neoformação do tecido ósseo (MARK *et al.*, 2000). Estudos também mostram que os osteócitos têm uma participação efetiva na remodelação óssea (LANYON, 1993). Embora a remodelação e neoformação óssea estejam

ligadas diretamente aos osteoblastos e osteoclastos, inúmeras alterações na atividade e níveis de expressão de alguns genes dentro dos osteócitos, durante o processo de remodelação e reparação tecidual (NOMURA *et al.*, 2000).

1.1.4 Conceitos e classificação dos materiais e mecanismos para a neoformação óssea

Existem dois métodos básicos para se realizar a reconstrução óssea: transplante ou implante. O transplante envolve a transferência cirúrgica de tecidos vivos ou sistemas de um organismo para outro. As células transplantadas devem sobreviver ao procedimento de transplante e permanecer com um grau razoável de função, para que o procedimento seja considerado como sucesso clínico e imunológico. No caso do implante, ao contrário, o que ocorre é a transferência cirúrgica de tecidos não vitais, podendo o sucesso clínico ser alcançado mesmo que as células do enxerto não sobrevivam ao procedimento cirúrgico. Quando se faz referência aos enxertos aloplásticos, isto é, aos materiais confeccionados com substâncias inorgânicas, eles também são considerados como material implantado (ELLIS III, 1992).

Os enxertos ósseos são classificados em grupos, de acordo com sua origem e seu conseqüente potencial de indução de respostas imunológicas. Variando a origem e a forma de preparo do enxerto, serão diferentes as respostas imunológicas geradas e, serão igualmente diferentes, as qualidades e as indicações do material (ELLIS III, 1992).

Quanto aos mecanismos, a neoformação têm-se dois tipos: neoformação por osteoindução ou por osteocondução.

O primeiro mecanismo converte-se num processo dinâmico de formação óssea devido a substâncias que são chamadas de proteínas morfogenéticas de osso ou BMP. Essas proteínas consistem de uma matriz colágena de osso e são ativadas quando são removidos minerais do osso. A BMP inicia a osteoindução, que começa com a quimiotaxia de células mesenquimais dentro de um enxerto desmineralizado. Elas então se diferenciam em células osteoprogenitoras e produzem osso. O osso desmineralizado (DFDBA) e a BMP concentrada são as duas únicas substâncias osteoindutivas (BUSER et al., 1996).

O segundo mecanismo é possível devido ao tecido ósseo ter a capacidade intrínseca de regeneração, seja pelo processo normal de remodelagem, seja pela recuperação após o ferimento. Quando o osso cresce por aposição a partir de, ou sobre outro osso já existente, o processo é denominado osteocondução. Estão aí incluídos os enxertos ósseos, cuja finalidade é restaurar a forma original danificada devido a lesões como cistos, neoplasmas, traumas e más formações.

Todos os enxertos ósseos mineralizados autogênicos ou alogênicos passarão pelo processo de osteocondução, agindo como modelos ou arcabouços para a formação de um novo osso (ELLIS III, 1992; GARBIN & GARBIN, 1994).

1.1.5 Eventos moleculares da diferenciação celular durante a neoformação óssea e o mecanismo de estresse ósseo

O osso é uma das fontes mais ricas em fatores de crescimento. Entre os fatores de crescimento detectados no osso, alguns são produzidos por células ósseas: fator de crescimento semelhante à insulina (IGF, do inglês *Insulin Growth Factor*), fator de crescimento de transformação (TGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF); enquanto outros são sintetizados por tecido ósseo adjacentes: interleucina- β (IL- β) e fator de necrose tumoral α (TNF α). Além disso, alguns fatores de indução óssea são de maior interesse para a regeneração óssea, tais como a osteogenina (LACROIX, 1947) e as proteínas morfogenéticas (BMPs) (URIST *et al.*, 1985).

Entre os fatores que controlam a proliferação e a diferenciação dos condrócitos para osteoblastos, a expressão de uma BMP ou proteína morfogenética óssea pode ter um papel central. O aumento dos níveis de expressão das BMPs-2 e 4 foi identificado em células osteogênicas e condrogênicas em regiões onde foram realizados defeitos ósseos (SATO *et al.*, 1999). A abundante deposição de matriz óssea na região de distração osteogênica pode estar relacionada ao aumento da expressão de BMPs, especialmente a BMP-2 e a BMP-4, de acordo com Sato *et al* (1999).

Para que ocorra um adequado processo de reparação óssea é necessário que esse seja bem equilibrado e equacionado, de forma que as mudanças fisiológicas e as comunicações inter e intracelulares possam estar diretamente interligadas para a perfeita formação de um novo tecido. Para tanto, a manutenção

da integridade celular, sua função e uma melhor intercomunicação são de fundamental importância no processo de reparo, direcionado para a obtenção de um tecido ósseo organizado.

As mudanças na expressão e atividade gênica, decorrentes de um estímulo externo produzem, internamente, nas células, uma reação em cadeia com a finalidade de se adaptar a esse novo ambiente. Essa adaptação a uma nova situação é transmitida a outras células de sinais que alcançam o citoesqueleto, causando um influxo de cálcio para dentro dessas células (HUNG *et al.*, 1996). Subsequente a essa entrada de cálcio, ocorre uma mudança quase imediata na expressão dos níveis dos genes c-fos e cox-2 (LEAN *et al.*, 1995; FORWOOD, 1996), o que promoverá o aumento dos níveis de AMPc (Adenosina Monofosfato cíclica), da produção de óxido nítrico (NO) e prostaglandina (PGI₂) (PITSILLIDES *et al.*; 1995; RAWLINSON *et al.*; 1991). Em decorrência desses eventos, há um aumento da expressão de IGF-1. Como outras citocinas têm como caráter principal ser uma substância pleiotrópica, ou seja, tem efeitos diversos em células distintas. O IGF-1 estimula a síntese de colágeno tipo I, osteopontina (ONP) e osteocalcina (OCN) nas células osteogênicas, o que resulta um incremento da formação de osso *in vivo* (NOMURA *et al.*, 2000).

A osteopontina (ONP), também chamada de BSP-1 (do inglês, *bone sialoprotein-1*), Eta -1 e 2ar, é o maior componente não fosforilado e não colágeno da matriz óssea, tendo uma importante função biológica nas ligações do cálcio aos seus domínios e na modificação da sequência de aminoácidos, Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (GRGDS), para promover a ligação celular via integrinas (OLDBERG *et al.*, 1996). Especula-se que estas integrinas são orquestradas por um único gene,

chamado elemento responsável pela divisão de estresse (SSRE) (HSIEH *et al.*, 1991).

Entretanto, a mecanotransdução de uma fratura e conseqüente formação de um calo ósseo ainda não foi bem esclarecida. Porém, artigos que descrevem o alongamento dos membros através de procedimentos de distração osteogênica (YASUI *et al.* 1997; GARDNER *et al.*, 2004), fornecem algumas evidências das alterações moleculares e fisiológicas sofridas pelo tecido ósseo com esse tipo de reparo. Essas pesquisas descrevem a formação de uma camada cartilaginosa externa ao calo ósseo (ossificação endocondral), enquanto que na região endostal nota-se a ossificação endomembranosa. Somando-se a isso, a ossificação foi observada nestas regiões de distração osteogênica, com a formação direta do tecido ósseo iniciado por tecido cartilaginoso (YASUI *et al.*, 1997). Esse tipo de ossificação foi denominada de transcondroide (ROACH, 1992), raramente vista em uma ossificação fisiológica. A análise molecular e histológica desse tipo de ossificação evidenciou alterações na expressão no RNAm das células cartilaginosas do colágeno tipo II, durante os estágios iniciais da osteogênese.

Posteriormente, notou-se a redução da expressão do colágeno tipo II no RNAm dos condrócitos, concomitante a um aumento na expressão do colágeno tipo I (YASUI *et al.*, 1997). O interessante nesse experimento foi a identificação da expressão simultânea no RNAm dos condrócitos, da osteopontina (ONP) e da fosfatase alcalina e osteocalcina (SATO *et al.*, 1998). Os resultados sugerem que a diferenciação de condrócitos hipertróficos foi interrompida ou bloqueada, indicando que estas células cartilaginosas podem se transdiferenciar em células da linhagem osteoblástica.

Em estudos dos eventos moleculares relacionados aos mecanismos de adaptação e estresse celular, onde se destaca um fator de transcrição, o fator nuclear kappa-B (NF-kB), que é considerado um sensor de estresse celular (HADDAD, 2002), descreve-se que sua ativação induz a produção de citocinas pró-inflamatórias e a morte programada (apoptose) ou, ainda, uma adaptação celular (LI & STARK, 2002; DOLCET *et al.*, 2005; MOYNAGH, 2005; YAMAMOTO & GAYNOR, 2004; AGGARWAL, 2004; PERKINS, 2004; RAVI & BEDI, 2004). Esse fator transcricional também já foi descrito como um dos componentes presentes na osteoporose (AHN & AGGARWALL, 2005).

Os eventos moleculares associados ao reparo de uma fratura e subsequente formação do calo ósseo estão diretamente ligados ao processo inflamatório.

1.1.6 O NF-kB e o estresse oxidativo

O NF-kB não é encontrado, porém não ativado constitutivamente ativo em células, exceto em linfócitos T proliferantes, células β , monócitos e astrócitos (AGGARWAL, 2004). O NF-kB está relacionado com muitas neoplasias humanas, por regular também a expressão de várias moléculas envolvidas em processos que desempenham um papel chave no desenvolvimento e progressão do câncer, controlando o ciclo celular, proliferação, adesão, migração, angiogênese, apoptose e metástase (DOLCET *et al.*, 2005; KUMAR *et al.*, 2004; AGGARWAL, 2004; PERKINS, 2004).

A ativação constitutiva ou anormal de NF-kB tem sido associada a muitas neoplasias malignas humanas, incluindo linfomas de células T, carcinomas de

mama, carcinomas de células pequenas do pulmão, câncer da tireóide, mieloma múltiplo, melanoma, carcinomas de cólon, próstata e renal (DOLCET et al., 2005; KUMAR et al., 2004; AGGARWAL, 2004). A supressão da atividade do NF-kB nessas neoplasias inibe a proliferação das células, promove a parada do ciclo celular e permite a apoptose, indicando um papel importante para o NF-kB na proliferação celular neoplásica e sobrevida destas células (AGGARWAL, 2004).

O NF-kB pode regular a expressão de proteínas que modulam as vias de apoptose (MOYNAGH, 2005; SCHUCHMANN e GALLE; 2002).

Pelo conhecimento atual, tudo indica que o NF-kB é ativado conforme o estado redox intracelular. Este estado é sensível a variações externas, principalmente ao estresse celular provocado pelo processo inflamatório, devido, sobretudo, à resposta a citocinas que a inflamação provoca no tecido e, principalmente, no interior das células (ANDERSON et al., 1994; MENG et al., 2005).

O balanço entre oxidantes e antioxidantes está envolvido na saúde e longevidade do indivíduo e, ao contrário, a ruptura deste balanço, pode provocar desordens funcionais e patologias. O estresse oxidativo pode desempenhar um papel muito importante na iniciação e propagação de muitas patologias, doenças neuro-degenerativas como Parkinson e Alzheimer, doenças cardiovasculares e auto-imunes e também nas injúrias de isquemia e reperfusão. Conforme demonstrado na literatura, o NF-kB pode ser inibido *in vivo* por agentes que modificam os grupos sulfidrilas livres da glutathione e da tioredoxina (HADDAD et al., 2000; RAHMAN, 2000; HIROTA et al., 2000).

1.1.7 Bioatividade do resveratrol

O resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno; figura 2) foi isolado, pela primeira vez, das raízes do *Veratrum grandiflorum*, em 1940, e, mais tarde, em 1963, das raízes do *Polygonum cuspidatum*, planta medicinal utilizada tradicionalmente na China e no Japão para o tratamento de dermatites, gonorréia, pé de atleta e hiperlipemia (AGGARWALL, *et al* 2006).

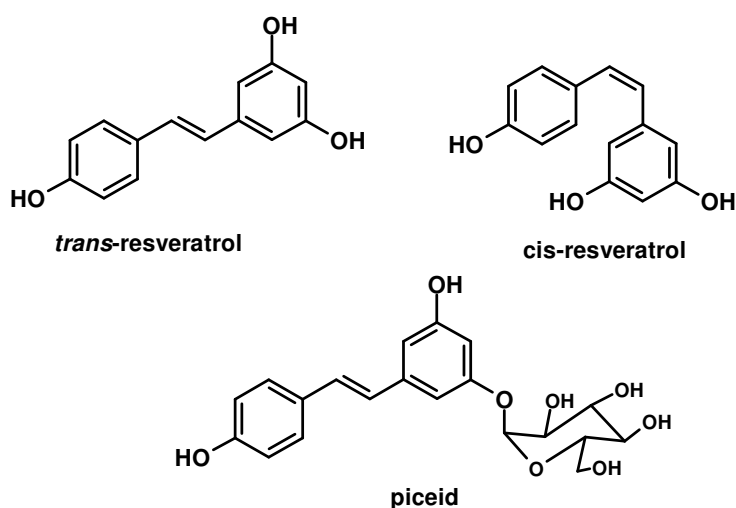


Figura 2: Estruturas dos derivados de resveratrol.
FONTE: AGGARWALL, *et al* 2006

Nos últimos anos, o interesse pela bioatividade da molécula de resveratrol vem crescendo vertiginosamente. Nos bancos de dados do *Chemical Abstracts* e do *PubMed*, estão registradas 3328 entradas (artigos, patentes, resumos) sobre esse produto, das quais 347 em 58 anos e o restante, 2981 entradas, nos últimos 9 anos (figura 3). Nesses estudos, o que particularmente despertou a atenção da comunidade científica foi a pesquisa de Jang *et al.* (1997), na qual o resveratrol

inibiu eventos celulares associados à iniciação, promoção e progressão tumoral. Desde então, foi sendo determinado o amplo espectro de ação dessa molécula, como antioxidante, antiinflamatória, antiviral, cardioprotetora, neuroprotetora, quimiopreventiva de câncer, além de atuar na proteção contra infecções e isquemia, reduzir a obesidade e prevenir o envelhecimento, sendo considerada uma supermolécula (BAUR et al, 2006).

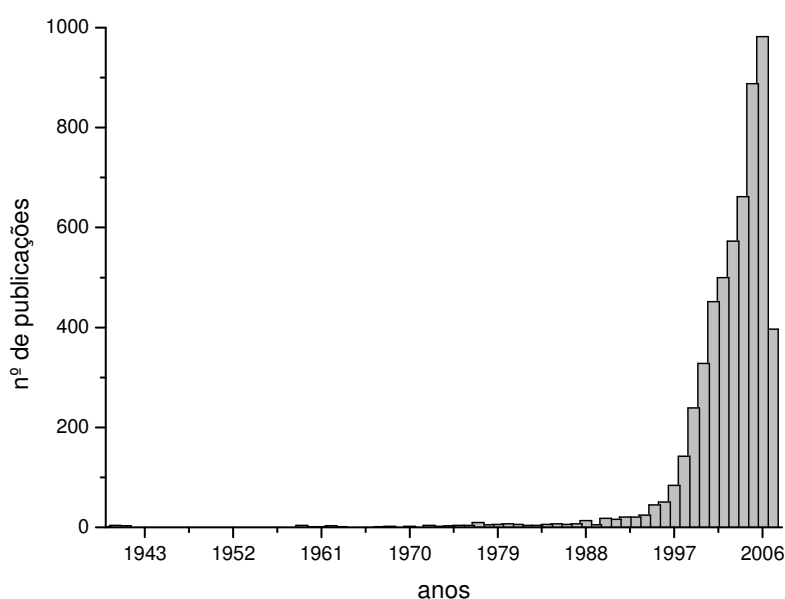


Figura 3: Evolução do número de publicações sobre resveratrol ao longo dos anos.
FONTE: BAUR et al, 2006

A explicação para essa vasta atividade biológica é que o trans-resveratrol age na expressão ou na atividade de uma família de proteínas chamada sirtuínas (SIRT). Essas proteínas receberam uma considerável atenção por sua influência na fisiologia dos mamíferos e estão ligadas a novos tratamentos para doenças associadas ao envelhecimento e, talvez, ao aumento da longevidade humana. A

família das proteínas sirtuínas (SIRT1-7) atua em vários processos celulares (figura 4). Em experimentos em diferentes linhagens de células humanas, o resveratrol modulou uma variedade desses processos através da interação da SIRT1, incluindo neuroproteção, supressão de tumor, diferenciação e inflamação (MICHAN & SINCLAIR, 2007). Dois estudos *in vivo* mostraram que o resveratrol evita doenças relacionadas com a obesidade e aumenta a performance muscular. Ratos tratados com uma dieta altamente calórica e com resveratrol tiveram a mesma respostas de ratos com dieta padrão e sem resveratrol. Os ratos tratados com essa molécula aumentaram as mitocôndrias, diminuíram a glicose e a insulina no sangue (BAUR, *et al* 2006). Outra pesquisa revelou que ratos tratados com altas doses de resveratrol (400 mg/kg) aumentaram a resistência à fadiga muscular, diminuíram a glicose e a insulina no sangue e mostraram maior resistência ao frio (LAGOUGE, *et al.*, 2006). Esses benefícios ocorreram graças ao aumento da atividade das proteínas SIRT1 e PGC1, esta última está envolvida na regulação do metabolismo e no processamento de energia dentro das células.

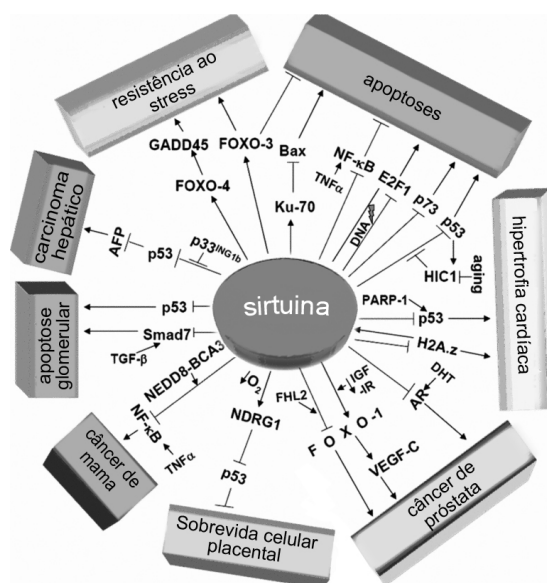


Figura 4: Processos celulares ativados pela proteína sirtuina (adaptado de MICHAN & SINCLAIR, 2007).

1.1.8 Ação do resveratrol na diferenciação de osteoblastos

Várias substâncias vêm sendo testadas no sentido de promover a diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos durante a neoformação de tecido ósseo para o reparo de defeitos e/ou acelerar esses eventos.

Qu *et al.* (1988) estudaram o efeito do 17β-Estradiol (E2) sobre células com potencial osteoblástico usando culturas de células da medula óssea de ratos, demonstrando que o E2 estimula sequencialmente a diferenciação de osteoblastos e aumenta a deposição e mineralização da matriz óssea.

Kassem *et al.* (2000) testaram o papel do TGF-β em culturas de osteoblastos humanos, modulando a diferenciação pelo calcitrol. O estudo revelou que o calcitrol é um importante regulador dessa atividade.

A genisteína, um fitoestrógeno, foi testado em culturas de células mesenquimais indiferenciadas de ratos, demonstrando ativar a proliferação e diferenciação de osteoblastos, através de uma atividade estrogênica (PAN *et al.*, 2005).

Nesse mesmo sentido, estudos recentes têm demonstrado que o resveratrol também estimula a proliferação e diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos *in vitro* (MIZUTANI *et al.*, 1998).

As células mesenquimais indiferenciadas (do inglês *Mesenchymal Stem Cells* -MSCs) podem se diferenciar em osteoblastos, adipócitos, condrócitos e mioblastos. Sugere-se que há uma relação recíproca entre a diferenciação das MSCs em osteoblastos e adipócitos. O receptor gama ativador da proliferação de peroxissomas 2 (PPAR2) é um elemento chave para a diferenciação em adipócitos. O tratamento com o resveratrol, bem como, com a isonicotinamida, ambos ativadores da sirtuína, bloqueou o desenvolvimento de adipócitos e aumentou a expressão de marcadores da expressão de osteoblastos. A nicotinamida, que inibe a sirtuína, aumenta não só o número de adipócitos, como também a expressão de marcadores de adipócitos. Além disso, a ativação da sirtuína preveniu o aumento de adipócitos causa a pela troglitazona, um agonista do PPAR γ . Por fim, ativação da sirtuína nas células estromais da medula óssea de ratos expressou com maior intensidade os marcadores de osteoblastos e também o processo de mineralização (BÄCKESJO *et al.*, 2006).

Dal *et al.* (2007) descreveram que o resveratrol na concentração de $10^{-6}M$ induziu uma rápida ativação das proteínas ERK1/2 e MAPK p38. Os dados obtidos sugerem que o resveratrol estimula a proliferação de MSCs e a

diferenciação osteoblástica através de um mecanismo relacionado à ativação do receptor (ER), acoplado à ativação de ERK1/2. Na conclusão, os autores relataram ser o primeiro estudo a demonstrar que o resveratrol estimula diretamente a proliferação celular, diferenciação osteoblástica e a expressão dos genes osteogênicos, através dos mecanismos que envolvem o receptor de estrogênio e MAPKs em culturas de MSCs. A ativação dessas vias pode mediar o efeito anabólico do resveratrol sobre células ósseas.

1.1.9 Ação do resveratrol sobre rotas que ativam o NF-κB

O fator nuclear κB (NF-κB) foi identificado por David Baltimore em 1986 como um fator nuclear que liga o promotor da cadeia kappa às imunoglobulinas em células B (AGGARWAL et al, 2004). Desde então, tem sido demonstrado que o NF-κB está presente no citoplasma de todos os tipos de células em um estado inativo. Inúmeras pesquisas nas últimas duas décadas têm demonstrado que um grande número de estímulos podem ativar o NF-κB. A diversidade de estímulos que podem ativar o NF-κB sugere que o mesmo é um sensor de estresse. Muitos genes inflamatórios relevantes para a patogênese da aterosclerose são regulados pelo NF-κB. Essa pequena revisão demonstra que o NF-κB é um importante fator de transcrição que é ativado por uma grande variedade de estímulos e controla a expressão de um grande número de genes, mediando a patogênese de várias doenças, e pode ser suprimido por numerosos agentes. No entanto, a ativação do NF-κB é necessária para o bom funcionamento do sistema imunológico. A proliferação de células T e B, ativação de macrófagos, proliferação e

sobrevivência das células dendríticas e ativação de células T são dependentes da ativação do NF-kB (AHN & AGGARWAL, 2005).

Evidências recentes indicam que o NF-kB1 é mediador da resposta inflamatória e que o NF-kB2 é mediador da resposta imune, sugerindo que a supressão do NF-kB1, que está presente em 98% das doenças pró-inflamatórias, controlando a inflamação, pode ter menos efeitos sobre o sistema imunológico, sendo que isso precisa ser melhor determinado (SHISHODIA et al, 2005).

Ahmad et al (2004) relataram que o *resveratrol* pode ser antiinflamatório, anti-oncogênico, antioxidante, e com propriedades imuno-moduladoras e, estudos recentes *in vitro* tem demonstrado que o *resveratrol* pode suprimir a ativação do NF-kB.

Meng et al. (2005) estudaram o efeito do *resveratrol* sobre a ativação do NF-kB e fatores inflamatórios em ratos com pancreatite severa aguda induzida. Os resultados obtidos demonstraram que a ativação do NF-kB está presente na resposta inflamatória da pancreatite aguda em ratos e que o *resveratrol* pode efetivamente inibir a expressão e ativação do NF-kB, atenuando a gravidade da pancreatite aguda através dos seus efeitos anti-inflamatórios.

Lei et al (2008) investigaram os efeitos do *resveratrol* sobre a IL-1 β em células mesenquimais indiferenciadas da medula óssea (MSC), derivadas de culturas de condrócitos, tendo como resultado a indicação de que o *resveratrol* atua como um inibidor do NF-kB para proteger as MSC-derivadas de condrócitos pelo catabolismo da IL-1 β e esse efeito é mediado pela β_1 -integrina.

1.2 Hipótese e Objetivos

1.2.1 Hipótese

Como o resveratrol tem atuação em diferentes processos biológicos, melhorando a atividade celular, essa substância poderia atuar nos processos de regeneração óssea, acelerando e promovendo uma melhor qualidade quando empregados materiais não autógenos para a regeneração desse tecido.

1.2.2 Objetivo Geral

Avaliar celular e molecularmente o potencial de neoformação óssea com a utilização de biomateriais associados ao resveratrol, *in vivo*.

1.2.3 Objetivos Específicos

- Identificar as variações existentes na atividade do NF-κB com a utilização de resveratrol, através da análise imonohistoquímica;
- Determinar a concentração mais adequada de resveratrol para o processo de neoformação óssea, pela utilização de diferentes concentrações do produto, em análises histológicas de enxertos coletados de animais;
- Quantificar, em semanas, a variação no crescimento e neoformação óssea quando induzidos pelo resveratrol, através da análise histomorfométrica, com a aplicação de marcadores de crescimento ósseo em diferentes tempos.

Capítulo 2

2.1 Publicação

2.1.1 Patente internacional: Pharmaceutical product for modulating bone formation, process for modulation bone formation.

Descriptive Report

Pharmaceutical product for modulating bone formation,
Process for modulating bone formation

Field of the invention

5 The present invention relates to a pharmaceutical product and a process for bone regeneration and neoformation. More specifically, the pharmaceutical product of the invention comprises sirtuin modulators, such as some resveratrol derivatives. The product and process of the present invention have the advantage of accelerating the process of integration of biomaterials to the body, shortening intensively the recovery period of the injured or lost organ. The present invention has potential application in medicine, particularly to orthopaedics.

Background of the Invention

15 The worldwide use of aloplastic implants in orthopaedics is becoming a constant. Aloplastic implant foreseeable condition opens new horizons to the recovery of disabled patients. In the last years, the surgical techniques as well as the materials used to achieve this goal have developed and improved. Nowadays, aloplastic implant is widely accepted in health care, particularly in dentistry. It has also been used as a solution for many unsatisfactory or unsolvable cases for professionals and patients. However, to achieve a successful implant a direct connection between living bone and titanium must exist. Thus a fundamental aspect is osteointegration, that is, a structural and functional connection between implant and bone tissue. This concept defines, in a clinical way, a biological phenomenon characterized by relative absence of soft tissue in the interface implant/bone.

25 One important phase of osteointegration is the osteogenic phase, characterized by bone neoformation that begins when the differentiation of the first osteoblasts in peri-implant region occurs. The preparation of the bone site to place the implant releases morphogenetic proteins forming the new bone tissue. This process constitutes the osteoinduction. The association of the

functions of these proteins and the osteoblasts releases the process of bone neoformation.

In 2006, it was shown that natural product trans-resveratrol promoted the selective differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts by
5 activating sirtuin protein Sirt1 (Carl-Magnus Backesjo, *et al.* J. Bone and Miner Res. 2006). Trans-resveratrol modulates this protein. Sirtuin modulators can activate or deactivate changes in sirtuin functional property or biological activity. When modulator activates the protein there is a stimulation of the functional property, and when modulator deactivates the protein there is an inhibition of
10 this property, or of the protein biological activity.

Sirtuin is a member of the sirtuin protein family deacetylases, or rather of the families Sir2, which includes yeast Sir2, *C. elegans* Sir-2.1, and human SIRT1 and SIRT2. Sirtuin protein modulators, such as resveratrol, acridine, quinoline, heterocyclic, tetrahydroquinoxaline, N-benzimidazolylalkyl amide and
15 N,N'-dicyclic isothiourea derivatives, minimize or treat aging diseases, chronic degenerative diseases of circulatory and neurological systems, such as ocular diseases and/or disorders, psychopathologies, diabetes, cancer, obesity.

Patent literature considers some documents related to processes of osteointegration. Although none of the documents foresees or even indirectly
20 suggests the inventive concept of the present invention, some of them are mentioned below as reference.

International patent application WO 2005/069998, "Novel sirtuin activating compounds and methods for making the same", describes the preparation of stilbene compounds for use in food, cosmetic and
25 pharmaceutical industry. The preparation includes coupling of N-heterocyclic carbene-type ligands in the presence of a base with benzyol halide and styrene coupling partners.

International patent application WO 2006/094237, "Acridine and quinoline derivatives as sirtuin modulators", describes novel active quinoline derivatives ,

as sirtuin-modulating compounds useful, for example, for treating cell aging and avoiding cell death.

International patent application WO 2006/094210, "Tetrahydroquinoxalinone sirtuin modulators", describes novel
5 tetrahydroquinoxalinone sirtuin-modulating compounds used for treating and/or preventing diseases, including cancer.

International patent application WO 2006/094209, "N-benzimidazolylalkyl-substituted amide sirtuin modulators", describes novel
10 benzimidazol sirtuin-modulating compounds used for treating or preventing some kind of diseases, such as cancer, obesity, and neurodegenerative diseases. These compounds are used to increase cell lifespan.

International patent application WO 2006/094233, "N,n'-dicyclic isothioureia sirtuin modulators", describes novel sirtuin-modulating compounds
15 and methods of use thereof. Sirtuin-modulating compounds may be used for increasing cell lifespan, and for treating or preventing a wide variety of diseases, such as obesity, diabetes, cardiovascular and neurodegenerative diseases.

International patent application WO 2006/127987, "Treatment of eye disorders with sirtuin modulators", describes sirtuin modulators, particularly
20 sirtuin activators, useful to treat vision impairment. In general, the sirtuin modulators inhibit the progression of vision impairment. The invention also includes pharmaceutically acceptable formulations of sirtuin modulators, particularly ophthalmically acceptable formulations.

International patent application WO 2006/138418, "Improvement of cognitive performance with sirtuin activators", describes a method that may
25 include administering an agent that increases protein level or sirtuin activity, such as SIRT1.

International patent application WO 2006/104586, "Methods of diagnosis and treatment of metabolic disorders", describes diagnostic methods for
30 metabolic disorders (e.g., diabetes and obesity) and includes analyzing the level of sirtuin2 or sirtuin3 expression or activity in a sample isolated from the subject.

International patent application WO 2006/102557, "Treatment of protein degradation disorders", describes a method of treating a subject suffering from or susceptible to a protein degradation disorder, (e.g., cancer). It also includes the use of a protein degradation inhibitor.

5 International patent application WO 2006/091582, as well as applications WO 2006/043166, WO 2005/099785, WO 2005/000373, WO 2004/103423, relate to the modification or the coating of an implant made of titanium.

International patent application WO 2005/104988, "Osteogenic implants with improved osteointegration properties", describes the impregnation of the
10 implant surface with solution containing bone recombinant sialoprotein or recombinant His-Myc-Ek-BSP to induce differentiation of mesenchymal cells. International patent application WO 2004/024199 uses osteoinductive proteins called "Bone Morphogenetic Protein" with the same aim.

Processes using recombinant Bone Morphogenetic Proteins with this
15 purpose are a worldwide trend. However, the industrialization of this system is costly, being an impracticable alternative nowadays.

International patent application WO 2005/099785, "Osteogenic composite matrix, method for the production thereof and implant and scaffold for tissue engineering provided with a coating formed by said osteogenic
20 composite matrix", describes the addition of collagen components to an extracellular matrix to accelerate osteoinduction.

International patent application WO 2003/082300, "Use of carbon-2-modified-vitamin d analogs to induce the formation of new bone", describes the addition of $1\alpha,25$ -dihydroxivitamin D3 derivatives to stimulate osteoblasts to the
25 formation of a new bone.

International patent application WO 1995/013099, "Osseointegration promoting implant composition, implant assembly and method therefor", describes the use of growth factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) to promote osseointegration in bone implant.

30 Considering the reference documents mentioned above, it can be noticed that documents relating trans-resveratrol to the processes of osteointegration,

or osteoinduction, or sirtuin modulators and osseointegration (osteoinduction) were not found in patent literature. Documents mentioned above refer to other processes that accelerate the process of osseointegration, without anticipating or suggesting the scope of the present invention.

5 The present invention shows quantitative as well as qualitative ability to stimulate the proliferation of cells with bone formation potential. The detailed description of the invention will help to understand it. Among the several technical advantages resulting from the present invention, one can mention the easy separation and purification, in a single process, of emodin and/or trans-
10 resveratrol with high levels of purity, and the preparation of a pharmaceutical product from an alternative and more available material.

Summary of the invention

In one aspect of the invention, being, therefore, one of its objects, a pharmaceutical product which is modulator of bone formation in vertebrates,
15 including humans, is provided.

In other aspect of the invention, being, therefore other of its objects, a process of bone regeneration and neoformation using modulators is provided.

It is an object of the present invention to provide a product and a process that dramatically decreases the recovery period of injured or lost organ by
20 means of body biomaterial integration .

In a preferential aspect of the invention, being, therefore, other of its objects, a pharmaceutical product comprising sirtuin modulators is provided.

In other aspect of the invention, being, therefore other of its objects, a pharmaceutical product comprising resveratrol derivatives is provided.

25 In other aspect of the invention, being, therefore other of its objects, a pharmaceutical product comprising trans-resveratrol is provided.

These and other objects of the present invention will be better understood and appreciated from the detailed description of the invention.

Brief description of the Drawings

Figure 1 shows the beginning of bone formation in a control group, whose bone formation is much slower than that of groups subject to the invention. Several areas of not hard, but in modification, tissue after six weeks are shown.

Figure 2 shows complete filling of the surgical site. It is noticed that the process of bone tissue transformation presented, in six weeks, several areas (islands) where the development stage had not already begun. This delay shows it is necessary more time to the complete recovery of the bone structure. Test was performed in experimental group 1.

Figures 3 and 4 show an acceleration in the process of absorbing the filling material of the surgical site, shortening the period of time to the bone neoformation. It is also observed a great increase in the proliferation of cell with osteogenic potential (osteoblasts). Regarding to the other groups, it is noticed, in six weeks, a great shortening of time in the healing process of the area where surgical site had been made. Test was performed in experimental group 2.

15 **Detailed description of the invention**

The present invention provides a pharmaceutical product and a process for modulating bone formation. To the aims of the present description, the expression "to modulate bone formation" should be understood comprising bone regeneration and/or neoformation. The product of the invention includes bone formation modulators, particularly sirtuin protein modulators. To develop the product and the process of the invention, several experimental approaches, measurement, and technical evaluation were performed. The novel and inventive results obtained are described in further detail below.

In a first approach, inventors performed laboratory tests to induce bone tissue growth and neoformation in sites prepared in rabbit tibias. Three animals were used in pilot study. Initially, animals were submitted to standard practice of anesthesia, analgesia, and surgical preparation, that is, a trichotomy surrounding the incision site was made, thus setting up a compatible field to surgical procedure. After this procedure, antisepsis was made with iodine alcohol (iodine ethanol) and surgical fields were set up. Incision was made in

two planes, one internal and the other external, with a # 15 blade scalpel. The incision made in the skin, in the medial side of the proximal tibia, was about 3.0 cm. The same procedure was carried out into the subcutaneous tissue and fascia, to the periosteum, which was cleared to expose the bone tissue. A flap
5 was raised exposing the bone tissue. Then bores were cut with a # 6 trephine for counter-angle. Such bores were cut under abundant irrigation with 0.9% NaCl. Rotational speed was 1500 rpm and torque was 30N/cm diminishing 16/1 to prepare bone cavity, according to standard surgical protocol for bone
10 grafting. During the procedures a Driller equipment was used, which is proper to this kind of surgery. To perform the tests, three surgical sites were prepared, with about 10 mm between them. Then only the skin was sutured. A # 6 trephine, from INP, was used to prepare surgical site. Skin was sutured with a sterile nylon suture thread, 5-0, with 75cm length and a triangular needle, from Shalon. Cavity was prepared with the trephine to do a bone hollow 5 mm
15 diameter. Thereafter, other ones procedures were performed, as described in detail bellow. Such procedures illustrate, but not limit, preferred embodiments of the invention.

Stage 1: Preparing, numbering, and dividing sites

In this stage, sites are prepared, divided, and numbered. After being
20 prepared, sites were divided and numbered as site 1, site 2, site 3 and site 4. Site 1 was set up in proximal tibia. Site 2 was set up in medial tibia, and site 3 was set up in distal tibia. Experimental groups were also divided and numbered as follows:

Group 1 – Control group (CG). In this group, surgical site was just prepared,
25 without any filling material.

Group 2 – Experimental group 1 (G1) in which only freeze-dried bovine bone, medium grain (biomaterial), from Bionnovations Medical, was used for filling surgical site.

Group 3 – Experimental group 2 (G2) in which freeze-dried bovine bone, medium grain (biomaterial), associated to 10% of its weight of trans-resveratrol, was used for filling surgical site.

Stage 2: *Histological techniques and material processing*

- 5 Six weeks after surgery, animals were killed with an overdose of Ketamina (7ml/animal). After soft tissue dissection, bone blocks and implants were removed with a saw and then sample were fixed, by immersion in neutral solution of formalin 4.0%, during thirty days.

Stage 3: *Dehydrating samples with ethanol*

- 10 After thirty days, samples were washed with running water during 12 hours, and dehydrated by a series of absolute ethanol and distilled water, rigorously according to the following table.

Table 1 - Series of alcohols for dehydration

Alcohol	Concentration (%)	Time (h)
Ethanol	50	24
Ethanol	70	48
Ethanol	80	24
Ethanol	90	72
Ethanol	96	72
Ethanol	100	72
Ethanol	100	48

- 15 **Stage 4:** *Preparing samples and results obtained*

Samples were cut after dehydration and put on slides for histological study and evaluation of results. Cuts in bone areas, which received cavities called surgical sites, were made. After laboratory assays, the following results were obtained from this pilot study:

- 20 Control group showed a beginning of bone formation, although much slower than in other experimental groups. After six weeks, several areas of not

hard tissue, but tissue in modification, were found. Experimental group 1, on the other hand, presented a complete filling of the surgical site. However, its process of transformation into bone tissue presented, during the six weeks, several areas, or islands, where development stage had not begun, what hence
5 shows that more time is necessary for the complete recovery of this bone structure. Experimental group 2 showed an excellent acceleration in the process of absorbing the filling material of surgical site, shortening the period to bone neoformation. A great increase in the proliferation of cells with osteogenic potential (osteoblasts) was also observed. Regarding the other groups, it was
10 noticed that in six weeks a great shortening of time in the surgical site healing process occurred, as shown in figures 3 and 4. Thus, when experimental groups are compared, one can notice that there was a great increase in the healing process of experimental group 2 (G2) comparing to the other two groups, control (CG) and experimental 1 (G1). A great increase in the
15 quantitative and qualitative proliferation of cell with bone formation potential in group G2 was also observed, resulting in the acceleration of bone neoformation.

Among the advantages provided by the invention, as mentioned above, there is acceleration in the process of integration of these biomaterials to living
20 body (human being), with promising results. Shortening the recovery period of the injured or lost organ allows patients coming back sooner to their regular activities. There are fewer traumas to the structure related to the rehabilitated site, such as, muscles, vessels, nerves, etc. Returning this function has great psychological effect, which results in the acceptance of some types of treatment
25 by patients. The present invention has several applications in medicine, particularly to orthopaedics, because it relates directly to bone tissue regeneration and neoformation. It is known that this field has greatly developed in the past decades both in technology and in science, presenting uncounted benefits and novel alternatives. One of the main researched aspects in this field
30 is precisely a substance that acts as a factor of osteogenesis acceleration and stimulation, being one of the aspirations of industry related to this activity.

Those skilled in the art will immediately appreciate the important benefits brought by the present invention, such as accelerated bone regeneration and neoformation, in which the results are much more effective. Variations in the way of performing the inventive concept here described are to be deemed
5 within the spirit of the invention and the scope of the claims attached.

Claims

Pharmaceutical product for modulating bone formation,
Process for modulating bone formation

1. Pharmaceutical product for modulating bone formation **characterized by**
5 comprising:
 - a) from 0,1% to 15% w/w of at least one sirtuin modulator;
 - b) a pharmaceutically acceptable vehicle .
2. Product, according to claim 1, **characterized by** sirtuin modulator being
chosen from the group that comprises resveratrol, trans-resveratrol and
10 combinations thereof.
3. Product, according to claims 1 and 2, **characterized by** sirtuin modulator
being resveratrol and presenting a concentration of 5% w/w.
4. Product, according to claims 1 and 2, **characterized by** sirtuin modulator
being resveratrol and presenting a concentration of 10% w/w.
- 15 5. Product, according to claim 1, **characterized by** additionally comprising a
material compatible with the target bone tissue.
6. Product, according to claim 5, **characterized by** compatible material being
chosen from the group that comprises freeze-dried bovine bone, titanium
surfaces, orthopaedic prostheses and mixtures thereof.
- 20 7. Process for modulating bone formation **characterized by** comprising a stage
of filling bone tissue with a pharmaceutical product for modulating bone formation
according to claims 1 to 6.

FIGURES

Figure 1

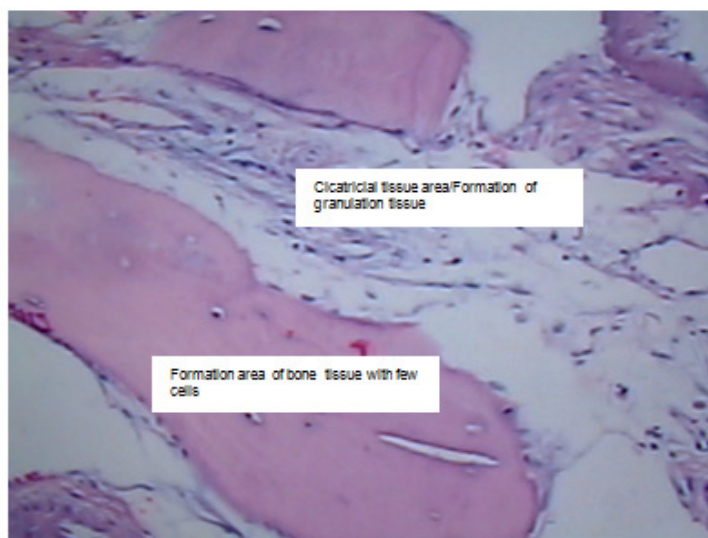


Figure 2

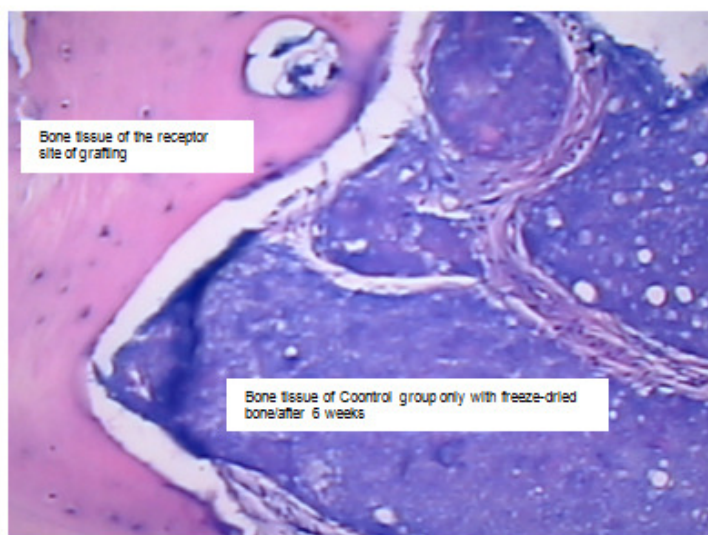


Figure 3

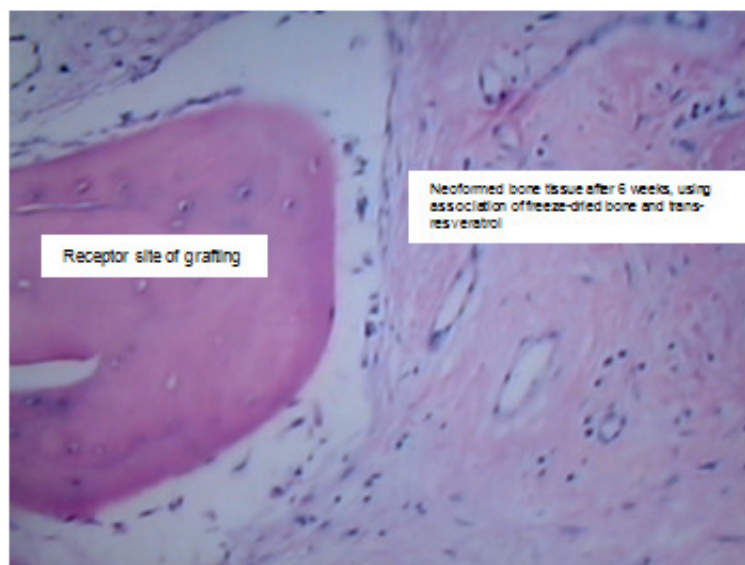
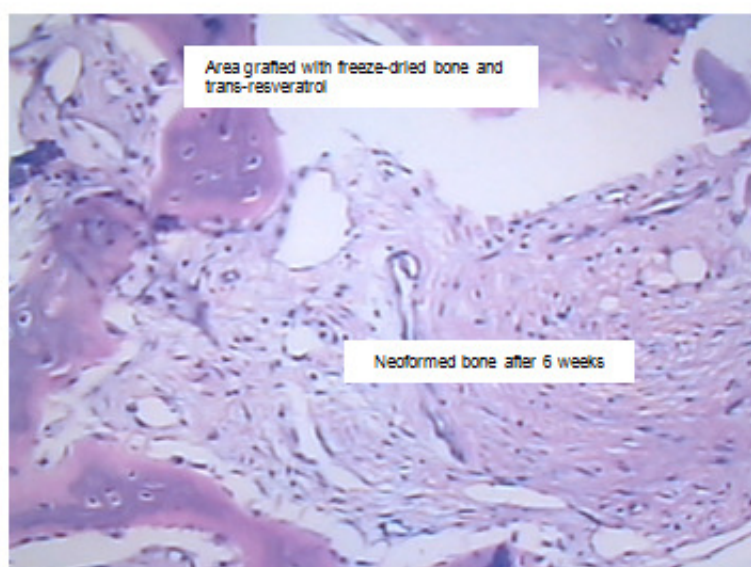


Figure 4



Capítulo 3

3.1 Materiais e Métodos

Como esse estudo teve diferentes etapas de avaliação, pois foi executado em períodos diferentes e, como se trata de um produto inédito, os ensaios serão apresentados em ordem cronológica de realização. Inicialmente, descreve-se o modelo animal, o manejo, os cuidados e a técnica anestésica utilizada, que foi a mesma durante todo esse trabalho.

3.1.1 Modelo animal, manejo e cuidados

Os procedimentos clínicos desta investigação foram executados de acordo com os princípios internacionais para pesquisa biomédica em animais (CIOMS – Genebra, 1985). Foram utilizados coelhos *New Zealand*, de ambos os sexos, com peso médio variando entre três e quatro quilogramas, obtidos no Biotério da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Medicina Veterinária do Centro de Ciências Rurais da UFSM, isolados em gaiolas adequadas, com 1 (um) animal, por gaiola, em um ambiente apropriado, recebendo água e ração seca *ad libitum*, sob temperatura ambiente controlada de 21°C. O sistema de iluminação segue o padrão internacional, com períodos de 12 horas escuro e 12 horas sob luz artificial, com o uso de temporizadores de iluminação. Esse trabalho teve a anuência do comitê de ética em experimentação animal, da Universidade Federal de Santa Maria, sendo aprovado sob nº 25/2008, processo 23081.006154/2008-13, na reunião realizada em 05 de maio de 2008.

3.1.2 Técnica anestésica e medicação pós-operatória

Para a cirurgia os animais foram anestesiados com maleato de acepromazina (Univet, Brasil) a 1% na dose de 2 mg/kg, cloridrato de xilazina (Bayer, Brasil) a 2% na dose de 5 mg/kg e cloridrato de cetamina (Agener Pharmaceutica, Brasil) na dose de 35 mg/kg, por via intramuscular. Adicionalmente, 1 ml de anestésico local (PRILONEST 3%- Prilocaina/Felipressina 54mg+0054UI, Brasil) foi injetado no sítio da cirurgia, subcutaneamente, para reduzir o sangramento e fazer uma boa analgesia. No pós-operatório imediato, uma dose única de antibiótico Benzetacil (Wyeth, Brasil) 20.000 IU e de antiinflamatório meloxicam (Ouro Fino, Brasil) a 0,2%, na dose de 0,2 mg/kg, foi injetada em cada animal.

3.1.3 Estudo histológico inicial dos efeitos do resveratrol na neoformação óssea em animais

Essa parte do estudo está descrita no Capítulo 2: Patente internacional: Pharmaceutical product for modulating bone formation, process for modulation bone formation (WO 2008/124907).

3.1.4 Estudo para a determinação da concentração de resveratrol na associação com biomateriais

Foram utilizados para este estudo seis (6) coelhos New Zeland.

3.1.4.1 Divisão dos grupos

Os animais foram divididos nos grupos que seguem, sendo executados dois leitões cirúrgicos para cada uma das tíbias dos animais:

Grupo 1 - Grupo experimental (**Gexp1**), que foi utilizado para preenchimento do leito cirúrgico com osso bovino inorgânico adicionado de 20 % de *resveratrol* com relação a seu peso;

Grupo 2- Grupo experimental (**Gexp2**), que foi utilizado para preenchimento do leito cirúrgico com osso bovino inorgânico adicionado de 40 % de *resveratrol* com relação a seu peso;

Grupo 3- Grupo experimental (**Gexp3**), que foi utilizado para preenchimento do leito cirúrgico com osso bovino inorgânico adicionado de 60 % de *resveratrol* com relação a seu peso;

Grupo 4- Grupo experimental (**Gexp4**), que foi utilizado para preenchimento do leito cirúrgico com osso bovino inorgânico adicionado de 80 % de *resveratrol* com relação a seu peso.

Os leitões preparados foram divididos e numerados da seguinte maneira, sendo que cada tíbia recebeu 1 (um) leito cirúrgico na sua porção interna, a uma distância de 10 mm da articulação da região proximal (figura 5):

Leito 1 – Leito na porção mais proximal da tíbia direita

Leito 2 – Leito na porção mais distal da tíbia direita

Leito 3 – Leito na porção mais proximal da tíbia esquerda

Leito 4 – Leito na porção mais distal da tíbia esquerda

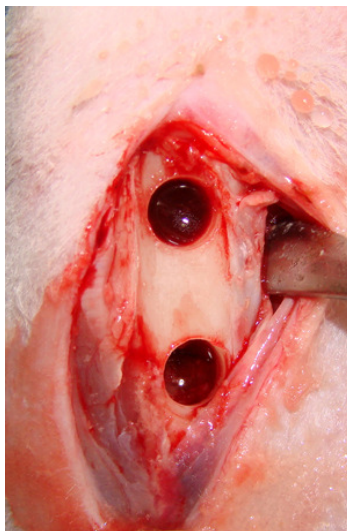


Figura 5: Aspecto dos leitos cirúrgicos preparados nas tíbias dos animais.

A distribuição das amostras foi feita de forma randomizada. Cada grupo foi avaliado em triplicata, justificando-se assim, o número de animais utilizados nesse experimento.

3.1.4.2 Materiais utilizados

Para essa série experimental, foi utilizado osso bovino inorgânico (*Bonefill*, fornecido pela empresa *Bionnovation*®, de Bauru - SP), com frascos contendo partículas médias (partículas de 0,6 a 1,5 mm) em um peso de 0,5 gramas (figura 6). O resveratrol foi fornecido pelo laboratório de Química de Produtos Naturais da PUCRS.

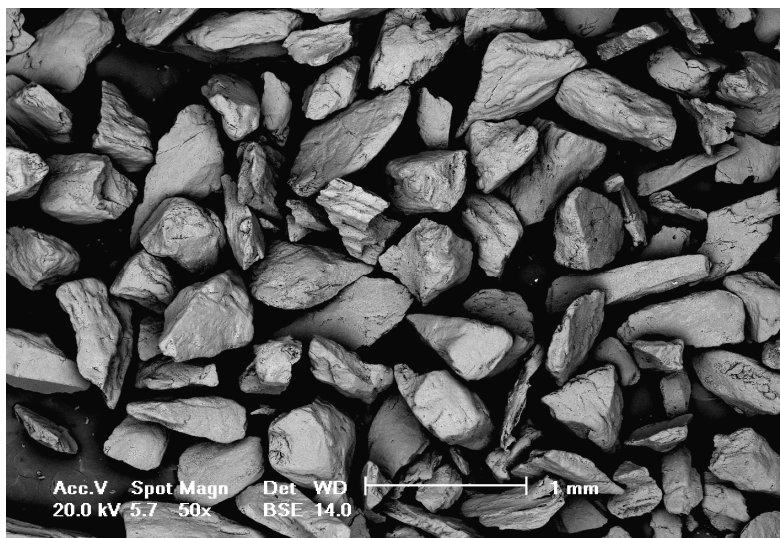


Figura 6: Imagem obtida em MEV do osso bovino inorgânico *Bonifill* com aumento de 50 vezes.

Após a pesagem e mistura do resveratrol com o osso bovino liofilizado (figura 7), as amostras foram encaminhados para esterilização por radiação pela empresa *EMBRARAD* (São Paulo), dentro dos mesmos padrões e normas utilizados convencionalmente pelas empresas para comercializarem seus biomateriais para essa finalidade.



Figura 7: Aspecto do frasco onde foi feita a mistura e a esterilização do osso bovino inorgânico com o resveratrol.

3.1.4.3 Protocolo cirúrgico experimental

Após os animais receberem anestesia e os demais cuidados, as cirurgias foram realizadas em ambas as tíbias de cada animal.

Após a tricotomia na região próximo-lateral das duas tíbias, realizou-se a antisepsia do local a ser operado, com a utilização de iodopovidona (Povidine® – Johnson Wax). A incisão foi realizada no sentido próximo-distal, mantendo-se a pele sob tensão em direção súpero-lateral, para que a incisão se mantivesse distante do local da intervenção óssea. Esse procedimento teve como finalidade manter a sutura da pele distante da região do leito ósseo. Terminada a incisão, a fáscia lateral e o perióstio foram delicadamente incisados e deslocados, expondo-se cada tíbia na sua porção mais proximal. O perióstio, depois de incisado, foi descolado com descolador de Molt. Nesse local, foram realizadas as perfurações com auxílio de uma trefina (*Meisinger*®) número 4 (quatro), que apresenta um diâmetro externo de 4 mm, para contra-ângulo, com redução de 16/1 (*Dentscler*®). Tais perfurações foram realizadas sob intensa irrigação com soro fisiológico, velocidade de rotação de 1500 rpm e 30N/cm de torque, seguindo o protocolo cirúrgico atraumático preconizado nas técnicas de enxertia. Nesses procedimentos, utilizou-se o motor *Driller*®, conforme as especificações próprias para cirurgias desse tipo. Foram realizados dois leitos cirúrgicos, mantendo-se aproximadamente 15 mm de distância da articulação. O material colocado em uma quantidade que preenchesse todo o defeito ósseo criado. Esse tamanho de defeito é considerado crítico para ensaios de regeneração óssea.

A sutura da pele foi realizada com fio de sutura agulhado de nylon estéril, 5-0, 75cm de comprimento com agulha triangular da marca comercial *Shalon*®.

A eutanásia de 3 (três) animais dessa etapa foi feita após 30 (trinta) dias e os outros 3 (três) foram após 60 (sessenta) dias, sendo removidas as amostras para o estudo histológico.

3.1.4.4 Preparação histológica das amostras

Após a coleta das amostras, estas foram incluídas em parafina, seguindo-se os procedimentos histológicos propostos por JUNQUEIRA & JUNQUEIRA (1983).

Após a remoção, as peças foram fixadas em solução de formol a 10%, aguardando-se o período de entrega no Laboratório de Patologia. Em seguida, as peças foram lavadas em água corrente por 18 h. Seguindo para a desidratação de inclusão em parafina conforme tabela 1.

Tabela 1: Desidratação

Etanol 70°	24h
Etanol 95°	02h
Etanol 95°	02h
Etanol 100°	08h
Etanol 100°	08h
Etanol 100°	08h
Xilol	04h
Xilol	04h
Xilol	04h

Depois da inclusão em parafina, foram feitos cortes de aproximadamente 5 micrômetros, desparafinação dos cortes em estufa a 60° durante 24 h. Após essa etapa, as lâminas seguiram os mesmos procedimentos aqui descritos. Após, as lâminas receberam coloração pela Hematoxilina e Eosina.

Para a captura das imagens foi utilizado um microscópio *Nykon E200*. Os dados foram analisados e comparados para a determinação da concentração mais adequada de resveratrol.

3.1.4.5 Avaliação histológica das amostras

A avaliação histológica dos eventos ocorridos foi feita de forma descritiva, utilizando-se de um método semi-quantitativo, sendo feita por um mesmo avaliador com experiência nesse tipo de imagem. Para essa avaliação e determinação da eficácia do resultado nos diferentes grupos propostos, quanto a neoformação óssea, alguns parâmetros foram avaliados, baseando-se na presença de células características do processo inflamatório, na formação de cápsula fibrosa ao redor do material implantado, no tipo de tecido neoformado na região e na presença do material implantado em meio ao leito receptor durante os períodos observados. Essa verificação foi executada da seguinte maneira, em três áreas no centro do defeito (porção periosteal, endosteal e medular):

A) Intensidade da inflamação:

- ausente (0), quando na ausência de células inflamatórias;
- discreta (1), presença de pequena quantidade de células inflamatórias;
- moderada (2), devido a existência de algumas células inflamatórias dispersas em meio a área estudada;
- intensa (3), devido a existência de grupamentos compostos por várias células inflamatórias junto ao material estudado.

B) Formação de fibras colágenas nas amostras:

- ausente (0), quando o material estava em contato com tecido ósseo ou tecido conjuntivo denso, composto por fibras e células;

- discreta (1), quando a presença de fibras era menor que um terço da área total da amostra;

- moderada (2), quando a cápsula fibrosa era encontrada em menos da metade do perímetro referente à interface entre o material de preenchimento e o leito receptor;

- intensa (3), isolando-os o assim do leito ósseo receptor.

C) Presença de neoformação óssea:

- ausente (0), quando não foi encontrado nenhum sinal de formação de tecido ósseo na área estudada;

- discreta (1), quando menos de um terço da área do defeito foi preenchida;

- moderada (2), quando verificou – se na região a formação de um tecido ósseo imaturo, rica em osteócitos;

- intensa (3), quando da formação de um tecido ósseo estruturado, do tipo lamelar, na região.

D) Quantidade de material enxertado encontrado nas amostras:

- ausência do material (0), sendo o mesmo totalmente substituído por tecido ósseo;

- discreta (1), presença de pequenas áreas com material;

- moderada (2), sendo encontrados apenas alguns fragmentos do material em meio ao tecido ósseo neoformado;

- intensa (3), devido à ausência de substituição do material por tecido vivo.

E) Quantidade de osteócitos por mm^2 encontrado nas amostras (figura 8):

- ausência de osteócitos (0);
- discreta (1), presença de pequenas áreas com osteócitos;
- moderada (2), sendo encontrados apenas alguns osteócitos;
- intensa (3), grande quantidade de osteócitos.

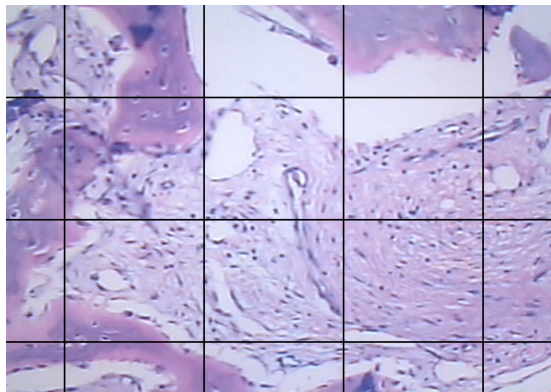


Figura 8: Esquema utilizado para a contagem de osteócitos por mm^2 (Aumento de 10x).

3.1.5 Estudo dos efeitos do resveratrol sobre o NF- κ B

Foram utilizados para esse estudo setenta (70) coelhos New Zeland adultos (machos e fêmeas).

3.1.5.1 Grupo de determinação da curva de ativação do NF- κ B

Pela pouca literatura existente a esse respeito, houve a necessidade de identificar o pico de ativação do NF- κ B em cortical óssea dos animais utilizados nesse experimento. A literatura também não é muito clara com relação ao tipo de

solução fixadora utilizada. Tendo em vista estas dificuldades, foram utilizadas três diferentes soluções fixadoras, que foram descritas anteriormente.

Os animais foram divididos em sete grupos, com cinco animais em cada um, conforme o período de eutanásia (1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 horas). Os animais foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos integrais, no entanto, durante a confecção do leito cirúrgico, não foi realizada irrigação do tecido ósseo, pois falta de irrigação resulta em um aquecimento sobre o tecido ósseo, promovendo um maior trauma cirúrgico e consequente aumento do processo inflamatório local.

3.1.5.2 Grupos controle e verificação da técnica

a) Grupo controle sem Cirurgia (**GcsC**): grupo controle não operado foi composto por cinco animais, que não sofreram nenhum procedimento cirúrgico, somente foram anestesiados e sacrificados após seis horas.

b) Controle com Cirurgia (**GccC**): grupo controle com Cirurgia apresenta 4 subgrupos compostos cada um por cinco animais. Foram realizados os procedimentos cirúrgicos iniciais: anestesia, tricotomia, incisão, descolamento do periósteo, exposição do tecido ósseo e sutura, não sendo realizada a perfuração da camada cortical óssea. Os animais desse grupo foram sacrificados após uma, duas, quatro e seis horas do término da cirurgia.

c) *Controle Positivo* (**Cp+**): nesse grupo foram realizados cortes de carcinoma de próstata, submetidos ao processo imunoistoquímico, como indicado pelo fabricante do anticorpo Zymed®, tendo como objetivo a avaliação da efetividade da reação imunológica do anticorpo sobre os tecidos. Segundo o fabricante, esta

endonuclease, o NF-kB, é constantemente expressa e ativa neste tipo de carcinoma, favorecendo, desta forma, a avaliação da efetividade do anticorpo.

d) *Controle do Processo*: esse controle foi realizado para verificar o processamento das lâminas, onde foram selecionadas lâminas aleatoriamente de cada fase da imunistoquímica. As mesmas sofreram todo o processamento padronizado para as marcações; porém, não foram incubadas com o anticorpo primário. Estes procedimentos foram realizados conjuntamente com as lâminas que receberam o anticorpo primário. Esse cuidado se fez necessário para avaliar a existência de alguma interferência do anticorpo secundário e terciário nas lâminas analisadas.

3.1.5.3 Grupos experimentais

- Grupo Controle 1 (**Gcon1**): Para esse grupo foram utilizados os dados do grupo de determinação da curva de ativação do NF-kB com o tempo de 6 horas que foi determinando como o pico da ativação, pois a irrigação durante os procedimentos cirúrgicos ósseos sempre foi considerada fundamental (GEHRKE et al, 2005), mas sem demonstração de evidências moleculares.

- Grupo Controle 2 (**Gcon2**): O grupo composto de cinco animais, foi submetido aos procedimentos cirúrgicos integrais; porém, durante a confecção do leito cirúrgico, foi realizada uma abundante irrigação com solução fisiológica (Cloreto de Sódio 0,9% Sanfarma®). O objetivo, neste grupo, foi avaliar a ativação do NF-kB em tecido ósseo utilizando-se um agente refrigerador (solução fisiológica),

comparando-se os resultados com os observados no grupo que não recebeu este tipo de tratamento. A eutanásia dos animais foi realizada após 6 horas.

- Grupo Resveratrol 3 (**Gres3**): O grupo com resveratrol, contendo cinco animais, recebeu a colocação do resveratrol diretamente no leito cirúrgico, imediatamente após a realização da cirurgia. O material foi preparado previamente, embalado e esterilizado com radiação Gama, com intensidade de 25KGy em temperatura ambiente (EMBRARAD – Empresa Brasileira de Radiações). Cada embalagem continha 0,5 mg de resveratrol, quantidade suficiente para preencher o leito cirúrgico. A eutanásia foi no tempo de 6 horas.

3.1.5.4 Técnica cirúrgica

A cirurgia foi realizada na tíbia direita de cada animal, na região proximal, onde foi confeccionado apenas um leito cirúrgico. A confecção dos leitos foi realizada sem a utilização de agentes irrigantes nos grupos 1 e 3 e no grupo 2 com irrigação por solução fisiológica (**Gcon2**), pois conforme descrito anteriormente, a falta de irrigação resulta em um aquecimento sobre o tecido ósseo, promovendo um maior trauma cirúrgico e consequente aumento do processo inflamatório local. Esta modificação da técnica cirúrgica teve como objetivo aumentar o trauma cirúrgico, para melhor observar a atividade do NF-kB na cortical óssea.

Os procedimentos cirúrgicos seguiram a descrição do item 3.1.4.4, exceto a confecção do leito cirúrgico que foi feito com uma única perfuração, através de uma broca tipo lança, de 1,8 mm de diâmetro, acoplada a um contra ângulo com

redução de 16:1, movido por um motor elétrico (Dyna) com velocidade de 980 rpm e 30N/cm de torque (figura 9).

Após o tempo de duração do experimento, os animais foram eutanasiados conforme os tempos determinados para cada grupo. As amostras foram então removidas e colocadas nas devidas soluções fixadoras.

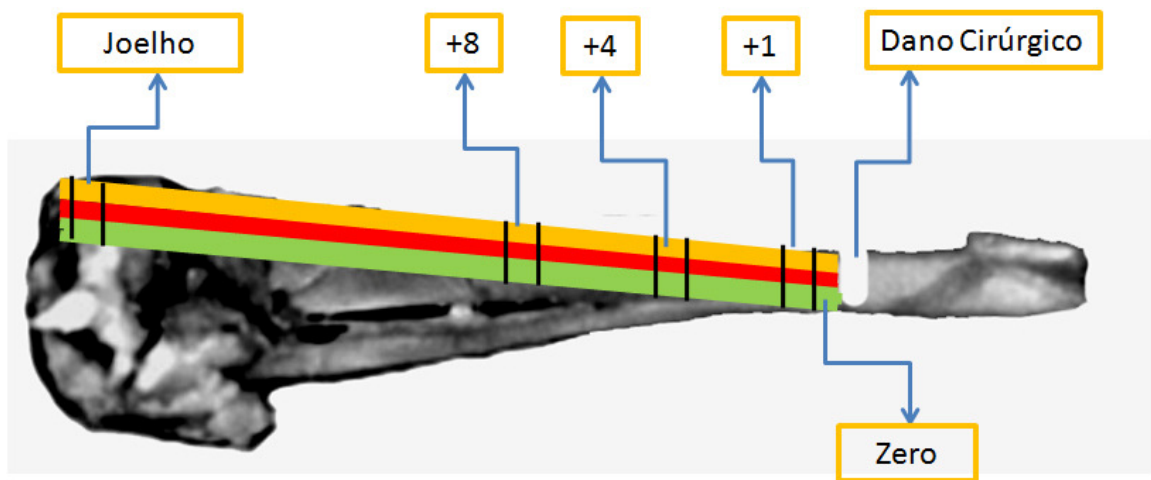


Figura 9: Esquema das posições determinadas para a avaliação do dano cirúrgico e as regiões periosteal (amarela), média (vermelha) e endosteal (verde).

3.1.5.5 Processamento histológico

a) Soluções fixadoras

Com a intenção de preservar o máximo possível as proteínas contidas no interior do tecido ósseo, foi necessária a utilização de três diferentes tipos de soluções fixadoras:

1º- Solução de Formol Tamponado – Sugerido por Donath *et al.* (1992). Essa solução é composta de um tampão fosfato pH=7,4 (hidroximetil) aminometil,

6,05g de TRIS e 8,5g de NaCl para 1 litro de água destilada, sendo acrescido 10% de formol PA a essa solução, ou seja , para cada litro de solução tampão TRIS, foram acrescidos 10 ml de formol PA;

2º- Etanol 70% - Sugerido pelo artigo de YANG *et al.* (2003). A solução é composta de etanol PA mais 30% de água destilada;

3º- Solução de glicerol – Sugerida pelo artigo de BOURQUE *et al.* (1993). Essa solução é composta por glicerol PA diluída em etanol PA em uma proporção de 30-70%, acrescentando-se formol PA a essa solução em uma proporção de 10%, ou seja, em um litro de uma solução de glicerol associado ao etanol, acrescentam-se 10 ml de formol.

Neste trabalho, a temperatura para fixação do material foi estipulada em 4°C, em geladeira, por um período de tempo de 7 dias. Terminado esse período, as amostras foram lavadas em água corrente em temperatura ambiente durante 24 horas e encaminhadas para a desidratação.

b) Desidratação

O processo de desidratação das amostras foi realizado em baixa temperatura (-20°C) com a utilização de um freezer de geladeira (Quality Duplex 410 – Brastemp®) situado no laboratório de Química da Universidade Federal de Santa Maria. As trocas das soluções seguiram os procedimentos descritos na tabela 2.

Tabela 2: Desidratação

Etanol - 70% ^o	72h
Etanol - 85% ^o	72h
Etanol - 95% ^o	72h
Etanol-100% ^o	72h
Etanol-100% ^o	72h
Etanol-100% ^o	72h
Xilol - 100%	72h
Xilol - 100%	72h

Indica procedimento histológico de desidratação sofrida pelas peças removidas dos animais, que terá início em uma solução de Etanol 70% até a solução de Xilol 100%. Todos os tempos serão de 72h.

Nesta etapa do trabalho, as amostras foram trocadas de uma solução para outra na mesma temperatura, isto é, -20°C, com exceção do primeiro banho de etanol 70%, que foi colocado em temperatura ambiente, para em seguida, ser levado ao congelador. Os dois últimos banhos de xilol, além de auxiliarem no processo de desidratação, também tiveram a função de remover o tecido adiposo, facilitando a embebição das amostras pelo acrílico e garantindo a posterior permeabilidade para a ação do anticorpo no tecido ósseo, conforme YANG. *et al.* (2003).

c) Embebição e Inclusão

As amostras foram inseridas e imersas em recipientes próprios para a inclusão, isentos de luz e contendo resina glicolmetacrilato Technovit® 7200 VLC.

As amostras foram mantidas em uma temperatura de -20°C . De acordo com DONATH *et al.* (1992), a sequência e o tempo de imersão nas diferentes soluções permitem a substituição periódica do álcool etílico pela resina glicolmetacrilato. A tabela 4 exibe estes detalhes.

As trocas sempre foram efetuadas com a resina na mesma temperatura que a anterior, isto é, -20° , a fim de reduzir a variação de temperatura nas peças, permitindo que o tecido mantenha suas proteínas íntegras. Pode-se notar que, também nesse passo, houve uma pequena modificação na técnica de DONATH *et al.* (1992), pois os últimos tempos preconizados pelo autor foram alterados para 72 horas, ao invés das 92h. Essa alteração permite que a remoção da resina, em um passo posterior, seja mais eficiente.

Tabela 3: Embebição

Tabela de Embebição	Technovit 7200 VLC	Etanol	Tempo de embebição
Solução 1	30%	70%	72 h
Solução 2	50%	50%	72 h
Solução 3	70%	30%	72 h
Solução 4	100%	0%	72 h
Solução 5	100%	0%	72 h

Embebição: Sequência de embebição, será iniciada pela solução 1 e terminada com a solução 5, com o intuito de substituir o etanol, proveniente da sequência de desidratação, pelo glicolmetacrilato Technovit 7200 VLC, para inclusão.

d) Polimerização

Após a inclusão, as amostras seguiram para a polimerização em resina glicolmetacrilato Technovit® 7200 VLC. As amostras foram colocadas em formas de inclusão e preenchidas com resina a 100%, sob temperatura de -20°C . A polimerização foi obtida com a aplicação de foco de luz Histolux®, cujo aparelho de polimerização mantém um resfriamento por fluxo de água contínua, e tempos de polimerização adequados. O processo de polimerização foi desenvolvido em duas etapas:

1- Polimerização inicial com luz de cor amarela, de modo a se desencadear uma polimerização gradual prevenindo trincas na resina, durante um período pré-determinado de aproximadamente 4 horas;

2- A polimerização final foi conseguida com o uso de luz azul, durante 90 horas.

Como pode ser observado, a resina não é polimerizada quimicamente, mas sim fisicamente, não havendo a necessidade da utilização do peróxido de Benzoila ($\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_4$), um agente oxidante, que poderia interferir no resultado final, quando se está trabalhando com fatores sensíveis a esse composto orgânico (YANG *et al.*, 2003).

e) Corte e Polimento

A técnica para obtenção dos cortes histológicos seguiu aquela preconizada por DONATH & BREUNER (1982). Para obter as secções de cada amostra, estas foram coladas em hastes de acrílico, sendo posteriormente posicionadas em um

aparelho de serra em forma de fita, com a utilização de uma garra mecânica. Cada bloco de resina foi então cuidadosamente aproximado da fita de diamante já na espessura desejada, utilizando um dispositivo micrométrico tipo parafuso, que define a espessura a ser cortada de todo o conjunto lâmina/bloco de resina. Foi escolhida a espessura de 220 μm e com resfriamento obtido por água corrente abundante, as amostras foram expostas à fita (100 μm de espessura e com extremidade efetiva impregnada com diamante) e cortadas sob pressão constante.

Dessa maneira, em cada amostra, foram obtidas de quatro a seis cortes, com secções paralelas ao longo eixo da tíbia. Esses cortes agora chamados de lamínulas seguiram para o desgaste em uma polidora, auxiliados por discos de lixas. O desgaste e polimento foram realizados através de uma polidora metalográfica DP-10 (PANAMBRA[®]), auxiliados por discos de lixas d'água, com granulação de 1.200 mesh, e com intensa irrigação. Antes, porém, as lamínulas foram fixadas com cianocrilato (Super Bonder LOCTITE[®]), em lâminas de vidro. No desgaste e no polimento dessas lamínulas, o disco de lixas d'água utilizado será o mesmo. Após esses procedimentos, as lâminas seguiram para remoção do acrílico. Esse processo foi desenvolvido no laboratório da Biotecnos em Santa Maria (RS).

3.1.5.6 Imunohistoquímica

A reação de imunohistoquímica para a identificação da proteína NF-kB foi desenvolvida no Laboratório de Imunohistoquímica da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

A técnica utilizada foi a da estreptavidina-biotina. Os cortes foram realizados com aproximadamente 15 µm de espessura e fixados em lâminas de vidro previamente preparadas com 3-aminopropiltriétoxi-silane a 20% (Sigma Chemical, St. Louis, USA). Para a recuperação antigênica, as lâminas foram mergulhadas em solução de ácido cítrico por 40 min, sob temperatura entre 95°C - 98°C. As lâminas foram incubadas em anticorpo policlonal anti-NF-kB (NFKappaB Lab. Zymed®, 1:200). As amostras foram posteriormente incubadas em anticorpo secundário e em complexo terciário (LSAB+ Peroxidase, Dako Corporation, Carpinteria, USA). A revelação da reação foi com solução de diaminobenzidina (DAB) 0,025% (3,3' diaminobenzidina, Sigma Chemical, St. Louis, USA) por dez min. As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Mayer, desidratadas, diafanizadas e montadas com Permount® (Fisher Scientific, Fair Lawn, USA). A tabela 4 demonstra a sequência de desidratação e diafanização.

Tabela 4: Desidratação e Diafanização

- | |
|--|
| - 1- passar rapidamente no álcool 85% |
| - 2- passar rapidamente no álcool 95% |
| - 3- passar por 5 minutos no álcool absoluto I |
| - 4- passar por 5 minutos no álcool absoluto II |
| - 5- passar por 5 minutos no álcool absoluto III |
| - 6- passar por 2 minutos no Xilol I |
| - 7- passar por 2 minutos no Xilol II |

Indica passos seqüenciais para a desidratação de diafanização das amostras. Os dois últimos banhos em Xilol tiveram o objetivo de diafanisar a peça (clarear) das amostras, facilitando a análise posterior.

A análise desses resultados foi realizada pela contagem de células marcadas e não marcadas. Essas contagens foram feitas através da captura de

imagens por um microscópio óptico (Nikon, Eclipse E-1000) - localizado no laboratório de Histologia dessa Universidade (PUCRS) e analisados pelo programa de imagem *Image Pro Plus Versão 4.1* para *Windows®*.

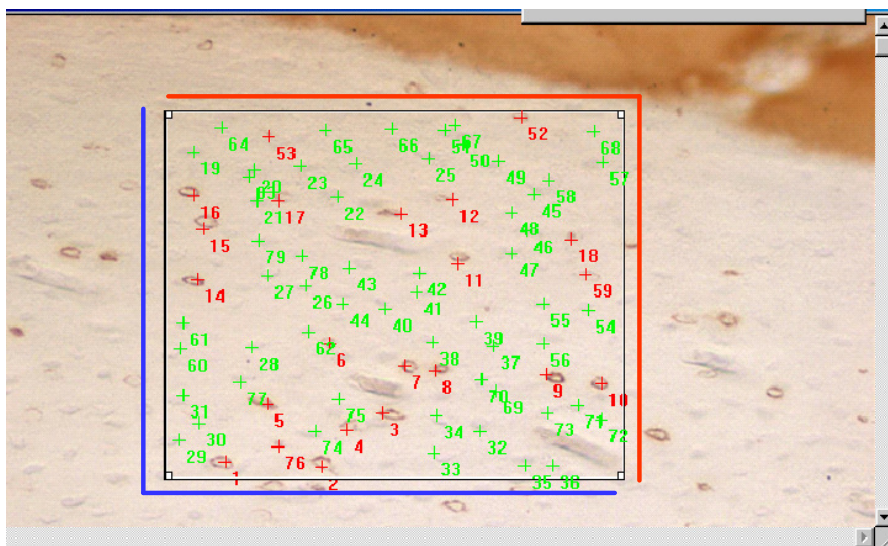


Figura 10: Imagem do programa de computador utilizado para a marcação e contagem das células imunomarcadas.

3.1.5.7 Análise estatística

As médias e desvio padrão foram utilizados para os testes de significância o teste t-student. Para os testes não-paramétricos, que são mais adequados devido ao pequeno número de dados, utilizou-se o teste de Mann-Whitney U-test, onde valores de $p < 0,05$ foram considerados como indicativos de significância (MASSART et al, 1988).

3.1.6 Estudo para a avaliação em diferentes tempos da associação de biomateriais com resveratrol através da injeção de marcadores de fluorescência

Foram utilizados para este estudo seis (6) coelhos New Zeland, de ambos os sexos.

3.1.6.1 Divisão dos grupos

Os animais foram divididos em três grupos que seguem, sendo executado um leito cirúrgico para cada uma das tíbias do animal, a fim de excluir uma possível ação sistêmica do resveratrol:

- Grupo Controle 1 (**GC1**): nesse grupo o leito cirúrgico foi preparado, não sendo utilizado nenhum material para seu preenchimento, somente o coágulo;
- Grupo Controle 2 (**GC2**): foi utilizado para preenchimento do leito cirúrgico somente com osso bovino inorgânico;
- Grupo experimental 1 (**GE1**): foi utilizado para preenchimento do leito cirúrgico com osso bovino inorgânico adicionado em 60% de resveratrol em relação ao seu peso.

Os leitos preparados foram divididos e numerados da seguinte maneira, sendo que cada tíbia recebeu 1 (um) leito cirúrgico na sua porção interna, a uma distância de 10 mm da articulação da região proximal:

Leito 1 – Leito na porção mais proximal da tíbia direita

Leito 2 – Leito na porção mais proximal da tíbia esquerda

Os grupos controle (**GC1** e **GC2**) foram feitos nos mesmos animais, pois não apresentavam resveratrol. Os outros três animais receberam em ambas as tíbias o grupo experimental (**GE1**).

3.1.6.2 Protocolo cirúrgico experimental

Seguiu os mesmos procedimentos descritos anteriormente no item 3.1.4.3. Além desses passos, durante o período de acompanhamento e avaliação foram injetados marcadores ósseos seguindo o protocolo descrito por König Jr. et al (1998), na seguinte sequência (Tabela 5):

Tabela 5: Seqüência de injeção de marcadores ósseos

Tempo (dias)	Substância	Doses (mg/Kg)	Injeção
14	Alizarina (C ₁₄ H ₈ O ₄)	30	3g/100ml+2g Na ₂ HPO ₄
21	Alizarina (C ₁₄ H ₈ O ₄)	30	3g/100ml+2g Na ₂ HPO ₄
28	Calceína (C ₃₀ H ₂₆ N ₄ O ₁₃)	10	1g/100ml+2g Na ₂ HPO ₄
35	Calceína (C ₃₀ H ₂₆ N ₄ O ₁₃)	10	1g/100ml+2g Na ₂ HPO ₄
42	Tetraciclina	60	6g/100ml+2g Na ₂ HPO ₄
49	Tetraciclina	60	6g/100ml+2g Na ₂ HPO ₄
56	Eutanásia		

Todos os animais foram submetidos à eutanásia com injeção intracardíaca de 5ml de cloreto de potássio a 10% após 56 dias da cirurgia e, ambas as tíbias foram removidas.

3.1.6.3 Processamento Histológico

a) Soluções Fixadoras

Com a intenção de preservar o máximo possível das características do interior do tecido ósseo, as amostras foram imediatamente após a sua remoção colocada em solução de formol tamponado. Após um período de 7 dias essas foram passadas para uma solução de etanol 70%, sugerido por Yang *et al.* (2003).

Nesse trabalho, a temperatura para fixação do material foi estipulada em 4°C, em geladeira, por um período de tempo de 7 dias. Terminado esse período, as amostras foram lavadas em água corrente em temperatura ambiente durante 24 horas e encaminhadas para a desidratação.

b) Desidratação

Seguiram-se os procedimentos descritos no item 3.1.5.5 na página 55.

c) Embebição e Inclusão

Seguiram-se os procedimentos descritos no item 3.1.5.5 na página 56.

d) Polimerização

Seguiram-se os procedimentos descritos no item 3.1.5.5 na página 58.

e) Corte e Polimento

Seguiram-se os procedimentos descritos no item 3.1.5.5 na página 58.

3.1.6.4 Histomorfometria

O processo de contagem de pontos foi realizado conforme Schenk & Olah (1980). Esse método é considerado um procedimento adequado a ser utilizado em colorações escuras, sendo desse modo evitados os problemas com a quantidade da imagem e o contraste, entre a coloração dos diferentes estágios de calcificação e enxerto. Para a avaliação dos resultados foram obtidas imagens das lâminas estudadas.

3.1.6.5 Análise quantitativa

A análise dos resultados dos diferentes grupos propostos para a avaliação em distintos períodos da neoformação do tecido ósseo de cada sítio foi feita pela avaliação das diferentes colorações obtidas pela injeção dos marcadores de fluorescência propostos.