

**Universidade Federal do Triângulo Mineiro**

**Karla Roberta Martins Pucci**

**INTERAÇÃO DE REACÃO DE CORPO ESTRANHO E MECANISMOS DE  
OSTEOGÊNESE.**

**Uberaba – MG**

**2018**

Karla Roberta Martins Pucci

**INTERAÇÃO DE REACÇÃO DE CORPO ESTRANHO E MECANISMOS DE  
OSTEOGÊNESE.**

Tese apresentada ao Programa de pós-graduação em ciências da Saúde, área de concentração “Patologia Básica e experimental”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

**Orientador:** Prof. Dr. Lenaldo Branco Rocha

**Coorientadora:** Prof. Dra. Camila Lourencini Cavellani

**Uberaba – MG**

**2018**

## **Ficha catalográfica**

### **Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro**

P971i Pucci, Karla Roberta Martins  
Interação de reação de corpo estranho e mecanismos de osteogênese /  
Karla Roberta Martins Pucci. -- 2018.  
76 f. : il., fig., graf.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)-- Universidade Federal do  
Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2018  
Orientador: Prof. Dr. Lenaldo Branco Rocha  
Coorientadora: Profa. Dra. Camila Lourencini Cavellani

1. Osteogênese. 2. Células gigantes de corpo estranho. 3. Regeneração  
óssea. 4. Macrófagos I. Rocha, Lenaldo Branco. II. Universidade Federal  
do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 611.018.4

Karla Roberta Martins Pucci

**INTERAÇÃO DE REACÇÃO DE CORPO ESTRANHO E MECANISMOS DE  
OSTEOGÊNESE.**

Tese apresentada ao Programa de pós-graduação  
em ciências da Saúde, área de concentração  
“Patologia Básica e experimental”, da  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro  
como requisito parcial para obtenção do título  
de Doutor.

\_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Lenaldo Branco Rocha  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

---

Profa. Dra. Daniela Cristina Carvalho de Abreu  
Universidade de São Paulo

---

Profa. Dra. Sanívia Aparecida de Lima Pereira  
Universidade de Uberaba

---

Profa. Dra. Luciane Fernanda Rodrigues Martinho Fernandes  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

---

Profa. Dra. Lislei Jorge Patrizzi Martins  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

## **AGRADECIMENTOS**

Ào orientador, Lenaldo Branco Rocha, pelas orientações e pela grande ajuda para finalização deste trabalho.

Aos professores Vicente de Paula Antunes, Marlene Antônia Reis, e Rosana Rosa Guimarães Correa, Camila Lourencini Cavellani pelos momentos que contribuíram para o meu crescimento e ensino para toda a vida.

Aos professores do Departamento de Imunoparasitologia, em especial ao Prof. Dr. Carlos José Freire de Oliveira, ao Mestrando Jonatas da Silva Catarino, pelas orientações e uso do laboratório para as análises que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos colegas do Curso de Pós-graduação em Patologia, aos alunos de iniciação científica, em especial à graduanda de Enfermagem Brena Elisa de Paula e aos funcionários da Disciplina de Patologia Geral da UFTM, pela troca de experiências ao longo desses anos, mostrando a importância do trabalho em conjunto.

Aos animais experimentais.

A todos, que de certa forma, contribuíram para a realização desse trabalho, muito obrigada.

A Deus.

“Que ninguém se engane,  
só se consegue a simplicidade  
através de muito trabalho.”

Clarice Lispector

## **APOIO FINANCEIRO**

O presente trabalho foi realizado com os recursos financeiros da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## RESUMO

**Introdução:** O reparo ósseo exige várias abordagens de tratamento inclusive com uso de material não absorvível. É necessária maior compreensão em regeneração óssea, tratamento de fraturas e osteogênese. Células do sistema imunológico e ósseo têm uma interação dinâmica de tal modo que cada sistema influencia o percurso e funcionalidade um do outro.

**Materiais e métodos:** Estudo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Experimentação Animal em 11/04/2014, parecer N<sup>o</sup> 304. Foram utilizados 36 camundongos, machos, isogênicos, com 2 meses de idade. Foram realizados dois procedimentos cirúrgicos no mesmo animal: um com ablação de medula óssea (GC-grupo controle) e outro com ablação de medula óssea e implante de material não absorvível (GE-grupo experimento). Vinte e seis camundongos foram eutanasiados em 3, 7, 15 e 30 dias para estudo morfológico – volume ósseo neoformado e fibras colágenas. Dez camundongos foram eutanasiados em 15 e 30 dias para estudo RT-qPCR.

**Resultados:** Os camundongos do GC apresentaram volume ósseo (Vv%) significativamente maior que o grupo experimento (GE) principalmente no 15<sup>o</sup> dia de pós operatório (DPO). O GE apresentou maior volume ósseo no 30<sup>o</sup> DPO, com diferenças significativas, em relação ao terceiro e sétimo dia. Para a análise de fibras colágenas, o GE apresentou maior porcentagem de fibras colágenas em relação ao GC, principalmente no 7<sup>o</sup> DPO em relação ao 3<sup>o</sup>. O GC mostrou maior porcentagem no 7<sup>o</sup> DPO mas com diminuição a níveis próximos do normal no 30<sup>o</sup> DPO. O RT-qPCR mostrou maior expressão de TNF $\alpha$  para o GE no 15<sup>o</sup>, 30<sup>o</sup> DPO e no GC no 30<sup>o</sup> DPO. A IL-10 mostrou maior expressão em 15<sup>o</sup> DPO no GC e GE em relação ao GC e GE do 30<sup>o</sup> DPO. IL-33 apresentou maior expressão de mRNA nos GC de 15 e 30 DPO em relação ao GE no mesmo tempo. INF- $\gamma$ , IL-4 e IL-17A, não apresentaram expressão para 15 e 30 DPO nos GC e GE.

**Conclusão:** Há um atraso na formação óssea do GE, maior porcentagem de colágeno nesse grupo e aumento da expressão do TNF- $\alpha$ , causado pela reação de corpo estranho.

**Palavras chave:** osteogênese, células gigantes de corpo estranho, regeneração óssea, macrófagos.



## ABSTRACT

**Introduction:** Bone repair requires several treatment approaches including the use of material não absorvível s. Further understanding is needed in bone regeneration, fracture treatment and osteogenesis. Cells of the immune and bone system have a dynamic interaction in such a way that each system influences the path and functionality of each other. **Materials and methods:** Study approved by the Ethics Committee on Research and Animal Experimentation on 04/11/2014, opinion No. 304. Thirty-six male, isogenic mice, 2 months old, were used. Two surgical procedures were performed in the same animal: one with bone marrow ablation (GC-control group) and one with bone marrow ablation and implantation of non-absorbable material (GE-experimental group). Twenty-six mice were euthanized at 3, 7, 15 and 30 days for morphological study - neoformed bone volume and collagen fibers. Ten mice were euthanized at 15 and 30 days for RT-qPCR study. **Results:** The CG mice presented significantly higher bone volume (V%) than the experimental group (SG), mainly on the 150 postoperative day (DPO). The SG presented higher bone volume in the 300 DPO, with significant differences in relation to the third and seventh day. For the analysis of collagen fibers, the GE showed a higher percentage of collagen fibers in relation to the CG, mainly in the 70 DPO in relation to the 30. The GC showed a higher percentage in the 70 DPO but with a decrease in near-normal levels in the 300 DPO. RT-qPCR showed higher TNF $\alpha$  expression for GE in 150,300 DPO and in GC in 300DPO. IL-10 showed higher expression in 150 DPO in GC and GE compared to GC and GE of 300 DPO. IL-33 showed higher mRNA expression in the GCs of 15 and 30 DPO relative to GE at the same time. INF $\gamma$ , IL-4 and IL-17A, had no expression for 15 and 30 DPO in GC and GE. **Conclusion:** There is a delay in EG bone formation, a higher percentage of collagen in this group and an increase in TNF- $\alpha$  expression caused by foreign body reaction.

**Keywords:** Giant Cells, Foreign-Body, osteogenesis, bone regeneration, macrophages.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 01.** Esquema representativo e foto do osso tibial do grupo controle com ablação de medula óssea e do grupo experimento com ablação de medula óssea e implante de \*fio de algodão .....39

**Figura 02.** Fotomicrografia do aspecto histológico do osso tibial no grupo controle com ablação de medula óssea e no grupo experimento com ablação de medula óssea e implante de fio de algodão com 3, 7, 15 e 30 dias após a cirurgia. Osso recentemente formado (O), infiltração de células inflamatórias (\*), adipócitos (seta dupla), córtex (colchete), fio de algodão (A), osteoblasto (cabeça da seta), debri ( $\Delta$ ), vascularização (V), tecido de granulação (TG), megacariócitos (M), osteoclasto (OC), coágulo (H). A seta na figura F e H indicam células gigantes de corpo estranho. Barra representa 100  $\mu$ m. Coloração Hematoxilina e eosina .....45

**Figura 03.** Fotomicrografia do aspecto histológico do osso tibial no grupo controle com ablação de medula óssea e no grupo experimento com ablação de medula óssea e implante de fio de algodão com 3, 7, 15 e 30 dias após a cirurgia. Osso recentemente formado (O), adipócitos (seta dupla), córtex (colchete), fio de algodão (A), debri ( $\Delta$ ), tecido de granulação (TG). Barra representa 100  $\mu$ m. Coloração Picro Sirius .....46

**Figura 04.** Análise do volume ósseo neoformado após coloração em hematoxilina/eosina representadas pelas figuras A, B e C realizada através da estereologia de acordo com o princípio de Delesse; e Coloração Picro Sirius para tecido conectivo colágeno em D, E e F. GC ablação de medula. Ablação de medula óssea com implante de fio de algodão em GE. Vv% = percentual ósseo neoformado, % de área = porcentagem da área de fibras colágenas. Em A e E, Kruskal Wallis teste seguido de Dunn múltiplas comparações. Em B e D Anova seguido de tukey. T test em C e F. DPO = dias pós-operatório. \*Nível de significância,  $p < 0.05$ .  $M \pm SD$  .....49

**Figura 05.** Expressão relativa mRNA de citocinas em medula óssea de camundongos machos de dois meses de idade, livre de patógenos externos, para grupo controle com ablação de medula óssea e para grupo experimento com ablação de medula óssea e implante de fio de algodão intramedular. Mann Whitney test. \*Nível de significância,  $p < 0.05$ .  $M \pm SD$ .....50

## LISTA DE ABREVIATURAS

TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral Alfa

TNFR: Receptor Fator de Necrose Tumoral

G-CSF: fator de estimulação das colônias de granulócitos

MCSF: fator de estimulação das colônias monocítica

GM-CSF: fator de estimulação de colônias de granulócitos e macrófagos

IL: interleucina

TGF- $\beta$ : Fator transformante de crescimento beta

TGF- $\beta$ R: Receptor de Fator transformante de crescimento

LIF: fator inibidor da leucemia

SCF: fator de células-tronco

Runx2: Fator de transcrição relacionado com Runt dois

Osx: Fator de transcrição osterix

CD: células dendríticas

PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos

TLR: receptores *toll Like*

MSCs: Células tronco meesenquimais

Wnt: vias de sinalização de transdução de sinal Wingless

Ihh: gene *Indian hedgehog homolog*

BMP: Proteína morfogenética óssea

SOX-9: Fator de transcrição SOX-9

IGF: Fator de crescimento derivado de insulina

FGF: Fator de crescimento de fibroblasto

FGFR: Receptor de fator de crescimento de fibroblasto

PTHrP: proteína relacionada ao hormônio da paratireóide

PTH: Hormônio da paratireoide

RANK: receptor ativador do fator nuclear kapa  $\beta$

RANKL: ligante do receptor do fator nuclear kapa  $\beta$

OPG: Osteoprotegerina

VEGF: Fator de crescimento endotelial e vascular

OB: Osteoblasto

OC: Osteoclasto

Th: célula T helper humana

Tregs: células T reguladoras

TCD8: célula T citotóxica

TCD4: célula T auxiliar

NK: célula natural *Killer*

TCD45: célula T de memória

FOXP3: células T reguladoras

Ty $\delta$ : células T gama-delta

iNK: células natural *killer* invariantes

NKT: Natural *killer* T

LTi: células indutoras de tecido linfóide

CCL: quimiocinas ligando

CCR: quimiocina receptor

INF- $\gamma$ : interferon gama

APCs: células apresentadoras de antígeno

DCs: células dendríticas

NF- $\kappa\beta$ : Fator nuclear kappa-beta

FBGC: célula gigante de corpo estranho

FBR: reação corpo estranho

MAPKs: *mitogen activated protein kinase* – proteína quinase ativada por mitógeno

LPS: Lipopolissacarídeo ou lipoglicano

Cr-Co: Carbonato de cromo

PMMA: polimetilmetacrilato

PGE2: prostaglandina E2

CaR: receptor de cálcio

EGF-TM7: fator transmembranar de crescimento epidermal sete

mg: microgramas

ng: nanogramas

Kg: quilogramas

ml: mililitro

cm: centímetro

EDTA: ácido etilonodiaminotetracético

g: gramas

NaOH: hidróxido de sódio ( soda cáustica)

µm: micrômetro

µL: microlitros

EUA: Estados Unidos da América

USA: United States of America

×g: unidade de gravidade (tempos de gravidade) relação entre RPM x RCF

°C: escala de grau Celsius

CT: *Cycle Threshold*

CEUA: comissão ética no uso de animais

RNA: Ácido Ribonucléico

mRNA: Ácido Ribonucléico mensageiro

qPCR: Reação em Cadeia Polimerase em tempo real

RT-qPCR: Transcrição reversa quantitativa de reação em cadeia da polimerase.

cDNA: Ácido Desoxirribonucleico complementar

GC: grupo controle

GE: grupo experimento

DPO: dias de pós-operatório

ATP: Trifosfato de adenosina

MHC: complexo principal de histocompatibilidade

iNOS: Óxido nítrico sintase isoforma indutível, envolvida na resposta imune.

COX\_2: *prostaglandin-endoperoxide synthase 2*

MCP-1: proteína quimiotática de monócitos-1

MIP-1 $\beta$ : Proteína Inflamatória de Macrófago-1 $\beta$

PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas

MMPs: metaloproteinases

CIA: artrite induzida por colágeno

PLA2: enzima fosfolipase A2

HMGB1: *High mobility group box 1 protein*

RAW264.7: tipo de linhagem de macrófago

PRR: receptor de reconhecimento padrão - Pattern recognition receptors (PRRs)

## SUMÁRIO

<b>1.0 INTRODUÇÃO</b>	
<b>2.0 Tecido ósseo</b>	16
2.1 Sinalização molecular na osteogênese	17
2.2 Mediadores inflamatórios e osteogênese	24
2.3 Tratamento das fraturas	32
2.4 O mecanismo biológico de reparo ósseo associado aos materiais	33
2.5 Reparo ósseo após ablação de medula óssea	35
<b>2.0 HIPÓTESE</b>	37
<b>3.0 OBJETIVO</b>	37
3.1 Objetivo geral	37
3.2 Objetivo específico	37
<b>4.0 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	
4.1 Animais	38
4.2 Procedimento cirúrgico	38
4.3 Cuidados pós operatórios	39
4.4 Coleta do material	39
4.5 Processamento do material	40
4.6 Análises:	
4.6.1 <i>Histomorfológica</i>	40
4.6.2 <i>Volume ósseo</i>	41
4.6.3 <i>RT qPCR</i>	41
4.7 Análise estatística	43
4.8 Aspectos éticos	43
<b>5.0 RESULTADOS</b>	
5.1 Da análise histomorfológica	44
5.2 Do volume ósseo	48
5.3 Da análise colágeno intramedular	48
5.4 Da análise RT-qPCR	51
<b>6.0 DISCUSSÃO</b>	51
<b>7.0 CONCLUSÃO</b>	66
<b>8.0 REFERÊNCIAS</b>	67
<b>9.0 ANEXOS</b>	
Anexo A – Parecer do CEUA	75
Anexo B – Artigo submetido a revista	77

## INTRODUÇÃO

### 1.1 Tecido ósseo

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo mineralizado com função de sustentação e proteção do corpo humano, que tem em sua matriz extracelular constituintes orgânicos e inorgânicos. A parte inorgânica do osso, que constitui cerca de 70% de seu peso, é composta principalmente por cálcio e fósforo juntamente com outros componentes, incluindo bicarbonato, citrato, magnésio, sódio e potássio. O cálcio e o fósforo existem basicamente sob a forma de cristais de hidroxiapatita ( $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]\text{Ca}(\text{OH})_2$ ), mas o fosfato de cálcio também está presente sob a forma amorfa.

O componente orgânico da matriz óssea, que constitui aproximadamente 30% do peso do osso, é composto principalmente por colágeno do tipo I (GARTNER, 2007) e por células osteogênicas que estão presentes nas superfícies interna e externa dos ossos, constituindo o endóstio e o perióstio, respectivamente. As células osteoprogenitoras localizam-se na camada celular interna do perióstio, revestindo os canais de Havers e no endóstio. Estas células são mais ativas durante o período de crescimento ósseo. Os canais de Havers contêm vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nervos e tecido conjuntivo. Distribuídos por toda matriz óssea existem minúsculos espaços chamados osteoplastos contendo osteócitos (DATTA et al., 2008). Os osteócitos são células reguladoras do metabolismo mineral que coordenam a atividade de osteoblastos e osteoclastos em resposta a estímulos mecânicos (LOI et al., 2016). As células osteoprogenitoras são provenientes de células tronco mesenquimais (MSCs) (DA SILVA MEIRELLES; CHAGASTELLES; NARDI, 2006; LOI et al., 2016). Os osteoblastos, provenientes das células osteoprogenitoras, são células cubóides organizadas em camada contínua sobre o endóstio e perióstio e são responsáveis pela osteogênese, secretando a matriz óssea orgânica e induzem a mineralização (HARADA; RODAN, 2003). As células primárias da linhagem dos osteoblastos demonstram produzir além de Fator de Necrose Tumoral Alfa ( $\text{TNF-}\alpha$ ), fator de estimulação das colônias de granulócitos (G-CSF) e



monocítica (MCSF), GM-CSF, IL-1, IL-6, linfotóxina, TGF- $\beta$ , fator inibidor da leucemia (LIF) e fator de células-tronco (SCF), que desempenham papel na hematopoiese e no desenvolvimento de osteoclastos (JAL, 2008; ZUPAN; JERAS; MARC, 2013). Fatores de transcrição como (Runx2) e osterix (Osx) são necessários para a diferenciação de osteoblastos (NAKASHIMA, K. et al., 2002). Durante a fase final de remodelação óssea, os osteoblastos sofrem apoptose ou são incorporados a matriz óssea como osteócitos (MARIE; KASSEM, 2011). Quando estas células ficam envoltas pela matriz, elas se tornam quiescentes e são denominadas osteócitos (GARTNER, 2007).

Os osteoclastos são células de origem hematopoiética e reabsorvem a matriz óssea através de dissolução e descalcificação ácida proteolítica (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003). Os progenitores mielóides para osteoclastos também podem se diferenciar em células dendríticas (CD) e macrófagos, sugerindo a estreita relação de osteoclastos com as células do sistema imune inato (CHARLES et al., 2012; JACOME-GALARZA et al., 2013). Estímulos clássicos para células imunes inatas também regulam diretamente a diferenciação dos osteoclastos. Por exemplo, os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) podem regular os osteoclastos dependendo do estágio de diferenciação destes, através de receptores *toll Like* (TLR) aumentando a sobrevivência de osteoclastos maduros. Os osteoclastos são regulados por vários outros receptores imunes inatos e são capazes de iniciar a remodelação e mobilização de cálcio do osso em resposta a sinais microambientais. Assim, pode-se argumentar que os osteoclastos são células imunes inatas do osso (WU, Y.; HUMPHREY; NAKAMURA, 2008). O remodelamento ósseo ocorre continuamente para se adaptar às mudanças na carga e para substituir o osso danificado (CHARLES; NAKAMURA, 2014).

## **1.2 Sinalização molecular na osteogênese:**

O osso é gerado por dois processos distintos durante a fase embrionária e pós-natal: a ossificação endocondral e a intramembranosa. No processo de ossificação endocondral, um

arcabouço cartilaginoso é formado pela condensação de células tronco mesenquimais (MSCs), que se diferencia em condrócitos. Os condrócitos sofrem maturação, atrofia e apoptose através de um mecanismo organizado. Seguindo a apoptose dos condrócitos, condroclastos irão invadir a matriz cartilaginosa para sua reabsorção (KRONENBERG, 2003). Na ossificação intramembranosa, as MSCs formarão condensações que irão mineralizar a matriz de colágeno sem precisar do intermediário cartilaginoso (HALL; MIYAKE, 1992). A progressão e diferenciação das MSCs são guiadas por vias de sinalização, que são relevantes para a cura da fratura. Ossificação endocondral e intramembranosa compartilham os mesmos fatores de transcrição, vias de sinalização molecular e fatores de crescimento, incluindo fator de transcrição Runx2, Wingless (Wnt), Indian hedgehog (Ihh) e proteína morfogenética do osso (BMP) (RUNYAN; GABRICK, 2017).

O fator de transcrição pró-osteogênico (Runx2) é expresso em pré-osteoblastos e nas condensações de células mesenquimais e na cartilagem imatura (DUCY; KARSENTY, 1998; RUNYAN; GABRICK, 2017) e em osteoblastos. Os ratos que não expressam Runx2 não apresentam osteoblastos e também exibem anormalidades da maturação de condrócitos (KOMORI et al., 1997; KRONENBERG, 2003; OTTO et al., 1997). Sox9 (SRY [região determinante do sexo Y]), importante fator de transcrição condrogênico, é essencial para o desenvolvimento da cartilagem. Juntos Runx2 e Sox9 são fatores de transcrição reguladores específicos da osteogênese e condrogênese, respectivamente. Os efeitos pró-osteogênicos do Runx2 no osso intramembranoso são mediados pela sinalização Wnt. A ativação da via Wingless (Wnt) promove a especificidade da linhagem osteogênica e reprime a linhagem condrogênica (GOODNOUGH et al., 2014; ISHII et al., 2015; RUNYAN; GABRICK, 2017; TRAN et al., 2010).

Sox9 é um fator de transcrição que promove a expressão de genes que produzem colágeno Coll II, Coll IX, Coll XI, que gera matriz extracelular (RUNYAN; GABRICK, 2017). É expresso em condensações de células mesenquimais e em condrócitos proliferantes,

mas não em condrócitos hipertróficos. Em células cultivadas, Sox9 estimula a transcrição de genes da matriz de cartilagem, incluindo Col2a1, Col11a2 e aggrecan (KRONENBERG, 2003). Dentro da cartilagem imatura, condrócitos dividem-se rapidamente e permanece indiferenciado. O estímulo para a proliferação de condrócitos são as proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) 2 e 4. Dentro da cartilagem Sox9 estimula fatores pró condrogênicos Sox5, e Sox6, que, em conjunto, evitam que os condrócitos amadureçam e sofram hipertrofia. A maturação de condrócitos pré-hipertróficos para hipertróficos, além de invasão vascular e ativação de marcadores ósseos, requer sinalização Hedgehog.

O gene Hedgehog é conservado evolutivamente em mamíferos e seus homólogos incluem Sonic, Desert e Indian hedgehog (Ihh). É expresso por condrócitos pré hipertróficos acelerando sua hipertrofia e promovendo diferenciação dos osteoblastos (KRONENBERG, 2003); ativando fatores de transcrição Runx2, que então ativa Osterix; para formar o osso. Indian hedgehog (Ihh) diminui a atividade de BMP2, o que leva à diminuição da expressão de Sox5, Sox6, Sox9 e Coll II (RUNYAN; GABRICK, 2017). Nas ossificações intramembranas Ihh é expresso na borda do osso em crescimento, promovendo formação óssea via BMP-2 e BMP-4 por diferenciação osteogênica direta ao invés de proliferação. Sua perda resulta em formação de osso diminuída (RUNYAN; GABRICK, 2017).

A sinalização da proteína morfogenética do osso BMP, também chamadas de fatores de crescimento e diferenciação (GDF), têm múltiplos papéis durante a formação óssea. As BMPs são importantes durante os estágios de desenvolvimento da cartilagem. BMP 2, -3, -4, -5 e -7 são expressos em pericôndrio, BMP 2 e -6 são expressos em condrócitos hipertróficos e BMP7 é expressa em condrócitos em proliferação. BMP 2 atrasa a diferenciação terminal de condrócitos hipertróficos, como indicado pela expressão da osteopontina. As BMPs se opõem aos efeitos da sinalização do fator de crescimento fibroblasto (FGF) para diminuir a proliferação de condrócitos e diminuir a expressão Indian hedgehog (Ihh) (KRONENBERG,

2003). A falta de sinalização BMP dentro das condensações mesenquimais no desenvolvimento de ossos por ossificação intramembranosa é comum para formação de osteoblastos, mas em fases posteriores a sinalização BMP é essencial para formação óssea. A baixa expressão da BMP-6 ocorre na transição da ossificação endocondral para intramembranoso, o que prediz suas contribuições para formação de osso endocondral (RUNYAN; GABRICK, 2017).

O fator de crescimento transformante (TGF- $\beta$ ) é produzido por muitos tipos de células, incluindo células de medula óssea, matriz óssea, osteoblastos, macrófagos e células estromais e é segregado em uma forma latente (MASSAGUE, 1990; MORI et al., 2013). TGF- $\beta$  promove a proliferação dos osteoblastos, na ossificação intramembranosa, ao mesmo tempo em que suprime sua maturação, atrasando sua diferenciação (RUNYAN; GABRICK, 2017); bloqueia a apoptose e recrutam precursores osteoblásticos produtores de matriz através de atração quimiotática. A produção de proteína de matriz óssea extracelular por osteoblastos nos estágios iniciais da diferenciação é estimulada por TGF- $\beta$  (MAEDA et al., 2004). Os estágios posteriores são regulados por proteínas da matriz óssea (BMP). Estudos indicam que o fator de transcrição Runx2 é regulado por TGF- $\beta$  e BMP-2. Na fase inicial de diferenciação osteoblástica (diferenciação de células troncos mesenquimais para células progenitoras de osteoblastos) Runx2 inibe a diferenciação de células troncos mesenquimais em outros tipos de células diferentes de osteoblastos, em ação coordenada entre Runx2 e Smad5 induzido por BMP2. Na segunda fase de sua diferenciação (de células progenitoras de osteoblastos para osteoblastos), TGF- $\beta$  induz a expressão de Runx2, que troca sinais com a sinalização beta catenina para promover diferenciação. Contudo, nos osteoblastos maduros, TGF- $\beta$  se opõe a ações de BMP-2. Smad3, ativado por TGF- $\beta$ , interage fisicamente com Runx2 e suprime sua expressão. (MORI et al., 2013; SPINELLA-JAEGLE et al., 2001).

O fator de crescimento de fibroblastos (FGF), composta por 22 genes distintos e quatro genes receptores, é expresso em condensações de células mesenquimais circundantes

(RUNYAN; GABRICK, 2017). O papel da sinalização do FGF, na ossificação endocondral, em fase inicial é estimular a expressão SOX9 em células mesenquimatosas. Os condrócitos proliferantes expressam FGFR3, condrócitos pré hipertróficos / hipertróficos expressam FGFR1 e células pericondrais expressam FGFR2. Estudos in vitro, nos quais os níveis de Ihh e PTHrP podem ser regulados de forma independente, apoiam a ideia de que parte dos efeitos da sinalização do FGF é mediada pela supressão da expressão Ihh. Fator de crescimento derivado da insulina-1 (IGF) e FGF-2 promovem a diferenciação dos osteoblastos antes da diminuição de sua expressão durante a consolidação (RUNYAN; GABRICK, 2017). FGF18 é essencial na formação de OB maduro (MORI et al., 2013).

A tríade molecular RANK / RANKL / osteoprotegerina (OPG) e caracterização do seu papel na interação entre células imunes e ósseas, contribuí para a osteoimunologia. O RANKL, um membro da superfamília do TNF, é um potente estimulador da formação de osteoclastos e a sua atividade de reabsorção óssea. Após a ligação com seu receptor, RANK localizado em osteoclastos, a sinalização RANKL aumenta a diferenciação e a ativação dos osteoclastos resultando na expressão de moléculas específicas de osteoclastos. Embora tenha sido proposto por um longo período de tempo que a principal fonte de RANKL são células estromais e osteoblásticas, estudo recente de Nakashima et al. (NAKASHIMA, T. et al., 2011) provou que o principal local de produção de RANKL reside nos osteócitos. OPG é um membro da superfamília do receptor de TNF. É produzido por uma variedade de células, incluindo células do estroma, linfócitos B e células dendríticas. Os ratos knockout RANK ou RANKL têm uma osteopetrose significativa. Em contraste, os animais que não possuem OPG desenvolvem osteoporose severa devido ao aumento da osteoclastogênese. Fatores osteoclastogênicos, incluindo hormônios, citocinas e fatores de crescimento, que são produzidos fisiologicamente ou na inflamação, exercem sua atividade primária em osteoclastos, modulando o Eixo RANK / RANKL / OPG. Após a ativação, as células T produzem as citocinas RANKL e influenciam a osteoclastogênese (ZUPAN et al., 2013). O

sistema RANKL / OPG é um o regulador-chave para a renovação óssea equilibrada na cura de fraturas. Na cicatrização de fratura, uma alta expressão de RANKL / OPG promove osteoclastogênese. Na ossificação intramembranosa, RANKL / OPG aumentam gradativamente durante o início da fratura e alcança picos de maior expressão em 3 a 4 semanas na fase de consolidação. A ativação de osteoclastos pelo TNF- $\alpha$  ocorre durante a remodelação da fratura; no entanto, não é expresso na fase inicial da ossificação intramembranosa. Os níveis de osteocalcina aumentam gradativamente na fase inicial de ossificação intramembranosa até atingir níveis normais no final da consolidação. A osteocalcina é expressa por osteoblastos maduros e promove a mineralização (RUNYAN; GABRICK, 2017).

Entre os membros da família do fator de crescimento endotelial e vascular, VEGF A, B, C, D, apenas o VEGF-A, neuropilina (um Receptor VEGF) e HIF-1 $\alpha$  mostram alta expressão na ossificação intramembranosa em comparação com a cura da fratura. O fator de crescimento endotelial vascular-D é brevemente expresso durante o período inicial da fratura. O VEGF-A é expresso em osteoblastos e osteoclastos amadurecidos, guiando a angiogênese na região de ossificação. Bloqueio parcial da sinalização de VEGF em um modelo tibial resultou no bloqueio da ossificação intramembranosa, mas permite a condrogênese, enquanto o bloqueio completo da sinalização VEGF inibe a osteogênese e a condrogênese. Morgan et al. (MORGAN et al., 2012) mostraram que períodos de angiogênese e osteogênese intensa são simultâneos (RUNYAN; GABRICK, 2017). Na cura das fraturas, a formação de novos vasos ocorre junto com o calo externo e está associado à transição cartilagem-osso. Na ossificação intramembranosa, a formação de novos vasos são intra medulares (RUNYAN; GABRICK, 2017).

A regeneração óssea pós trauma é um processo pós-natal que recapitula eventos celulares e moleculares do desenvolvimento esquelético embrionário. Esses processos fazem

com que a fratura cicatrize e regenere, restaurando a composição, estrutura e função biomecânica do órgão esquelético danificado. Todas as vias morfogenéticas primárias que são ativas durante o desenvolvimento esquelético embrionário são expressas no processo de reparo da fratura (EINHORN; GERSTENFELD, 2015). Portanto, as vias de osteogênese, tanto endocondral quanto intramembranosa são parte integrante do reparo de defeitos ósseos, osteogênese de distração, reparo de fraturas e fixação de implante (FORRIOL et al., 2010; GRIMES et al., 2011). Mesmo no reparo ósseo, que é caracterizada pela formação óssea endochondral, o osso intramembranoso se forma logo após a lesão inicial e é uma parte essencial para a formação do calo ósseo (MARSELL; EINHORN, 2011).

Logo após a lesão, um hematoma é formado e será infiltrado por células inflamatórias graças à secreção de citocinas e fatores de crescimento (XIE et al., 2008). Em modelos murinos, fator de necrose tumoral  $\alpha$  e IL-6 são produzidos no local de fratura dentro de 24 horas após a lesão e estão implicados no recrutamento e diferenciação de células mesenquimais progenitoras para promover a cicatrização óssea (GLASS et al., 2011; YANG, X. et al., 2007). A inflamação deve ser rigorosamente controlada, um papel fundamental para citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 (KANG et al., 2007). No campo da osteoimunologia, os sistemas imunes inato e o adaptativo demonstram regular o tecido ósseo, e existe uma intensa troca entre células ósseas e imunes (DANKS; TAKAYANAGI, 2013). Na ausência de linfócitos, a cicatrização da fratura é acelerada. Os macrófagos tem um papel vital na regulação da inflamação e formação óssea (GUIHARD et al., 2015). Os macrófagos são um dos primeiros tipos de células que invadem no hematoma e estão presentes ao longo do processo de cura (ALEXANDER et al., 2011; ONO; TAKAYANAGI, 2017; WU, A. C. et al., 2013). A lesão óssea provoca uma resposta inflamatória aguda benéfica quando regulada por fatores pro-inflamatórios e anti-inflamatórias cursando para a resolução da inflamação. No entanto, quando esses fatores são suprimidos e ou desregulados, tornam-se crônicos e podem ser prejudiciais para a cura (LOI et al., 2016).

A cura da fratura ocorre através de estágios distintos: inflamação, formação do calo ósseo, remodelação, e envolve formação óssea através de vias de ossificação endocondral e intramembranosa (PERREN, 2002; SHAPIRO, 1988) (LOI et al., 2016). Os papéis de células imunes e suas moléculas efetoras estão envolvidos na regulação do processo de cicatrização. Muitos tipos de células imunes, incluindo macrófagos e células T e B, infiltram-se no local da lesão e regulam a regeneração óssea. Citocinas como a interleucina (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e IL-17A são moléculas que regulam o processo de cicatrização. A cura tardia e a não união das fraturas são graves problemas clínicos (ONO; TAKAYANAGI, 2017).

### **1.3 Mediadores inflamatórios e osteogênese**

As interleucinas 17 A-F são expressas por um tipo de célula T helper humana (Th17) (WILSON et al., 2007). Posteriormente, demonstrou-se que essa citocina também é produzida por células TCD8<sup>+</sup>, células T $\gamma\delta$ , células tipo I ou invariantes células T assassinas naturais (iNKT), células assassinas naturais (NK), células do indutor de tecido linfático (LTi), células B e células mesenquimais. As células T $\gamma\delta$  são conhecidas por produzir IL-17A em resposta a IL-1 $\beta$ , IL-23, TLR e complemento (ONO; TAKAYANAGI, 2017). As células Th17 aumentam em resposta a expressão das citocinas TGF- $\beta$ , IL-1 e IL-6 e sofrem expansão e ativação na resposta à IL-23 (GOSWAMI et al., 2009). A sinalização IL-23 é crucial para a diferenciação, expansão e manutenção de células Th17. A sinalização de IL-6 pode induzir a expressão de IL-23R. Isso leva à ativação do STAT3. Translocação de dímeros STAT3 fosforilados para o núcleo resulta na indução de genes relacionados a Th17, como Rorc, IL17 e também IL23r. A indução de Rorc (codificando ROR $\gamma$ t) é indispensável para o desenvolvimento de células Th17. ROR $\gamma$ t é o mestre regulador de transcrição de células Th17 (BROCKMANN et al., 2017). A expressão de IL1 $\beta$  e IL23p19 é aumentada logo após a fratura. O eixo CCL20-CCR6 é conhecido como um quimioatrativo para células T produtoras



de IL-17A. Estudos recentes indicaram que CCL2-CCR2 é outro sistema quimioatrativo que podem recrutar  $T\gamma\delta$  para tumores e artrite (ONO; TAKAYANAGI, 2017). A IL-17A é induzida na fase inicial na cura da fratura óssea. Recentemente, as células  $T\gamma\delta$  mostraram ser a principal fonte de IL-17A no processo de cicatrização óssea. IL-17A promove a proliferação de células mesenquimais no tecido lesado e sua subsequente diferenciação em osteoblastos. Em ratos Knockout IL-17A<sup>-/-</sup>, a formação óssea osteoblástica é prejudicada atrasando a cicatrização óssea, mas a reabsorção óssea osteoclástica não é afetada. A IL-17A é capaz de exercer efeitos positivos e negativos na osteoblastogênese, dependendo dos tipos de células alvo: efeitos positivos sobre células mesenquimais imaturas, incluindo MSCs, mioblastos e células mesenquimais no local da lesão óssea; efeitos negativos em pré-osteoblastos na calvária. Considerando o fato de que IL-17A é altamente induzida no período imediatamente após fratura, esta citocina regula positivamente a fase inicial da osteoblastogênese (ONO; TAKAYANAGI, 2017). As células Th17 promovem a osteoclastogênese através da produção de IL-17, que, atua sobre os precursores de OC para induzir RANK e a expressão de RANKL em células de estroma e Osteoblastos. A IL-17 facilita a inflamação local recrutando e ativando células imunes, o que leva a uma abundância de citocinas inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-1 que aumentam a expressão de RANKL em células osteoclastogênicas e ativam as células precursoras de OC (MORI et al., 2013). IL-17A desempenha um papel crucial na proteção contra bactérias e infecções fúngicas, estimulando a produção de peptídeos antimicrobianos e recrutando neutrófilos. Contudo, a exposição excessiva ou prolongada à IL-17A induz a destruição do tecido, como é observada em encefalite e artrite (ONO; TAKAYANAGI, 2017). As células Th17 que produzem IFN- $\gamma$  são frequentemente ligadas à doença auto-imune, como a esclerose múltipla (BROCKMANN et al., 2017).

O TNF- $\alpha$  é produzido principalmente por macrófagos, células NK, mastócitos e linfócitos B e T (ZUPAN et al., 2013). Liga-se ao receptor TNFR1 (p55, codificado pelo gene *Tnfrsf1a*) sinalizando a ativação da caspase-8, fator nuclear (NF- $\kappa\beta$ ), e as proteínas cinases

ativadas por mitógenos (MAPKs), promovendo apoptose e inflamação. TNFR2 (p75, codificado pelo gene *Tnfrsf1b*) é expressa por células imunes e sua sinalização ativa NF- $\kappa$ B e MAPKs (ONO; TAKAYANAGI, 2017). Está envolvido na inflamação e na perda óssea induzida por câncer, tanto sistêmica como localmente. O aumento do TNF poderia ser um dos mecanismos responsáveis pela perda óssea pós-menopausa (MORI et al., 2013). O TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  podem ativar as células apresentadoras de antígeno (APCs), como células dendríticas (DCs), iniciando a resposta imune adaptativa. TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  estimulam as células imunes a se diferenciarem em osteoclastos. Células dendríticas podem se diferenciar em osteoclastos *in vitro* durante o início do estágio de desenvolvimento. Este processo é inibido na presença de IFN- $\alpha$  (ALNAEELI; PENNINGER; TENG, 2006; BOEHLER; GRAHAM; SHEA, 2011; SPEZIANI et al., 2007). A capacidade do TNF para aumentar a atividade osteoclastogênica do RANKL é devido a interações sinérgicas ao nível da sinalização NF- $\kappa$ B e AP-1. (CHARATCHAROENWITTHAYA et al., 2007). O TNF- $\alpha$  induz um inibidor da sinalização Wnt, DKK1, em fibroblastos sinoviais, de modo a suprimir a formação óssea na articulação artrítica (ONO; TAKAYANAGI, 2017). Na cura da fratura óssea, demonstrou-se que TNF- $\alpha$  promove a regeneração óssea. A regeneração óssea é atrasada em ratos knockout *Tnfrsf1a*<sup>-/-</sup> *Tnfrsf1b*<sup>-/-</sup>, apresentando mais cartilagem no calo e um menor número de osteoclastos. A injeção local de TNF- $\alpha$  recombinante acelera a cicatrização óssea aumentando a capacidade de resposta das células mesenquimais para quimiocinas e melhora da mineralização do calo (ONO; TAKAYANAGI, 2017). TNF- $\alpha$  é responsável pela apoptose de macrófagos aderentes ao material não absorvível (ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2008).

O interferon gama (IFN- $\gamma$ ), nos seres humanos, bloqueia a formação de OC imaturos visando sua maturação e induz apresentação do antígeno para células T levando à ativação, proliferação e produção de citocinas osteoclastogênicas, tais como RANKL e TNF- $\alpha$  (ZUPAN et al., 2013). Quando os níveis de IFN- $\gamma$  estão aumentados *in vivo*, células T ativadas produzem fatores pró-osteoclastogênicos e esta atividade supera seu efeito anti

osteoclastogênico (MORI et al., 2013; SATO et al., 1992). *In vitro* Takayanagi et al. 2000 (TAKAYANAGI et al., 2000), mostraram proteção óssea de IFN- $\gamma$ . Toda vez que nossas células T são ativadas, liberam RANKL, a molécula estimulante de osteoclastos induzindo a reabsorção óssea. Curiosamente, o IFN- $\gamma$  liga-se ao seu receptor em osteoclastos, degrada a sinalização RANKL e, assim, inibe a ativação de osteoclastos e protege os ossos de serem reabsorvidos. Esta citocina é produzida predominantemente por NK e (NKT) células envolvidas na resposta imune inata, e por linfócitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e Th1 (CTL) efetor de células T, uma vez desenvolvida a imunidade antígeno-específica (DELVES; ROITT, 2000; ZUPAN et al., 2013). Estudos demonstram que MSC podem regular a resposta imune, especialmente inibindo a resposta Th1 (AGGARWAL; PITTENGER, 2005; CHEN et al., 2010; KRAMPERA et al., 2006). O IFN- $\gamma$  produzido por células T / B / NK podem ativar os efeitos de modulação das MSC e inibir a proliferação e produção de IFN- $\gamma$  dessas células (AGGARWAL; PITTENGER, 2005; KRAMPERA et al., 2006). Em um estudo Yang et al., sugerem que altas concentrações de IFN- $\gamma$  podem ser indutoras de senescência em MSC e citocinas inflamatórias pode causar danos ao MSC (YANG, Z. X. et al., 2017).

## IL 10

A interleucina-10 (IL-10) é uma citocina relacionada estruturalmente a intéferons, que está na forma de um homodímero, em que cada monómero é uma cadeia polipeptídica que consiste em 160 resíduos de aminoácidos, tomando a estrutura de 6 hélices  $\alpha$  interconectadas. A iniciação da IL-10 é possível através da ligação ao receptor IL-10R, que é um heterodímero composto por subunidades IL-10R1 e IL-10R2 [206, 207]. O primeiro passo de ativação do receptor envolve a ligação de IL-10 à subunidade de IL-10R1, que então altera a sua conformação de modo a permitir a ligação do complexo IL-10 e IL-10R1 à subunidade IL-10R2. Neste ponto, uma cascata de transmissão de sinal intracelular é iniciada. Isso leva à ativação da tirosina quinase JAK1 (associada à subunidade IL-10R1) e TYK2 (associada à IL-

10R2). Isto, por sua vez, implica o envio do sinal celular pelos ativadores da transcrição STAT3, que após a ligação ao SBE (elementos de ligação STAT) do núcleo celular estimulam a síntese dos produtos dos genes dependentes da IL-10 (WOJDASIEWICZ; PONIATOWSKI; SZUKIEWICZ, 2014). IL-10 foi inicialmente descrita como um tipo de citocina de perfil T helper 2 (Th2) mas evidências sugeriram que a produção de IL-10 foi associada a células T (T) tolerante ou reguladora (T<sub>Reg</sub>). Sabe-se atualmente que a IL-10 é expressa por muitas células do sistema imune adaptativo, incluindo células Th1, Th2 e subtipos de Th17, T<sub>Reg</sub>, células T CD8<sup>+</sup> e células B. Também é expressa por células do sistema imunológico inato, incluindo células dendríticas (DC), macrófagos, mastócitos, células assassinas naturais (NK), eosinófilos e neutrófilos (SARAIVA; O'GARRA, 2010). A produção de IL-10 por osteoblastos promove a auto renovação de células tronco hematopoiéticas em seus nichos localizados na medula óssea (KANG et al., 2007; ZUPAN et al., 2013) A principal fonte de IL-10 na cicatrização óssea são células B de memória (Ig) M CD27<sup>+</sup> e a cultura dessas células com células T suprime a produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (ONO; TAKAYANAGI, 2017). O papel da IL-10 na remodelação óssea é inibir a reabsorção óssea e a redução da inflamação. Também pode minimizar a síntese de óxido nítrico, gelatinase e collagenase. A neutralização específica da IL-10 resulta na elevação da síntese de IL-1 e TNF-  $\alpha$ . Essas citocinas podem atuar diretamente aumentando a proliferação e atividade de células da linhagem de osteoclastos ou afetando indiretamente a produção de fatores de diferenciação de osteoclastos, como RANKL e OPG via osteoblastos / células estromais. Portanto, a IL-10 também é considerada como um importante regulador da homeostase óssea e nas condições inflamatórias. IL-10 suprime a diferenciação osteoclástica através dos várias formas. A osteoclastogênese aumentada foi observada em culturas de macrófagos de medula óssea deficientes em produção de IL-10. O mecanismo molecular desta inibição indicou que a IL-10 aumentou a expressão de osteoprotegerina (OPG) e diminuiu a expressão do ativador do receptor de NF-  $\kappa$ B ligando (RANKL) e fator estimulante de colônia-1 (CSF-1). Testes *in*

*vitro* mostrou que a IL-10 pode inibir a osteoclastogênese ao reduzir a expressão do fator nuclear das células T ativadas NFATc1. A IL-10 diminui a diferenciação osteoblástica na medula óssea através da inibição de fator de crescimento transformante beta 1 (TGF- $\beta$ 1) nos primeiros estágios da diferenciação osteogênica (ZHANG et al., 2014).

#### IL 4

A IL-4 desempenha um papel na formação da origem das respostas imunes. A produção *in vivo* de IL-4 origina de eosinófilos, mastócitos e basófilos e uma subpopulação de células T com marcadores NK, NKT e células T CD4<sup>+</sup>*naïve*. Após a ativação, as células TCD4<sup>+</sup> começam a sintetizar e secretar citocinas. As células Th do tipo 1 (células Th1) secretam IL-2, interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral (TNF), enquanto as células Th de tipo 2 (células Th2) produzem IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. A IL-4 é um polipeptídeo de 15 kD com efeitos pleiotrópicos em muitos tipos de células. O seu receptor é um heterodímero composto por uma subunidade  $\alpha$ , com afinidade de ligação de IL-4 e a subunidade  $\gamma$  comum que também faz parte de outros receptores de citocinas. A capacidade de resposta à IL-4 requer STAT6 (CHOI; REISER, 1998), fosforilação gradual da cascata IL-4R $\alpha$  / JAK1 / STAT3 / STAT6 (WOJDASIEWICZ et al., 2014), um transdutor de sinal e fator ativador de transcrição 6. Nas células T, a ligação da IL-4 ao seu receptor induz a proliferação e diferenciação em células Th2 (CHOI; REISER, 1998). A indução da expressão da citocina IL-4 aumenta a expressão de CCL1, CCL17 e CCL22, que recrutam células T reguladoras (Tregs) para suprimir a resposta inflamatória. As células dendríticas e os macrófagos são capazes de atingir um fenótipo de ativação alternativo em resposta a estímulos anti-inflamatórios, tais como IL-4, IL-10, fator de crescimento transformante- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) e corticosteróides (dexametasona ou DM, MP) levando a redução da produção de citocinas inflamatórias e respostas toleragênicas. IL-4 e IL-10 são citocinas que podem regular os efeitos do TNF- $\alpha$ . A IL-4 promove indiretamente a formação óssea, aumentando a expressão da osteoprotegerina (OPG), inibindo a osteoclastogênese (KIDO et al., 2015). A produção

excessiva e contínua de IL-4 por MSC com extravasamento para a circulação sistêmica pode comprometer a formação óssea, aumenta o risco de infecção, induz hiperplasia sinovial, e reações alérgicas (LIN et al., 2017). A IL-4 visa osteoclastos e osteoblastos, inibindo a remodelação óssea *in vivo*. Camundongos geneticamente modificados que produzem excessiva IL-4 desenvolvem osteoporose grave; os ossos reduzem a rigidez e fratura quando exposto a cargas mecânicas (MOUNTZIARIS; MIKOS, 2008). As células B podem melhorar ou oprimir a osteoclastogênese quando estimulada por citocinas Th2 ou Th1. As citocinas anti-inflamatórias como interferon IFN- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13 e IL-18, bem como TGF- $\beta$  e PTH, foram classificados como inibidores de sinalização RANKL (AGAS et al., 2015). A formação de célula gigante de corpo estranho (FBGC) induzida por linfocina IL-4 é altamente dependente da propriedade da superfície material, ocorre em compostos nitrogenados e oxigenados, mas não em poliestirenos fluorados ou revestidos de silicone. A ativação de macrófagos “alternativa” Th2 pela citocina IL-4 (ou IL-13 ou  $\alpha$ -tocoferol) promove a fusão com formação de grandes células gigantes de corpo estranho (FBGC) com núcleos dispostos aleatoriamente e citoplasma espalhado. A ativação clássica IFN- $\gamma$  com IL-3 ou fator de estimulação de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) resulta em células gigantes do tipo Langhans. A fusão de macrófagos induzidos por IL-4 via alternativa, expressam fortemente, galectina-3, o ligando de galectina-3 e molécula co-estimuladora de linfócitos CD98 que podem indicar modulação descendente de atividades de linfócitos (ANDERSON et al., 2008).

### IL 33

IL-33, um membro da família de citocinas IL-1, é uma citocina próinflamatória que é expressa em vários tecidos humanos, incluindo adipócitos, fibroblastos sinoviais e células endoteliais vasculares, células epiteliais da pele do trato intestinal e pulmão. Osteoblastos, osteócitos, adipócitos da medula óssea são também uma fonte de IL-33 (SAIDI; MAGNE, 2011). A IL-33 recombinante tem efeitos em células, principalmente hematopoiéticos

dependentes de ST2L (PALMER; GABAY, 2011). IL-33 tem como células alvo subconjuntos de células T CD4<sup>+</sup>, basófilos, mastócitos, eosinófilos, monócitos, macrófagos, células linfóides inatas tipo 2 (ILC2), células dendríticas (DC), células assassinas naturais (NK), células T assassinas naturais invariantes (iNK) e neutrófilos ativados, em que a IL-33 induz ativação celular, diferenciação (PALMER; GABAY, 2011) e produção de mediadores pró-inflamatórios como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IFN- $\gamma$  (OKRAGLY et al., 2016). A expressão de mRNA de IL-33 é aumentada por TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em osteoblastos *in vitro*. No entanto, osteoblastos e osteoclastos humanos não expressaram ST2L em condições basais e não respondem à IL-33, sugerindo que a IL-33 não age diretamente na remodelação óssea (PARK et al., 2017). A IL-33 exerce a sua função através do receptor Tol-like, que existe como duas isoformas resultantes do processamento diferencial de mRNA. A primeira isoforma é uma transmembrana ST2 (ST2L), também conhecido como IL-33R $\alpha$ , que após a ligação da IL-33 induz a transdução do sinal após o recrutamento da proteína acessória do receptor de IL-1 (IL-1RAcP), levando a ativação do fator nuclear – NF- $\kappa\beta$  e proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPK). A segunda isoforma ST2 é solúvel (ST2s), que se liga a IL-33 e inibe sua interação ao ST2L e vias de sinalização subsequentes. Além desses efeitos mediados pelo receptor ST2, IL-33 é capaz de se deslocar para o núcleo, onde exibe funções transcricionais. IL-33 é uma proteína de alta mobilidade B1 (HMGB1), exibindo efeitos nucleares e extracelulares (PALMER; GABAY, 2011). A IL-33 foi localizada primeiramente no núcleo das células endoteliais, principalmente na heterocromatina e cromossomos mitóticos, onde pode reprimir a transcrição. Posteriormente, a IL-33 foi identificada no núcleo de células epiteliais, fibroblastos sinoviais e monócitos. Finalmente, sugeriu recentemente que a IL-33 poderia funcionar como "alarmin", sendo segregados durante a necrose celular, para iniciar respostas imunes. A IL-33 é liberada através da necrose celular, via secreção ativa funcionando como um "sinal de perigo endógeno" ou "alarmin" pertencente a grande família de danos associados a padrões moleculares (SAIDI; MAGNE, 2011). O papel da IL-33 foi

predominantemente relacionado com respostas imunes associadas a Th2 porque ST2L é expresso apenas em células Th2, não em células Th1 T CD4<sup>+</sup>. No entanto, estudos recentes mostram que IL-33 promove respostas celulares Th1 específica a vírus por expressão transitória de ST2L. IL-33 é associada a doenças auto-imunes, como esclerose múltipla, doença inflamatória intestinal e artrite reumatóide (PARK et al., 2017). O receptor IL-33, ST2, é expresso em osteoclastos e seus precursores (OKRAGLY et al., 2016). O receptor solúvel (sST2) foi identificado como uma proteína segregada nos osteoblastos e matriz óssea nos murinos (SAIDI; MAGNE, 2011).

#### 1.4 Tratamento das fraturas

Muitas vezes o tratamento das fraturas, não união das fraturas e defeitos ósseos de origem não traumática (infecções, tumores, cistos), frequentemente requer uso de material não absorvível para substituir, aumentar ou reparar as estruturas teciduais danificadas. Destaca-se nessas situações o uso de enxertos ósseos - indutores da osteogênese, e a utilização de material não absorvível, pelas suas propriedades osteogênicas, biocompatibilidade, além da facilidade de confecção em vista do avanço da engenharia de tecidos (SHIRANE et al., 2010).

Os enxertos podem ser quanto à **origem**, **autógenos** - no mesmo indivíduo, **aloenxertos** que são enxertos transplantados entre indivíduos da mesma espécie e **xenógenos** são aqueles retirados de uma espécie e transplantados para outra.

**Quanto ao comportamento dos tecidos frente aos material não absorvível**, estes podem ser considerados **bioinertes**, não provocam reação de corpo estranho no organismo e estão em contato direto com o tecido receptor (p. ex., titânio, zircônia e alumina); **biotolerados**, que são moderadamente aceitos pelo tecido receptor não estabelecendo a osseointegração verdadeira, levando a formação de cápsula fibrosa, que é a resposta do tecido ao material, que estimula as células adjacentes a sintetizar, secretar e manter um tecido conjuntivo na interface (p. ex., aço inoxidável, ligas Cr-Co e polimetilmetacrilato (PMMA)).



Os **bioativos**, que não só estabelecem osseointegração direta, como também interagem com os tecidos vizinhos de forma a estimular a proliferação de células; e os **reabsorvíveis** que são lentamente degradados e substituídos pelos tecidos (FERNANDES-NETO;; MAGALHÃES, 2011).

O **mecanismo de ação biológico de reparo ósseo** associado aos material não absorvível ou enxertos ósseos pode ser classificado como **osteogênese, osteoindução, osteocondução e osteopromoção**. A **osteogênese** é o processo pelo qual células ósseas vivas são enxertadas em um leito receptor e permanecem com a capacidade de formação de novo tecido ósseo (FERNANDES-NETO;; MAGALHÃES, 2011). O processo de **osteoindução** envolve a formação de novo osso na área em crescimento a partir das células osteoprogenitoras do leito receptor, derivadas das células mesenquimais indiferenciadas, que se diferenciam sob a influência de um ou mais agentes indutores. A **osteocondução** se refere ao crescimento ósseo sobre a superfície do material não absorvível acomodando-o (BUSENLECHNER et al., 2008). A **osteopromoção** utiliza barreiras mecânicas de proteção, que evitam o crescimento de tecido conjuntivo em meio ao defeito ósseo, permitindo que o mesmo seja povoado por células (FERNANDES-NETO;; MAGALHÃES, 2011)

Os estudos atuais visam à busca dos implantes sintéticos ideais para a osteogênese, biocompatibilidade e resistência biomecânica durante o processo de reparo dos defeitos ósseos ou regeneração das fraturas (BOMBONATO-PRADO et al., 2004; ITOH et al., 2006; KAWAI et al., 2009; MURATA et al., 1999; PINILLA et al., 2003; RAMMELT et al., 2004; SCHWARTZ et al., 2008; SHIRANE et al., 2010).

### **1.5 O mecanismo biológico de reparo ósseo associado aos material não absorvível**

Este mecanismo representa uma reação de corpo estranho (FBR) aos material não absorvível . O Dicionário *Williams* de Material não absorvível define a resposta de corpo estranho como a "resposta global de um hospedeiro à presença de um corpo estranho"

(WILLIAMS, 1999). Reação de corpo estranho (FBR) é um processo imune-modulado, multifatorial e complexo, onde uma série de células e mediadores está envolvida, que resulta na proteção do material desencadeado pela adsorção de proteínas de superfície, ativação do complemento e acumulação de uma matriz de fibrina, seguido pelo recrutamento de granulócitos, células tronco mesenquimais e monócitos / macrófagos, sendo que este último controla amplamente a resposta a longo prazo, além de se fundir em células gigantes do corpo estranho (FBGC).

A função clínica do implante é dependente de um equilíbrio entre corpo estranho, reações moleculares e celulares, que afetam e controlam a relação entre os material não absorvível e o osso. Esse equilíbrio se for perturbado, pode levar à deterioração da função do implante, através do processo em que os macrófagos ativados podem se fundir em FBGC, resultando em reabsorção óssea. Diferentes estímulos – locais e sistêmicos - podem desencadear a ativação, ou mudança no fenótipo do macrófago, resultando em degradação óssea, como as citocinas, que podem ser pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8, prostaglandina E2 (PGE2), RANKL, M-SCF, fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) direcionando macrófagos a um perfil M1 classicamente ativado ou citocinas anti-inflamatórias (IL-10, IL-4 e IL-13) direcionando a um perfil M2, alternativamente ativado. Os macrófagos M2 anti-inflamatórios têm várias funções, incluindo a manutenção da tolerância do implante, reparo tecidual e na cicatrização de feridas. A infecção pode ocorrer como um evento secundário, complicando ainda mais o cenário clínico, resultando na falha do implante por um aumento nos sinais inflamatórios e imunológicos em reação ao lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) ou aumento de RANKL por fibroblastos sinoviais e linfócitos T ativado, por sua vez envolvido na diferenciação de osteoclastos, resultando em reabsorção óssea (TRINDADE et al., 2016). Após a ativação, as células T produzem RANKL e as citocinas pró-inflamatórias e isso pode influenciar a osteoclastogênese através do receptor ativador de nuclear fator- $\kappa\beta$  ligando

(HORWOOD et al., 1999; KONG et al., 1999), e, portanto, são capazes de regular a diferenciação da atividade dos osteoclastos.

Os *Osteomacs*, macrófagos residentes, (WU, A. C. et al., 2013) ativados por estímulos pró-inflamatórios incluindo LPS produzem citocinas pró-osteoclastogênicas, como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 e promovem a diferenciação e / ou a função dos osteoclastos. Osteomacs podem detectar e responder ao dano ósseo (morte apoptótica de osteoblastos e osteócitos), no início da remodelação óssea. Os macrófagos também podem produzir fatores osteoindutores, tais como TGF- $\beta$ , osteopontina, a 1,25-di-hidroxivitamina D3, e osso proteína morfogenética 2 sob várias condições. São essenciais para a mineralização osteoblástica em resposta ao estímulo fisiológico pró-anabólico de elevado cálcio extracelular. Dado que os osteoblastos também expressam o receptor de cálcio CaR, é possível a comunicação celular bidirecional entre macrófagos e osteoblastos conduza a mineralização (CHANG et al., 2008). A participação na cicatrização óssea intramembranosa dos Osteomacs é a deposição de colágeno tipo 1 na matriz óssea e aumento na mineralização visto em humanos e ratos (ALEXANDER et al., 2011). Osteomacs expressam o fator transmembranar de crescimento epidermal sete (EGF-TM7) proteína EMR1/F4/80, que os distingue dos osteoclastos (ALEXANDER et al., 2011).

### **1.6 Reparo ósseo após ablação de medula óssea**

Um modelo conveniente para estudar a regeneração óssea intramembranosa é o modelo mecânico de ablação da medula, (BAB, 1995; GERSTENFELD et al., 2003; SUVA et al., 1993) que reproduz as fases inflamatórias, de reparação e remodelação (MORAN et al., 2015). Ele também é usado para delinear a sequência de eventos moleculares associados ao processo de formação óssea e determinar o efeito inibitório na formação do osso. A regeneração da medula óssea após a lesão é completa, com nova medula idêntica ao tecido original, passando por uma fase de formação de osso preenchendo o canal medular. O coágulo

de sangue que enche a cavidade medular imediatamente após a remoção da medula é organizado pela substituição com osso esponjoso primário fase correspondente ao tecido de granulação, típicos dos processos de reparação dos tecidos moles. Ao contrário do processo de consolidação de fraturas em ossos longos, a fase cartilaginosa intermediária não ocorre. O tipo embrionário ósseo primário, similar na aparência ao osso esponjoso reativo visto em certos casos de cicatrização óssea, é submetido à reabsorção osteoclástica e substituição por tecido de medular. O processo é concluído no prazo de 21 dias. Em animais de sexo e idade definida, as fases do osteoblástica e osteoclásticas sobrepõem apenas parcialmente, e a sua época e extensão são altamente reprodutíveis. O modelo avalia a relação entre as alterações temporais que constituem o processo de cicatrização da medula e demonstra a sua utilidade para a regeneração pós-ablação. O modelo pós-ablação associados a métodos histomorfométricos, bem como abordagens moleculares e bioquímicas aplicadas em períodos de tempo específicos proporciona uma ferramenta eficiente *em vivo* para avaliar a eficácia de agentes implantados, bem como seus possíveis efeitos adversos sobre a formação óssea. Além disso, o modelo pode ser aplicado para estudar a relação entre a formação óssea ou reabsorção em diferentes condições fisiopatológicas. Quando aplicada a animais transgênicos este modelo pode ser utilizado para determinar o papel dos genes individuais em formação de uma matriz, a mineralização e reabsorção (BAB, 1995; SUVA et al., 1993).

Considerando que existe uma interação entre os mecanismos que regulam a resposta corpo estranho e a osteogênese, esse projeto visa estabelecer um modelo experimental para o estudo desses dois fenômenos e possíveis influências de um sobre o outro.

## 2.0 HIPÓTESE

O modelo experimental de osteogênese por ablação de medula de óssea de camundongos pode ser utilizado como modelo de interação entre a resposta de corpo estranho à material não absorvível e o processo de osteogênese.

## 3.0 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo Geral:

Estabelecer um modelo experimental de interação entre processo de regeneração óssea e a reação de corpo estranho à material não absorvível .

### 3.2 Objetivos específicos:

- Analisar, através de estudo estereológico o percentual do volume de ósseo neoformado através da coloração de Hematoxilina e Eosina em camundongos com e sem implante de material não absorvível no osso da tíbia.
- Quantificar de acordo com análise morfométrica, através da coloração *picrosirius*, as fibras colágenas na tíbia de camundongos com implante intramedular não absorvível e na tíbia de camundongos com ablação de medula óssea.
- Analisar a expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias ao através de RT-qPCR no modelo experimental proposto.

## 4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Abordagem experimental - Animais

Foram utilizados 38 camundongos, nome científico *Mus musculus*, C57BL/6, machos, adultos jovens com 2 meses, isogênicos provenientes do biotério da Universidade de São Paulo – Campus Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em biotério com condições controladas de temperatura ( $22\pm 5^{\circ}\text{C}$ ), luz (ciclo de doze horas) e umidade –  $55\pm 5\%$ . Foram utilizadas caixas medindo 41x34x16cm, incluindo tampa em aço inox, e bebedouro completo (frasco, rolha e bico), autoclavável e resistente à ácidos. A ração foi peletizada, da marca NUVILAB – CR1. A caixa-moradia foi forrada com serragem de madeira de pinus clara autoclavada. A água foi filtrada.

### 4.2 Procedimentos cirúrgicos

Os espécimes foram alocados aleatoriamente em 4 grupos experimentais que receberam o mesmo tratamento, contudo, sacrificados e analisados em tempos diferentes. Para estudo morfológico em 3 (n=6), 7(n=6), 15(n=7) e 30(n=7) dias; e para estudo histológico RT-qPCR 15(n=5), 30(n=5) dias. Os animais foram anestesiados via intraperitoneal com uma solução constituída por 0,2 mg de cloridrato de xilazina - 5mg/Kg e 2mg de cetamina - 50mg/Kg. A assepsia na região a ser incisada foi feita com lugol. Foi realizada a tricotomia na área de acesso cirúrgico sobre as duas tíbias (esquerda e direita). As tíbias foram acessadas por uma incisão na pele na face lateral da panturrilha. Músculo e perióstio foram avulsionados e afastados para expor a face lateral da tíbia. O canal medular foi acessado através de um orifício feito com uma broca odontológica 701 em baixa rotação. Uma cânula flexível foi usada para desorganizar e remover a medula óssea. O canal medular foi irrigado com pelo menos 5 ml de solução salina estéril. A seguir um fragmento de 0,5 cm comprimento de fio de algodão Ethicon® - Unidade 2-0 Jonshon e Jonshon® foi

colocada no interior da tíbia esquerda de cada animal. A tíbia direita foi utilizada como controle, passando pelo mesmo procedimento cirúrgico, mas sem receber o implante de fio de algodão. A cirurgia foi finalizada com reposicionamento dos tecidos moles e sutura com fio de seda 3-0 (Ethicon, Johnson & Johnson).



Arquivo pessoal.

**Figura 01.** Esquema representativo e foto do osso tibial do grupo controle com ablação de medula óssea e do grupo experimento com ablação de medula óssea e implante de \*fio de algodão.

### 4.3 Cuidados pós-operatórios

Os camundongos foram monitorados até que se recuperem da anestesia, em gaiolas individuais. A inflamação no local do implante, alterações comportamentais e outras reações adversas ao implante foram monitoradas. Os animais foram aquecidos no período pós-anestésico, evitando hipotermia corporal. Dose única de tramal intraperitoneal (2mg/kg) foi administrada para alívio da dor pós-cirúrgica. Foi efetuada a limpeza da ferida cirúrgica, para evitar canibalismo entre os animais devido ao odor exalado pelo sangue presente na ferida cirúrgica. Os olhos dos animais foram mantidos umedecidos com algodão embebido em solução salina. A dieta e a deambulação foram mantidas sem alterações.

### 4.4 Coleta do material:

Decorridos os períodos experimentais de 3, 7, 15 e 30 dias, os animais foram sacrificados com sobre-dose do anestésico. Os ossos coletados foram limpos e fixados em formol a 10% (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Os fragmentos de tecido, retirados de 10 animais com 15 e 30 dias de pós-cirúrgico, foram congelados em nitrogênio líquido  $-70^{\circ}\text{C}$  imediatamente após a remoção para estudo histológico.

#### **4.5 Processamento do material:**

As amostras para estudo morfológico, foram submetidas à descalcificação com EDTA (ácido etilenodiaminotetracético, Labsynth®, Diadema, Brasil) dissódico (41.3 g) e NaOH 4.4g, 1000 ml água destilada qsq em temperatura ambiente. O pH final da solução foi corrigido para 7.0 a 7.4 usando NaOH ou ácido acético. O material permaneceu nessa solução por 30 dias com trocas semanais da solução (WARSHAWSKY; MOORE, 1967). Logo após descalcificação o material foi incluído em parafina. As secções em cortes semi-seriados foram feitas pelos micrótomos: SLEE Mainz cut 4055 e Micro Heidelberg HM 320, Alemanha - com 2 micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) de espessura. Logo após o material, colhido em lâminas com pré-tratamento superficial em silano, foi desidratado em cadeias crescentes de álcool (70 a 100%), diafanizados em banhos de xilol; e receberam a coloração Hematoxilina e Eosina e Picro Sirius (Merck, Darmstadt, Alemanha).

#### **4.6 Análise**

##### **4.6.1 Histomorfológica**

A análise foi realizada nos ossos da tíbia esquerda e direita (experimento e controle) seccionadas longitudinalmente, com a área da lesão óssea voltada para o examinador. Foram analisadas as imagens do canal intramedular, ao longo da diáfise óssea, sem considerar a área de crescimento das epífises. Para esta análise as lâminas foram coradas pelo HE e analisadas pelo sistema interativo de imagens Leica QWin® (Wetzlar, Germany) em aumento de 20x de acordo com os seguintes parâmetros: processo inflamatório, tecido necrótico, material não absorvível, vascularização, fibras colágenas, formação de células multinucleadas ao redor do



implante intramedular, formação de células multinucleadas ao redor do osso neoformado, atividade osteoblástica e neoformação óssea.

Para a análise de fibras colágenas, as imagens foram colhidas em aumento de 20x pelo sistema interativo de imagens Leica QWin®. Foram consideradas as áreas do canal intramedular, sem considerar as epífises ósseas. Após padronização do microscópio, as imagens passaram por uma correção (background) feitas pelo software *ImageJ*, onde evidenciou a coloração sobre o depósito de colágeno e a medida automática dessas áreas coradas em *Picro sirius* foram feitas pelo software *ImageJ* (Center for Information Technology National Institutes of Health Bethesda, Maryland, USA ).

#### 4.6.2 Volume ósseo

A quantificação do osso neoformado foi realizada através da estereologia de acordo com o princípio de Delesse (Mandarim-de-Lacerda, 1999). Usou-se a seguinte fórmula  $VV=PP/PT$  (%), onde:

$VV$  = densidade de volume ou volume relativo;

$PP$  = quantidade de pontos (intersecção de linhas) sobre o osso neoformado;

$PT$  = número total de pontos do sistema.

Através de um retículo quadrilátero de 100 pontos e acoplado na ocular do microscópio de luz Carl Zeiss, calculou-se a densidade do volume ósseo neoformado na área do implante e a partir da extremidade do fragmento da fíbula. Esta análise foi feita com a objetiva do microscópio de luz padronizada em aumento de 20x (SHIRANE et al., 2010).

#### 4.6.3 RT qPCR em tempo real.

*Extração do RNA total das células cultivadas.*

O RNA total das células foi extraído utilizando-se kit de extração de RNA (PROMEGA, EUA), seguindo-se as recomendações do fabricante. Dessa forma, as células anteriormente

armazenadas em RNA later foram centrifugadas por 10 minutos a 500xg, seu sobrenadante descartado e as células foram resuspensas em 175µL de tampão de lise e 350µL de tampão de diluição foram adicionados. As amostras foram levadas a banho-maria (70°C) por 3 minutos e posteriormente centrifugadas por 10 minutos a 13000xg (4°C). Ao sobrenadante foram adicionados 200µL de etanol 95%. O material foi então transferido para o conjunto de separação do kit e centrifugado por 1 minuto a 13000xg (4°C), o RNA restante na membrana de separação do kit foi lavado por centrifugação em 600µL de tampão. Para eliminação de DNA contaminante, as amostras foram tratadas com DNase. Após tratamento, o material foi lavado por duas vezes (1 minuto a 13000xg). O RNA resultante na membrana separadora foi então eluído em 30µL de água deionizada e livre de nucleases, para posterior confecção do cDNA.

#### *Confecção do cDNA a partir do RNA extraído*

Para a confecção do cDNA, utilizou-se 10µL do RNA total anteriormente extraído, a este foram adicionados: 10µL de MIX (2µL de tampão 10X RT Buffer, 0,8 µL de dNTP Mix(25X), 2 µL de RT Random Primers (10X), 1µL de enzima MultiScribe™ Reverse Transcriptase e 4,2µL de água livre de nucleasse (LIFE, EUA). O material foi então colocado em Termociclador – PTC 100 (MJ Research, Inc – EUA), programado para transcrição reversa em ciclos de 10 minutos a 25°C, de 120 minutos a 37°C e de 5 minutos a 85°C. Após confecção do cDNA, as amostras foram quantificadas e armazenadas a 4°C para posterior análise em RT-qPCR.

#### *PCR em tempo real para análise da expressão de moléculas de superfície e citocinas.*

As amostras anteriormente armazenadas foram submetidas a PCR em tempo real (qPCR) para análise da expressão quantitativa do RNAm dos genes IL10, IFN-γ, IL4, IL17-A, IL-33 e TNF-α, utilizando-se Beta actina como gene referência. Os cDNAs foram utilizados com reagente TaqMan (LIFE, EUA), como determinado pelo fabricante. Foram

utilizados 4,5µL de cDNA diluídos em água deionizada, 5µL de Master Mix e 0,5µL de primer TaqMan. O material foi plaqueado e colocado em aparelho *StepOnePlus* (APPLIED BIOSYSTEMS, EUA). Para descartar eventuais contaminações, todos os alvos foram submetidos a ciclos de amplificações na ausência de cDNA. O ciclo de amplificação compreendeu 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C e 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. Os resultados adquiridos através da amplificação foram analisados a partir do valor de CT (cycle threshold – ou ciclo limiar). Utilizou-se o método do CT comparativo ( $\Delta\Delta CT$ ), formulado por  $2^{-(Ct \text{ do gene alvo} - Ct \text{ gene referência})}$  para obtenção dos resultados da quantificação relativa de mRNA.

#### 4.7 Análise estatística

Para a análise estatística os dados coletados foram organizados no software *Microsoft Excell®* e as informações foram analisadas utilizando-se o *Graphpad Prism* versão 7.0. Os testes foram avaliados de acordo com sua normalidade e para isso foi utilizado o teste de *Kolmogorov Smirnov*. Para análise entre três ou mais grupos, nos casos de distribuição normal e variâncias semelhantes, foi utilizado o teste *One Way ANOVA* (F) seguido do teste de *Tukey*. Quando a distribuição não foi normal, utilizou-se o teste de *Kruskal-Wallis* (H) seguido pelo teste de *Dunn*, quando necessário. Foi utilizado *T test* para análise de dois grupos em distribuição normal e *Mann-Whitney* para distribuição não normal. Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças em que a probabilidade (p) foi menor que 5% ( $p < 0,05$ ). Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão ( $M \pm DP$ ).

#### 4.8 Aspectos éticos

O presente estudo foi encaminhado à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, e aprovado sob protocolo número 304 (Anexo A).

## 5.0 RESULTADOS

### 5.1 Análise histomorfológica

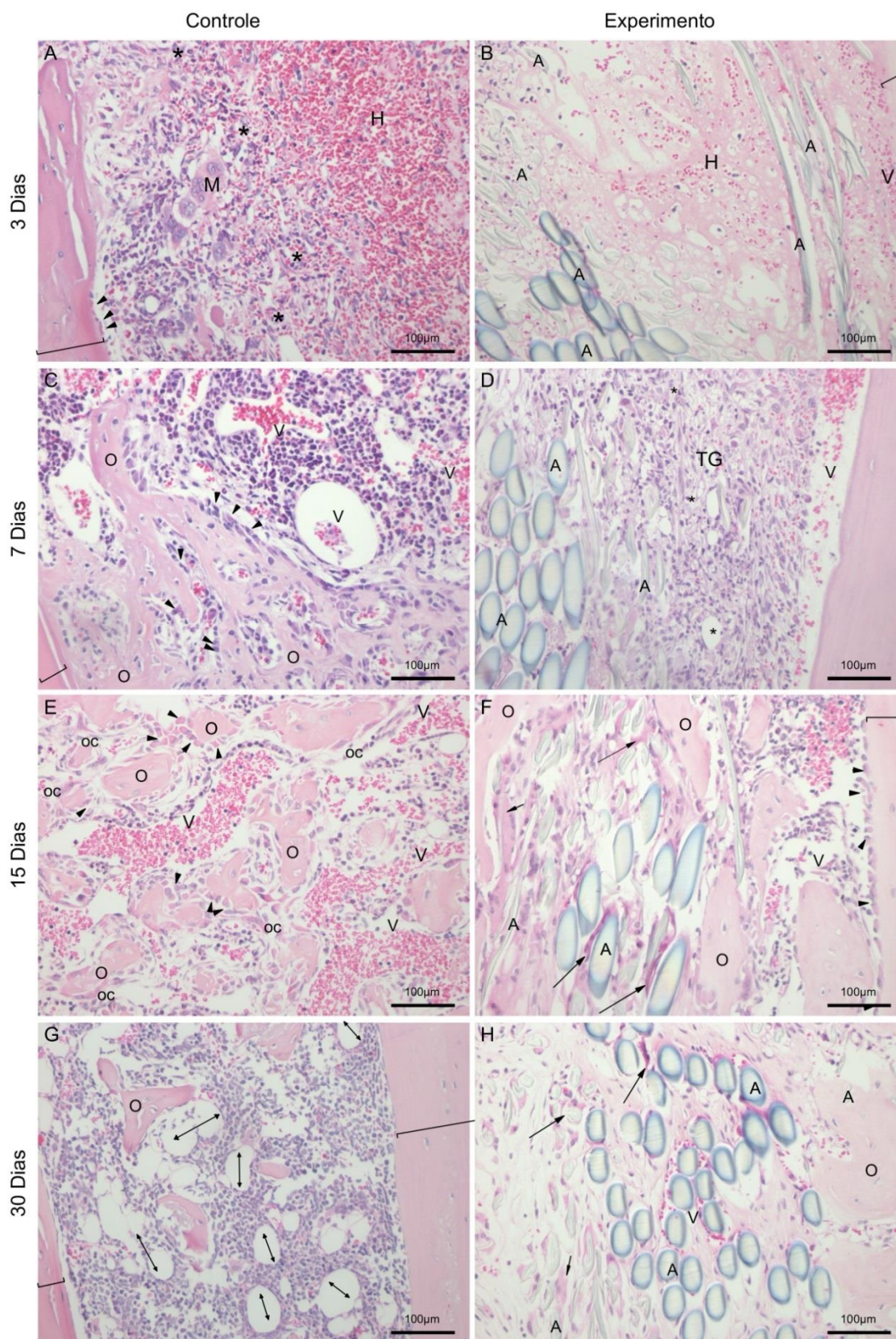
Seções histológicas representativas de todos os grupos são apresentadas na **Figura 01 e 02**.

#### 3° dia

Três dias após a cirurgia, avaliação histológica do GC revelou que a área do defeito ósseo estava preenchida por uma grande hemorragia e exibia área concêntrica de formação de fibrina, apresentação de um grande número de hemácias no canal medular com células inflamatórias e megacariócitos (Fig.1 e 2A). Em GE, poucas células inflamatórias ao redor das partículas do implante são observadas, também é observado um coágulo rico em fibrina. (Fig.1 e 2B).

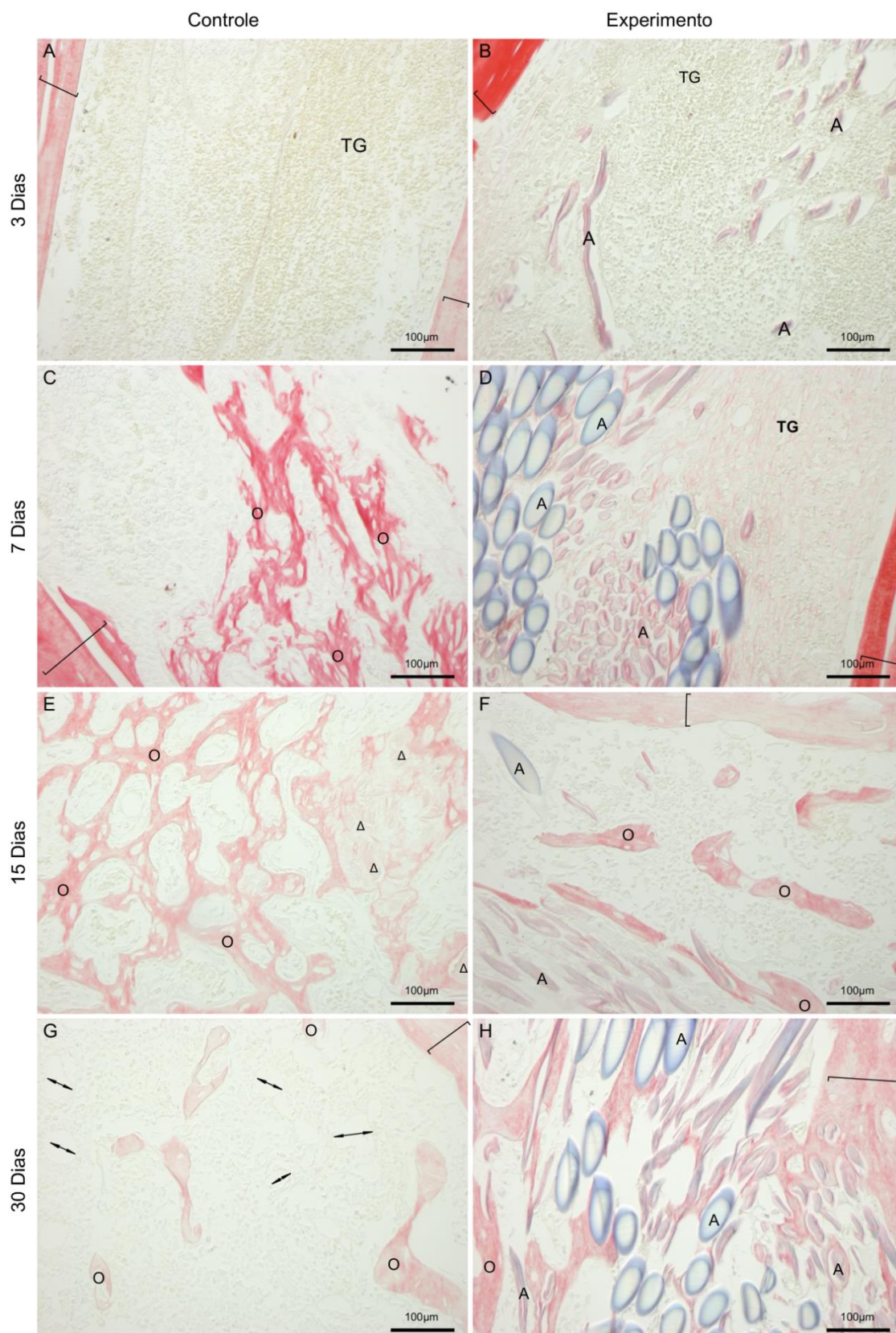
#### 7° dia

O defeito ósseo do grupo controle foi preenchido principalmente por tecido de granulação, acompanhado de células inflamatórias (Fig.1 e 2C). Além disso, o osso recém-formado foi observado na periferia do defeito assim como aumento da espessura do osso cortical para dentro do canal medular e em alguns casos apresentando “debrí” em seu interior, poucos megacariócitos e hemácias em locais específicos indicando formação de vasos (Fig. 1e 2C). Para GE, nos espaços ocupados pelo material, há um processo de células multinucleadas envolvendo o material e tecido de granulação que caracteriza a continuidade do processo inflamatório. Há grande formação de fibras colágenas caracterizado por um material fibrótico (deposição de matriz extracelular fibrótica imatura) visto principalmente ao redor do material implantado. O osso recém-formado é pouco quando comparado ao grupo controle e foi notado na área de contato entre as bordas do defeito ósseo (Fig.1e 2D)



**Figura 01.** Fotomicrografia do aspecto histológico do osso tibial no grupo controle com ablação de medula óssea e no grupo experimento com ablação de medula óssea e implante de fio de algodão com 3, 7, 15 e 30 dias após a cirurgia. Osso recentemente formado (O), infiltração de células inflamatórias (\*), adipócitos (seta dupla), córtex (colchete), fio de algodão (A), osteoblasto (cabeça da seta), debri (Δ), vascularização (V), tecido de granulação (TG), megacariócitos (M), osteoclasto (OC), coágulo (H). A seta na figura F e H indicam células gigantes de corpo estranho. Barra representa 100 μm. Coloração Hematoxilina e eosina.





**Figura 02.** Fotomicrografia do aspecto histológico do osso tibial no grupo controle com ablação de medula óssea e no grupo experimento com ablação de medula óssea e implante de fio de algodão com 3, 7, 15 e 30 dias após a cirurgia. Osso recentemente formado (O), adipócitos (seta dupla), córtex (colchete), fio de algodão (A), debris (Δ), tecido de granulação (TG). Barra representa 100 µm. Coloração Picro Sirius.

**15° dia**

Para GC, grande quantidade de tecido ósseo neoformado dentro da medula óssea e na área de defeito ósseo. Há formação de novos vasos sanguíneos dentro do canal da medula óssea. Algumas células inflamatórias podem ser observadas dentro dos vasos sanguíneos (Fig. 1e 2E). O osso formado foi observado na área do defeito, principalmente na periferia, mostrando um espessamento da área cortical para dentro do canal medular estreitando esse espaço, com presença de osteoblastos e células multinucleadas ao redor do osso recém formado característico de células de osteoclastos. Grande número de vasos sanguíneos são localizados entremeados a esse novo osso intra medular (Fig.1 e 2E). Nenhum ou pouco “debrí” é observado, assim como megacariócitos e adipócitos. No GE, a englobamento do material implantado continuou, permitindo o aumento de células gigantes caracterizando reação de corpo estranho, adipócitos e megacariócitos. O aumento da espessura do osso cortical para dentro da medula óssea apresenta fragmentos do material implantado. Há também nichos do material implantado ocupando o centro do canal medular, envolto por um material fibroso, células do sistema imune, vasos sanguíneos cheios de hemácias e osso neoformado onde não há a presença do material não absorvível (Fig.1e 2F).

**30° dia**

Após 30 dias de implantação, para ambos os grupos, o defeito ósseo foi preenchido com osso recém-formado (Fig.1 e 2G e H). No GC, o interior da medula óssea apresenta homogeneidade entre as populações eritrocitárias e granulocíticas, megacariócitos e adipócitos, cenário característico da medula óssea normal. No GE, O material implantado ainda pode ser notado na medula óssea, principalmente no centro da medula óssea com células gigantes envolvendo o material (Fig.1 e 2H). Há também fragmentos do material implantado no osso cortical espessado. Células do sistema imune, adipócitos e megacariócitos e grande quantidade de osso neoformado ao redor do material não absorvível.

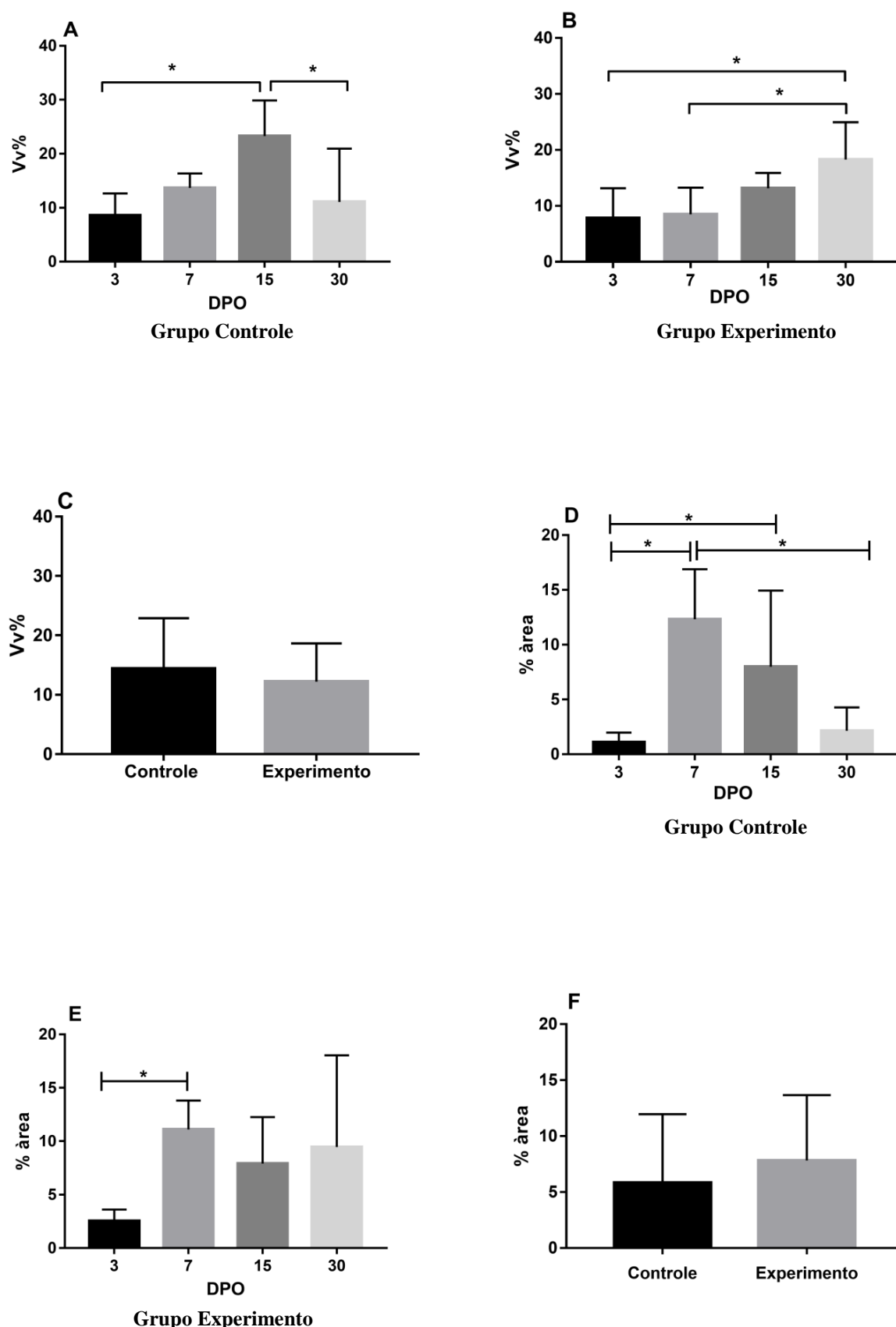
## **5.2 Na formação do volume ósseo intramedular, o controle apresenta maior formação óssea do que no grupo experimento.**

A formação do volume ósseo dentro da medula óssea foi maior no grupo controle quando comparado com o grupo experimento, aumentando sua percentagem no 15º dia e mostrando diferença significativa entre o 3º dia e o 30º dia. No 30º dia, o grupo controle mostrou um percentual próximo ao normal (Figura 3A). No grupo experimento o percentual de volume ósseo formado dentro da medula óssea foi menor em relação ao grupo controle e seu maior percentual foi expresso no 30º dia pós-operatório mostrando diferença significativa entre o 3º e o 7º dia de pós-operatório (Figura 3B). Esses dados mostram a relação entre a formação de corpo estranho e a alteração no reparo e regeneração óssea no que diz respeito a tempo de finalização do processo que é alterado na presença do implante intra medular visto no grupo experimento (Figura 3C).

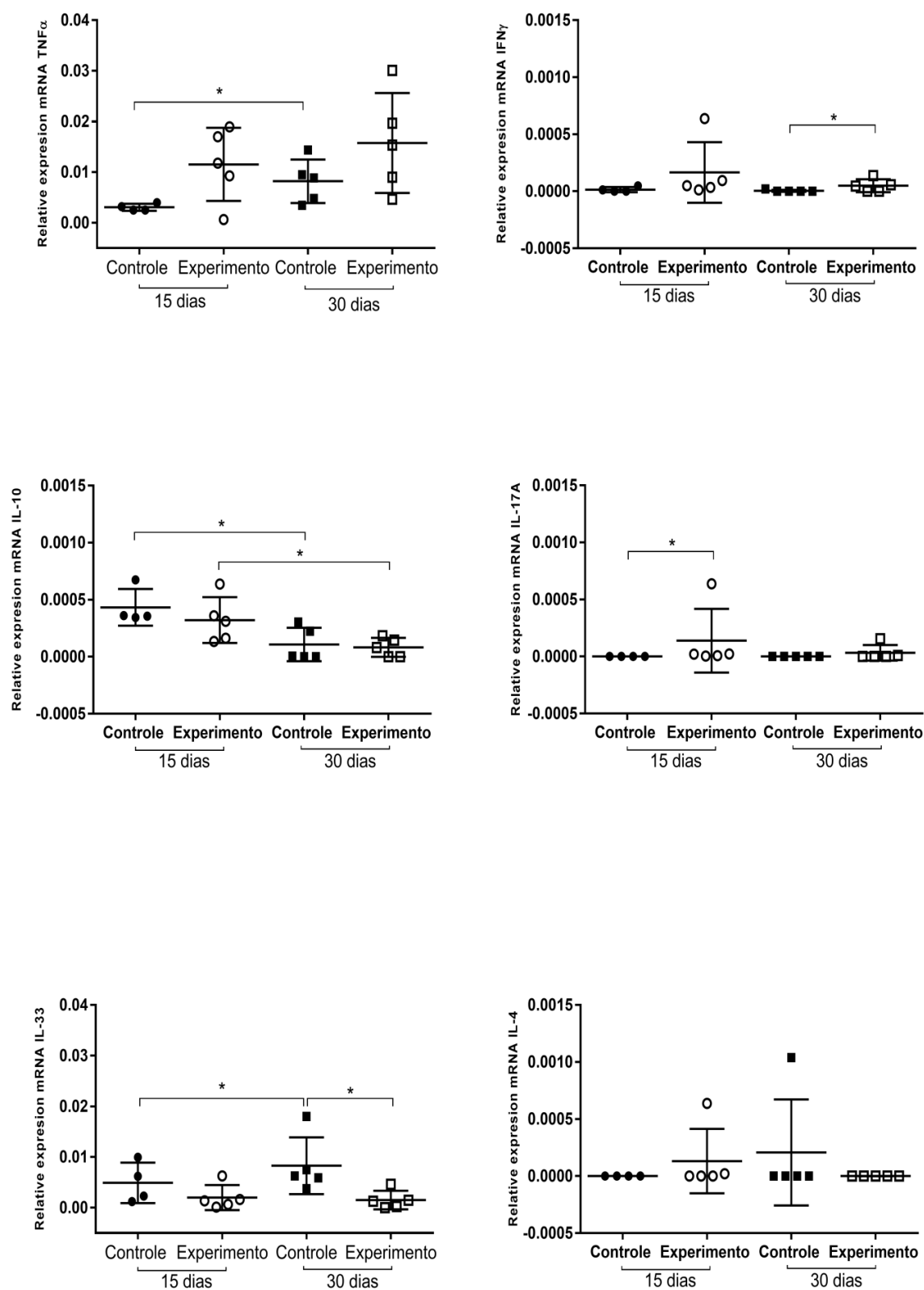
## **5.3 A expressão de colágeno foi maior no grupo experimento em relação ao controle.**

No grupo controle (Figura 3D) a expressão de colágeno foi maior no 7º dia de pós-operatório, com diferenças significativas quando comparado ao 3º e o 30º dia. Há relevância significativa entre o 15º dia em relação ao 3º dia que mostra o início da diminuição das fibras colágenas a níveis próximos aos normais no 30º dia. No grupo experimento (Figura 3E), o aumento de fibras colágenas é visto no 7º dia de pós-operatório e tem diferença significativa comparado ao 3º dia. Porém, após aumento de sua expressão, não mostra diminuição e se mantém até o 30º dia de pós-operatório mostrando interferência do implante em relação à regeneração óssea (Figura 3F).





**Figura 03.** Análise do volume ósseo neoformado após coloração em hematoxilina/eosina representadas pelas figuras A, B e C realizada através da estereologia de acordo com o princípio de Delesse; e Coloração Picro Sirius para tecido conectivo colágeno em D, E e F. GC ablação de medula. Ablação de medula óssea com implante de fio de algodão em GE. Vv% = percentual ósseo neoformado, % de área = porcentagem da área de fibras colágenas. Em A e E, Kruskal Wallis teste seguido de Dunn múltiplas comparações. Em B e D Anova seguido de tukey. T test em C e F. DPO = dias pós-operatório. \*Nível de significância,  $p < 0.05$ .  $M \pm SD$ .



**Figura 04.** Expressão relativa mRNA de citocinas em medula óssea de camundongos machos de dois meses de idade, livre de patógenos externos, para grupo controle com ablação de medula óssea e para grupo experimento com ablação de medula óssea e implante de fio de algodão intramedular. **Mann Whitney test.** \*Nível de significância,  $p < 0.05$ .  $M \pm SD$ .

#### **5.4 As citocinas mostraram uma expressão fenotípica pró ou anti-inflamatória?**

A expressão da citocina 33 (IL-33) mostra aumento da expressão nos grupos controles de 15<sup>o</sup> e 30<sup>o</sup> dias de pós-operatório. No grupo controle de 30 DPO, a expressão mostra diferença significativa com relação ao grupo experimento de 30 DPO e grupo controle de 15 DPO. A pouca expressão no grupo experimento em 15 e 30 DPO contrasta com os resultados da expressão da citocina TNF $\alpha$ , que mostra nesses mesmos grupos uma alta expressão, principalmente em 30 DPO. No grupo controle o TNF- $\alpha$  mostra diferença significativa e maior expressão em 30 DPO quando comparado a 15 DPO. A citocina IL-10 mostrou maior expressão no grupo de 15 DPO controle e experimento em relação ao grupo 30 DPO controle e experimento. As diferenças significativas foram observadas quando comparados os grupos controle de 15 DPO, com maior expressão, em relação ao grupo controle de 30 DPO e grupo experimento de 15 DPO, com maior expressão quando comparado a 30 DPO experimento. Nota-se uma diminuição da IL-10 no grupo controle e experimento no 30<sup>o</sup> DPO e aumento de TNF- $\alpha$  no mesmo grupo em 30 DPO.

#### **6.0 DISCUSSÃO**

Processos imunes tanto inatos quanto adaptativos são essenciais durante as fases anabólica e catabólica da cicatrização de fraturas (EINHORN; GERSTENFELD, 2015). Na osteoimunologia, citocinas comuns, receptores, moléculas de sinalização e fatores de transcrição devido à origem compartilhada permitem uma ampla gama de conversas dinâmicas entre células das linhagens de monócito-macrófago-osteoclastos e MSC-osteoblastos (LOI et al., 2016).

A implantação de um material não absorvível e a regeneração óssea, tanto por lesões mecânicas quanto químicas ou por reação de corpo estranho estimulam uma resposta inflamatória. (HANSON; D'SOUZA; HEMATTI, 2014). Além da importância da biocompatibilidade e capacidade osteocondutora dos implantes no processo de regeneração

óssea, também é fundamental o tipo de ossificação embriológica do osso (SHIRANE et al., 2010).

No presente estudo, a utilização de camundongos livres de patógenos externos e com implante de fio não absorvível após ablação de medula óssea mostrou ser um modelo que caracterizou as fases de regeneração óssea com formação de corpo estranho e atuação do sistema imune inato representados pela presença de macrófagos e citocinas respectivamente. No decorrer da ossificação intramembranosa o volume ósseo intramedular e as fibras colágenas, no grupo controle, aumentaram após ablação de medula óssea e retornaram a valores próximos do normal. Esse mesmo grupo mostrou uma alta expressão de IL-33 e IL-10 sendo que a IL-33 mostrou maior expressão em 30 dias pós-operatórios. O TNF- $\alpha$  aumentou sua expressão, no grupo experimento, em 30 dias pós-operatórios. O grupo experimento mostrou um aspecto histomorfológico durante a regeneração óssea com aumento de fibras colágenas e diminuição do volume ósseo intramedular. Os mediadores inflamatórios foram influenciados pela presença do macrófago, através da reação de corpo estranho. A IL-10 mostra alta expressão em quinze dias pós-operatórios, mas diminui no decorrer dos dias. A IL-33 não apresenta grande expressão mostrando pouca relação com a reação de corpo estranho.

A presença de fagocitose frustrada é vista no grupo experimento de 7 dias pós-operatório. Dentre as células do sistema imune, os macrófagos, são importantes moduladores vitais da inflamação (LOI et al., 2016). O material estranho é reconhecido de forma não específica pelos macrófagos que se fundem para formar fagócitos maiores. No entanto, a presença de um material estranho estimula a inflamação contínua por macrófagos de tecidos. "Fagocitose frustrada" ocorre quando os macrófagos são incapazes de fagocitar o corpo estranho e ocorre no local do material não absorvível ou dispositivo implantado e pode levar a reabsorção ou falha além de trauma ao próprio tecido local (HANSON et al., 2014).

O aumento da expressão da citocina TNF- $\alpha$  está presente nos grupos experimento de 15 e 30 dias de pós-operatório, e é relacionado com o perfil fenotípico do macrófago. Os macrófagos têm um papel vital na imunidade inata e adaptativa, cicatrização e remodelação e exibem um fenótipo heterogêneo. Macrófagos "M1" associados a um aumento das citocinas inflamatórias IL-1, IL-12, TNF- $\alpha$ , possuem marcadores de superfície, como CD80, CD86 e MHC de classe II e estão envolvidos em remoção de detritos, continuação inflamação e lesão tecidual. Os macrófagos alternativamente ativados "M2" são associados a um aumento das citocinas anti-inflamatórias IL-10, IL-6, TGF- $\beta$ , produção de matriz extracelular e tecido remodelação (HANSON et al., 2014). Macrófagos M2 diferenciam-se em resposta à interleucina-4 (IL-4) ou IL-13 e exibem respostas imunes com perfil Th2, como proteção contra parasitas e cura de feridas. Eles são tipicamente definido pela expressão de arginase 1, a receptor de manose, CD206 e a cadeia  $\alpha$  do receptor IL-4, e eles podem produzir grandes quantidades de IL-10 (LIEW; GIRARD; TURNQUIST, 2016).

O “debrí” estimula a produção de TNF- $\alpha$ . As citocinas associadas ao macrófago M1 liberadas após contato com restos de desgaste incluem IL-1  $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-11, IL-15, TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ , GM-CSF, fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), fator de crescimento derivado de plaquetas e fator de crescimento epidérmico (HALLAB; JACOBS, 2017). TNF- $\alpha$ , é uma importante citocina pró-inflamatória, desempenhando um papel fundamental durante a inflamação e posterior cura de feridas. As duas formas de TNF- $\alpha$ , solúvel e transmembrana, participam do processo inflamatório. Além disso, o TNF- $\alpha$  promove a cicatrização intestinal da ferida, protegendo contra a apoptose epitelial através da ativação da via ErbB. Os efeitos induzidos por TNF- $\alpha$  dependem da concentração e duração de exposição. Especificamente, baixos níveis de TNF- $\alpha$  promovem a inflamação e estimulam a produção de fatores de crescimento derivados de macrófagos facilitando a cicatrização de feridas. No entanto, longa exposição a níveis elevados de TNF- $\alpha$  pode ter um impacto negativo na cura, pois TNF- $\alpha$  pode levar a uma produção reduzida de componentes da matriz

extracelular, promovendo a síntese de metaloproteinases (BROCKMANN et al., 2017). O TNF- $\alpha$  afeta o bloqueio da síntese de condrócitos de componentes de proteoglicanos, proteoglicanos que protegem proteínas e colágeno tipo II. Condrócitos ativados também produzem metaloproteinases. Conforme descrito anteriormente, há uma indução de morte de condrócitos e uma desordem na migração de células progenitoras condrogênicas (CPCs), que tira a cartilagem de qualquer possibilidade de regeneração. Foi também observado um impacto claro de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  na redução da eficiência da cadeia respiratória, e, portanto, a diminuição da ATP produzida nas mitocôndrias localizadas em condrócitos. O TNF- $\alpha$  é responsável pelo aumento da síntese de, por exemplo, IL-6, IL-8, RANTES e VEGF. Além disso, como descrito acima, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  induzem a produção de iNOS, COX-2 e PGE2 sintase, aumentando assim as quantidades de seus produtos (WOJDASIEWICZ et al., 2014).

O aumento da expressão de TNF- $\alpha$  por ativação de macrófagos aderidos ao fio de algodão culmina em uma ativação das células T, estas por sua vez, aumentam ainda mais a expressão de TNF- $\alpha$ . Devido ao efeito de citocinas, nos processos patológicos e na cura de fraturas, as citocinas podem ser divididas em inflamatórias: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-15, IL-17 e IL-18 e anti-inflamatórias: IL-4, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$  (WOJDASIEWICZ et al., 2014). Os linfócitos T podem ser ativados por citocinas tais como IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-15 e IL-18. Os linfócitos T ativados induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-6, e as quimiocinas IL-8, MCP-1 e MIP-1 $\beta$  a partir de monócitos / macrófagos de maneira dependente do contato. O aumento dos níveis de TNF- $\alpha$ , mostrou que influencia a maturação e a função dos osteoclastos. Os receptores das citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  estão presentes em células precursoras de osteoclastos e osteoclastos maduros, regulando a proliferação e a difusão de pré-osteoclastos mononucleares em progenitores de osteoclastos e fusão dos pré-osteoclastos em osteoclastos multinucleados. Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que citocinas formadas durante a inflamação, TNF- $\alpha$  e IL-1, estão envolvidas na diferenciação e ativação dos osteoclastos, regulando a produção de RANKL / OPG. O

receptor ativador do fator nuclear  $\kappa$  ligando (RANKL) é secretado por osteócitos vivos, promovendo a osteoclastogênese. A osteoprotegerina (OPG) funciona como um receptor solúvel para RANKL bloqueando a interação RANK com o seu receptor RANKL. Além disso, TNF- $\alpha$  e IL-1 promovem a atividade de reabsorção de osteoclastos aumentando o fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF), que ao se ligar ao seu receptor c-fms, promove diferenciação em células precursoras para osteoclastos através das ações de RANKL (ZHANG et al., 2014).

No nosso estudo a citocina IL-4 não mostra expressão, o que pode ser a causa da não desativação do TNF- $\alpha$ . O TNF- $\alpha$  é um fator envolvido na inflamação sistêmica e é produzido principalmente por macrófagos ativados (KIDO et al., 2015). A produção de IL-4 pode ocorrer muito cedo após a lesão, e a literatura mais recente sobre a diferenciação de Th2 confirmou que, fontes inatas de IL-4 podem vir de neutrófilos, mastócitos, eosinófilos, células natural *Killers* invariante T (iNKT) e basófilos. No entanto, nenhum desses tipos de células foi verificado como essencial para a diferenciação de Th2 induzida por IL-4, o que pode significar sinergia entre eles coletivamente (CHUNG et al., 2017).

Através de secreção de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IFN- $\gamma$ , os macrófagos promovem ou não a atividade dos osteoclastos (LOI et al., 2016). TNF- $\alpha$  induz a apoptose de macrófagos em superfícies de material não absorvível através de mecanismos mediados por TNF- $\alpha$  e a inibição desses mecanismos é feito pela linfocina IL-4 (ANDERSON et al., 2008). IL-4 e IL-10 são citocinas anti-inflamatórias que podem regular os efeitos do TNF- $\alpha$ . A IL-4 promove indiretamente a formação óssea, aumentando a expressão da osteoprotegerina (OPG), inibindo a osteoclastogênese (KIDO et al., 2015). A secreção da IL-4 é limitada aos períodos da fase de inflamação. Sua produção excessiva na circulação sistêmica destrói o tecido ósseo, aumenta o risco de infecção, induz de hiperplasia sinovial e reações alergênicas. A IL-4 tem efeitos sobre a modulação da polarização de macrófagos (LIN et al., 2017), em macrófagos M2 (LOI et al., 2016). Entre 1 e 20 ng / mL de IL4 é suficiente para a imunomodulação da

imunidade adaptativa e indução da apoptose de linfócitos T por MSCs . Recentes estudos demonstraram que os MSCs pode também modular a resposta imune inata, através de macrófagos (LIN et al., 2017). MSC medeia a polarização de macrófagos M2 e produção de IL-10 para os mecanismos de proteção contra choque séptica em um modelo murino *in vivo* (LIN et al., 2017).

A IL-4 pode induzir uma regulação positiva da expressão de receptores de TNF, tais como TNF-R1 e TNF-R2. TNF- $\alpha$  interage através de dois receptores: TNF-R1 (TNFRSF1A) e TNF-R2 (TNFRSF1B). A sinalização de TNF- $\alpha$  /TNF-R1 medeia a produção de moléculas inflamatórias, regula sobrevivência celular, proliferação e morte, e afeta a cicatrização de feridas epiteliais. A cicatrização de feridas é uma processo envolvendo a sinalização TNF- $\alpha$  / TNF-R2 (WOJDASIEWICZ et al., 2014).

A produção de IL-4 é determinada principalmente por células T (Th2). Em vários estudos, verificou-se que a IL-4 tem um efeito inibidor na degradação de proteoglicanos na cartilagem articular, inibindo a secreção de metaloproteinases de MMPs, bem como reduzindo a variação na produção de proteoglicanos. A IL-4 sozinha ou em combinação com IL-10, há uma diminuição da síntese de citocinas inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 e uma diminuição na secreção de outros mediadores inflamatórios como PGE2, COX-2, PLA2 e iNOS. Os resultados observados parecem confirmar o efeito positivo de IL-4 e GM-CSF em restaurar o equilíbrio entre a secreção de fatores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios nas células imunes em camundongos com CIA (artrite induzida por colágeno) (WOJDASIEWICZ et al., 2014). As células NK são ativadas por interações diretas receptor / ligando, e também indiretamente por citocinas, para produzir IFN- $\gamma$ , são fontes potenciais de IL-4 e/ou IL-13, promovendo a reação do corpo estranho induzindo a fusão de macrófagos para formar FBGCs (ANDERSON et al., 2008).

No nosso estudo, a IL-10 mostrou uma maior expressão nos grupos controle e experimento de 15 dias pós-operatório em relação ao grupo controle e experimento de 30 dias



pós-operatório. A sinalização de IL-10 é um fator importante para atenuar as respostas inflamatórias. A deficiência de IL-10 leva a doenças inflamatórias graves em seres humanos. As células Th17 expressam o receptor IL-10 e podem ser diretamente controlado via IL-10 liberado por células T reguladoras. Outro efeito da sinalização de IL-10 é o reforço da estabilidade das células T reguladoras. Um ambiente com alta expressão de IL-10 inibe ou termina uma resposta imune celular Th17 e aumenta as células T anti-inflamatórias (BROCKMANN et al., 2017). A produção de IL-10 por osteoblastos também promove a auto renovação do HSC em seus nichos localizados na medula óssea (ZUPAN et al., 2013). A IL-10 é responsável por inibir a produção de MMPs metaloproteinases, inibe a apoptose dos condrócitos através da estimulação da síntese de antagonista de IL-1 $\beta$ , que é IL-1Ra e inibidor de tecido de metaloproteinases-1 (TIMP-1), bem como fatores de crescimento. A IL-10 ativa a via quinase SMAD1 / SMAD5 / SMAD8 e ERK1 / 2 MAP e induz a expressão de proteínas morfogenéticas ósseas 2 e 6 (BMP-2, BMP-6) favorecendo a osteogênese. A IL-10 reduz o efeito do TNF- $\alpha$  nos fibroblastos sinoviais reduzindo a expressão dos receptores de TNF- $\alpha$  e, portanto, a sua capacidade de se ligar à superfície dos fibroblastos. O exercício físico leva a uma secreção aumentada de IL-10 nas articulações afetadas pela AO, devido ao efeito indutivo do aumento da pressão intra-articular sobre a secreção celular (WOJDASIEWICZ et al., 2014). IL-10 é uma citocina capaz de inibir células T CD4<sup>+</sup>. A exposição crônica ao TNF- $\alpha$  leva a célula T à hipo-responsividade por desregulação na célula do receptor/CD3 (ANDERSON et al., 2008). Além disso, a IL-10 produzida por células B mostram uma baixa expressão nas fraturas não consolidadas e nos casos de retardo da cura de fraturas, onde correlaciona alta frequência de TCD8<sup>+</sup>, uma célula com alto potencial para estimulação/secreção de TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  (SUN et al., 2017; YANG, S. et al., 2015).

A IL-17 não apresenta expressão nesse estudo. Nossos achados são compatíveis com o estudo de Ono et. al, 2016, que verificou que não houve aumento significativo na expressão de INF- $\gamma$  , IL-4 , IL-17f ou IL-22 na medula óssea ou no tecido de reparação; no entanto, a

expressão de IL-17A no tecido de reparo, não na medula óssea, foi significativamente alto em 2 dias após a lesão. O número de células produtoras de IL-17A no tecido de reparação foi muito pequeno na fase tardia quando ocorreu osteoclastogênese. Estes resultados sugerem que IL-17A desempenha um papel no processo de regeneração óssea após lesão. A fonte de IL-17A, após lesão óssea, foi de 2 até 7 dias no tecido ósseo e foi pouco detectada na medula óssea e no músculo. As células T  $V\gamma 6^+ \gamma \delta$  é a principal fonte de IL-17A no processo de regeneração óssea. As células T, que expressam a cadeia invariante  $V\gamma 6$ , residem principalmente em tecidos epiteliais e promovem a regeneração do epitélio. As células  $T\gamma \delta$  são divididas em subconjuntos que expressam cadeias TCR- $V\gamma$  distintas, cada subconjunto com sua própria distribuição de tecido característica e padrão de produção de citocinas. Aproximadamente 70% das células T  $\gamma \delta$  no tecido de reparação após a lesão expressada  $V\gamma 6$ . Mais de 80% das células T de  $IL-17A^+ \gamma \delta$  foram células  $V\gamma 6^+$ . As células T  $V\gamma 6^+ \gamma \delta$  exibiram um aumento notável no segundo dia após a lesão. As células  $V\gamma 6 + T\gamma \delta$  desempenham um papel fundamental na produção de IL-17A no tecido musculoesquelético, para promover a regeneração óssea após lesão. As células  $T\gamma \delta$  produzem IL-17A quando estimuladas por IL-1b e IL-23, que são expressos rapidamente após a lesão, constituem uma resposta efetiva à fratura e regeneração óssea. IL-17A promove formação óssea através de células mesenquimais associadas a lesões por estimulação da proliferação e diferenciação dos osteoblastos, independente das BMP-2. A expressão de Runx2 e Sp7, os fatores essenciais de transcrição para osteoblastogênese, permaneceram inalterados. Apesar da IL-6 e o  $TNF-\alpha$ , induzidas por IL-17A, conhecidas por promover a cicatrização da fratura óssea, não apresentaram expressão indicando que a IL-17A promove a formação óssea independentemente dessas citocinas. A IL-17A pode, indiretamente, promover a diferenciação osteoblástica através, FGF2, PDGFa, PDGFc e  $TGF-\beta 1$ . IL-17A também desempenha um papel importante na regulação do metabolismo ósseo no contexto da reabsorção óssea em artrite auto-imune: a IL-17A derivada de células Th17 em tecido sinovial inflamado estimula

o ativador do receptor do fator nuclear - expressão de ligando de kB (RANKL) em fibroblastos sinoviais, resultando em reabsorção óssea osteoclástica exagerada. Por outro lado, demonstrou-se que a IL-17A exerce efeitos positivos sobre células mesenquimatosas imaturas, incluindo MSCs e mioblastos. Progenitores osteogénicos, não osteoblastos maduros, são a principal fonte de osteoblastos que participam da regeneração óssea. A ligação da IL-17A com o receptor IL-17R resulta no recrutamento de Act1 e fator associado ao receptor de TNF (TRAF) 2/4/5/6, que ativa o fator nuclear kB, proteína cinases ativadas por mitogénio e C/EBP $\beta$ / $\gamma$ . A especificidade das vias de sinalização é determinada pela interação de Act1 com diferentes moléculas de TRAF. Um estudo recente revelou que a cascata TRAF4 - ERK5 é necessária para a proliferação de células epidérmicas induzidas por IL-17A e é uma via dominante no tumor da pele devido à elevada expressão de TRAF4 (ONO et al., 2016).

A IL-33 não mostrou aumento da expressão nos grupos experimento de 15 e 30 dias de pós-operatório. A expressão endotelial de IL-33 é diminuída durante angiogénese e inflamação vista na cicatrização de feridas e no crescimento tumoral, quando expostas a citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  ou TNF- $\alpha$  (PALMER; GABAY, 2011). IL-33 não afeta a expressão de outras citocinas mielóides, como TGF- $\beta$ , IL-10 e INF- $\gamma$  (PARK et al., 2017). A expressão de ST2 solúvel é aumentada em macrófagos em resposta a LPS e citocinas pró-inflamatórias tais como TNF, IL-1 e IL-6. A IL-33 promove a expressão dos componentes do receptor LPS, como MD2, TLR4, CD14 solúvel e MyD88. Os macrófagos naïve peritoneais induzidos por tioglicol produzem IL-33 após a estimulação LPS, sugerindo que a IL-33 derivada de macrófagos pode aumentar de forma autócrina a ativação de macrófagos mediada por LPS. A produção de citocinas mediada por LPS, como IL-1, IL-6, IL-12 e/ou TNF, por macrófagos cultivados de células da medula óssea de rato ou macrófagos alveolares de ratos é inibida pela adição de proteína solúvel ST2-Fc (OBOKI et al., 2010). A IL-13 aumenta a expressão de ST2 em macrófagos cultivados com células de medula óssea de rato e a IL-33 amplifica a polarização de M2a contribuindo para a indução de respostas imunes do tipo Th2.

Os macrófagos apresentam três populações por estimulação *in vitro* com fatores distintos: M2a estimulado por IL-4, IL-13, M2b estimulado por IL-1 ou por LPS e M2c estimulado por IL-10, TGF- $\beta$  ou glucocorticóide (também chamado de desativado M  $\phi$ ). Os M1 são gerados em resposta a IFN- $\gamma$  e LPS (ou TNF induzidos por componentes bacterianos) e estão envolvidos em respostas imunes de tipo Th1, como defesa do hospedeiro contra vírus e infecções bacterianas e rejeição tumoral pela produção de IL-12, IL-23 e óxido nítrico (OBOKI et al., 2010). Os macrófagos são células que estão presentes em todo o processo de formação cicatrização nesse estudo e são, em parte, responsáveis pela baixa expressão da IL-33 no grupo experimento. Apesar disso, é visto nesse mesmo grupo um aumento de colágeno e diminuição de volume ósseo que pode ser influência dessa citocina nos fibroblastos. Além das células epiteliais e endoteliais, células fibroblásticas e miofibroblastos são fontes de IL-33 durante reparação da ferida. A IL-33 foi identificada também no núcleo de monócitos IL-33 e em adipócitos humanos diferenciados de células tronco da medula óssea. Na tendinopatia, a IL-33 liberada pelas células do tendão lesionado, reprime a expressão de miRNA29a, e isso provoca uma produção aumentada de colágeno tipo 3, o que reduz a resistência à tração (LIEW et al., 2016). A IL-33 exerce efeitos parácrinos em fibroblastos cardíacos em um modelo de hipertrofia cardíaca secundária ao aumento de pressão arterial. O receptor ST2s diminui o colágeno em artrite reumatóide. A IL-33 exerce efeito no aumento da fibrose no fígado sendo os hepatócitos sua principal fonte (PALMER; GABAY, 2011). Em um estudo (MANDELIN et al., 2005) observou que os fibroblastos são capazes de produzir RANKL, OPG e catepsina K. Os resultados indicam que os fibroblastos podem ter potencial para controlar a osteoclastogênese. Fibroblastos sinoviais em artrite reumatóide mostraram favorecer osteoclastogênese, um contato celular direto entre os fibroblastos ou osteoblastos, favorecendo a produção RANKL, pré-requisito para a fusão pré-osteoclástica, que é resultado da inflamação crônica mediada por partículas. O mesmo estudo indica que o RANKL solúvel está presente em fluidos pseudo-sinoviais em pacientes com afrouxamento de próteses

assépticas. O efeito de IL-1b e TNF- $\alpha$  na osteoclastogênese não é necessariamente mediados por seu efeito sobre a produção de RANKL em fibroblastos. Eles têm um efeito sobre os macrófagos e osteoclastos diretamente. Os fibroblastos de tecido não inflamatório e inflamatório produzem e liberam catepsina K. Embora o papel de outras proteinases, como as metaloproteinases de matriz, não pode ser descartada, a produção de catepsina K pode ser especialmente importante no tecido em que o pH baixo favorece sua atividade. 1 $\alpha$ , 25- (OH) 2 vitamina D 3 aumentou os níveis de RNAm de catepsina K (HOU et al., 2001). A produção de catepsina K em fibroblastos sinoviais reumatóide é elevada por estimulação TNF- $\alpha$  e IL-1b. Os fibroblastos de tecido de interface podem ter potencial para controlar a osteoclastogênese durante o afrouxamento das próteses totais de substituição do quadril (MANDELIN et al., 2005). Os linfócitos NKT também estão envolvidos no processo da progressão da fibrose. A participação deste linfócito no encapsulamento fibroso de materiais implantados através da estimulação de macrófagos via IL-13 para produzir fator de crescimento transformador TGF- $\beta$  é outro problema crítico. Um exemplo é encontrado no afrouxamento asséptico de próteses de artroplastia total, onde a resposta fibrótica separa o osso da prótese. A formação de cápsulas fibrosas nesta área leva a micro movimentos que provoca o afrouxamento asséptico da prótese. Assim, a proliferação de fibroblastos e a formação aumentada de matriz extracelular são uma grande falha na variedade de materiais implantados (ANDERSON et al., 2008).

A maior expressão de IL-33 é vista no grupo controle de 15 e 30 dias pós-operatório, na regeneração óssea após ablação de medula óssea. A lesão tecidual após ablação na medula óssea pode ter ocasionado aumento da expressão da IL-33 por lesão celular. A IL-33 funciona como "alarmin", liberada durante a necrose celular, para iniciar respostas imunes. Vários experimentos mostraram que a IL-33 está localizada no núcleo das células endoteliais, epiteliais e de fibroblastos podendo exercer uma atividade transcricional. Além disso, dados recentes sugerem que a IL-33 não pode ser segregada em condições fisiológicas, mas pode ser

liberado durante a necrose celular. Durante a apoptose, IL-33 pode ser inativada após clivagem por caspase-3 e / ou caspase-7. Assim como a IL-1 $\alpha$  e HMGB1, a IL-33 pode ser liberada após trauma ou infecção do tecido e recrutar e ativar Células Th2. Embora a IL-33 possa ser expressa no osso nas células endoteliais, adipócitos e osteoblastos (Figs. 1 e 2) e por células humanas estromais tratadas ou não com TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , não pode ser liberada, a menos que o osso esteja seriamente danificado (SAIDI; MAGNE, 2011).

No grupo controle, existe um balanço positivo entre deposição e reabsorção óssea vista ao final do processo de regeneração. As células T e os macrófagos maduros tem papel significativo no metabolismo ósseo, através da IL-33 para inibir osteoclastos. A medula óssea contém poucas células T sugerindo que os macrófagos maduros são uma população que media a ação da IL-33. Em *vivo*, os macrófagos maduros estão presentes não apenas na medula óssea e macrófagos osteais intimamente associados a osteoblastos na superfície óssea. No entanto, a indução de IL-33 poderia potencialmente exercer ações dependentes de sua localização intracelular, seja autócrino ou como um alarme gerado após a morte celular (SALEH et al., 2011). Esta descoberta está de acordo com estudos recentemente publicados demonstrando uma influência positiva da IL-33 na geração de eosinófilos, basófilos e macrófagos alternativamente ativados. O efeito anti-osteoclastogênico da IL-33 é mediado indiretamente através de citocinas expressas por esses tipos de células. SCHULZE et al., 2011, usou macrófagos RAW264.7 para demonstrar o efeito negativo direto da IL-33 na geração de osteoclastos multinucleados, observado pela influência na expressão de Nfatc1 (fator de transcrição da osteoclastogênese) que regula a expressão de genes (Ctsk, Acp5, Atp6v0d2 e Tm7sf4), que codificam a proteína transmembrana DCSTAMP, essencial para a fusão do precursor de osteoclastos. Todos esses genes foram encontrados expressos em taxas mais baixas em células RAW264.7 tratadas com IL-33. A IL-33 reduz a expressão de genes dependentes de Nfatc1 em células precursoras de osteoclastos, prejudicando assim a sua capacidade de fusão. Isso implica que a regulação da reabsorção óssea é uma das principais

funções da interação IL-33 / ST2 e que a ativação deste sistema pode ser uma abordagem terapêutica para o tratamento de distúrbios da perda óssea (SCHULZE et al., 2011). Joshi et al. (JOSHI et al., 2010) recentemente mostrou que subpopulações distintas de macrófagos humanos respondem de forma diferente à IL-33. Os macrófagos nativos respondem à IL-33 através da elaboração de quimiocinas M1, mas em condições de polarização M1 ou M2, IL-33 favorece a expressão de marcadores de quimiocinas M2 (SAIDI; MAGNE, 2011). A IL-33 está relacionada à IL-1 e à IL-18, que influenciam o metabolismo ósseo, IL-18 em particular inibindo a formação de osteoclastos e contribuindo para ações anabolizantes ósseas da PTH. A IL-33 e seu receptor são expressos em células ósseas, notadamente osteoblastos, e que a IL-33 aumenta a deposição mineral da matriz mediada por osteoblastos e reduz a formação de osteoclastos. Como um inibidor dos sinais canônicos de Wnt, a esclerostina é um potente fator catabólico no osso. Além dos membros da família PTH e IL-6, apenas o descarga mecânica mostrou suprimir a esclerostina, de modo que a descoberta de IL-33 com potencial para atuar como um fator osteoblástico parácrino para reduzir a esclerostina acrescenta conhecimento deste importante fator. A IL-33 que inibe a formação de osteoclastos dependente da dose provocada pela estimulação RANKL / M-CSF. Nas populações de medula óssea e baço, ambas populações heterogêneas contendo progenitores hematopoiéticos, a IL-33 inibe a formação de osteoclastos dependente da dose RANKL / M-CSF. Em co-culturas osteoblastos, a IL-33 também inibe fortemente a formação de osteoclastos e é possível que outras células relacionadas (como células de estroma de medula óssea) possam mediar essas ações de IL-33. Como oncostatin M (OSM é uma citocina pleiotrópica que pertence ao grupo IL-6) e PTH, IL-33 melhora (embora de forma fraca) a expressão de RANKL em osteoblastos (SALEH et al., 2011).

A expressão de INF- $\gamma$  não mostrou expressão nesse estudo para os grupos de 15 dias de pós-operatório e 30 dias pós-operatório. De acordo com os estudos de Ono et al. 2017, INF- $\gamma$  e IL-4, citocinas de perfil Th1 e Th2, respectivamente, não aumentam na fase inicial de

cura (ONO; TAKAYANAGI, 2017). Em resposta a lesões ósseas, os níveis de IFN- $\gamma$  aumentam e permanecem elevados durante a maior parte da cicatrização óssea, retornando à linha de base ao final da fase de remodelação (MOUNTZIARIS; MIKOS, 2008). O interferon gama é uma citocina produzida localmente no microambiente ósseo por células de origem imune (UTSAL et al., 2014). A estimulação de MSCs por citocinas inflamatórias promove a osteogênese através de um mediador parácrino. As MSCs pré-estimuladas com os mediadores inflamatórios IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , elevaram os níveis de secreção de IL-6, HGF, VEGF e TGF- $\beta$ . No entanto, a produção de IL-2, IL-4 e IL-10 não foram alteradas (LI et al., 2016). A citocina pleiotrópica IFN- $\gamma$  exerce efeitos anti-osteoclastogênicos na remodelação óssea fisiológica, pela ligação a receptores de OC específicos e induzindo degradação proteossômica de TRAF6 com consequente inibição do sinal de transdução mediado por RANKL (AGAS et al., 2015; GINALDI; DE MARTINIS, 2016). No entanto, na osteoporose pós-menopausa, inflamação ou infecções, o efeito final de IFN- $\gamma$  é distorcido para a reabsorção óssea através do linfócito T ativado e expressão RANKL. Na verdade, o IFN- $\gamma$  é um estimulador do complexo de histocompatibilidade classe II (MHCII) em APC, com consequente aumento da estimulação das células T através de seu receptor específico de antígeno (TCR), induzindo ainda mais ativação imune e produção de citocinas pró-inflamatórias osteoclastogênicas (GINALDI; DE MARTINIS, 2016). Assim, o IFN- $\gamma$  suprime a osteoclastogênese diminuindo a formação de osteoclastos agindo diretamente nos seus precursores e indiretamente estimulando formação de osteoclastos quando produzida por células T dependente de ativação antígeno celular. Camundongos knockout para receptor de IFN- $\gamma$  exibiram uma redução no volume ósseo e significativa mudanças na estrutura óssea cortical e trabecular típicas para fenótipo osteoporótico, com volume ósseo baixo e diminuição da formação óssea. Além disso, a administração de IFN- $\gamma$  a camundongos ovariectomizados melhorou significativamente a microarquitetura e massa óssea. Estudos em humanos mostraram que células CD4 de mulheres com fraturas osteoporóticas segregaram menos IFN- $\gamma$  do que as mulheres sem



fraturas. A produção de IFN- $\gamma$  no sangue também foram menores na doença de Crohn e correlacionado negativamente com a razão de reabsorção / deposição óssea, ou seja, maior produção de IFN- $\gamma$  foi relacionada ao aumento formação óssea. Assim, esta literatura apoia que IFN- $\gamma$  desempenha um papel central na estimulação do turnover ósseo e massa óssea (UTSAL et al., 2014). INF- $\gamma$  participam da fusão de macrófagos em células gigantes tipo corpo estranho e da atividade osteoclástica. Assim, através da secreção de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IFN- $\gamma$ , os macrófagos promovem ou não a atividade dos osteoclastos. Os macrófagos podem regular a osteoclastogênese induzidos por RANKL. A expressão RANKL é estimulada por fatores osteoclastogênicos, incluindo 1,25-dihidroxivitamina D3, hormônio paratireóide (PTH), prostaglandina E2 (PGE2) e citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-3, IL-6, IL-7, IL-11, IL-17, e TNF- $\alpha$ , caracterizados como moderadores pró-inflamatórios levando a osteoclastogênese patológica via expressão RANKL (AGAS et al., 2015; LOI et al., 2016). Além de IL-4, IL-13 ou  $\alpha$ -tocoferol promoverem a formação de células gigantes multinucleadas de corpo estranho, o IFN- $\gamma$  em conjunto com IL-3 ou fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos também induz a fusão de macrófagos. O resultante são as células gigantes multinucleadas que são as morfologicamente distintas células gigantes do tipo Langhans, que não são encontradas aderentes aos material não absorvível . As células NK são ativadas por interações diretas receptor / ligando e indiretamente por citocinas, por exemplo, para produzir IFN- $\gamma$ . NK/ NKT podem produzir IL-4 / IL-13 que são relevantes para FBGC. Além disso, IL-13 produzido por linfócitos NKT tem sido implicado na progressão da fibrose. A produção de IFN- $\gamma$  é dependente do tipo de superfície do material implantando e do modelo experimental usado (ANDERSON; MCNALLY, 2011).

## 7.0 CONCLUSÃO

Mostramos a importância de elaborar um protocolo de experimentação padronizado, com qualidades biológicas, parâmetros mecânicos, tipo de ossificação embriológica, biocompatibilidade e capacidade osteocondutora dos implantes definidas, pois estes alteram fatores sistêmicos e locais que influenciam os osteoblastos e osteoclastos e sua capacidade de deposição e reabsorção óssea no processo de regeneração óssea.

Os camundongos com implante de algodão não absorvível apresentaram reação de corpo estranho, mostrando células multinucleadas ao redor do fio. Análise morfométrica das fibras colágenas na tíbia de camundongos com implante intramedular não absorvível apresentou aumento gradativo e não houve diminuição desse depósito ao final da regeneração óssea. O volume osseo neoformado intramedular diminuiu, mostrando influência da reação de corpo na ossificação intramembranosa, alterando a quantidade de osso neoformado e aumentando o tempo do processo de regeneração óssea.

Ao analisar a expressão de citocinas, encontramos a expressão de TNF- $\alpha$ , IL-33 e IL-10. A IL-4 não apresentou expressão e o mesmo ocorre com a IL-17 A e INF- $\gamma$ . O aumento de TNF- $\alpha$  por ativação dos macrófagos induz a osteoclastogênese. A IL-10 mostra diminuição da expressão em casos de cicatrização prolongada, o que ocorre no grupo experimento de 30 DPO. A baixa expressão de IL-33 nos grupos experimento é devido à diminuição de sua expressão em contato com TNF- $\alpha$ , e pelos macrófagos, capazes de produzir IL-33 de forma autócrina e ST2 solúvel via LPS em resposta a TNF- $\alpha$ . A IL-33 aumenta o colágeno visto no grupo experimento e reabsorção óssea. Já a lesão tecidual leva à liberação de IL-33, influenciando o metabolismo ósseo.

## 8.0 REFERÊNCIAS

- AGAS, D. et al. The unbearable lightness of bone marrow homeostasis. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 26, n. 3, p. 347-59, Jun 2015.
- AGGARWAL, S.; PITTENGER, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, v. 105, n. 4, p. 1815-22, Feb 15 2005.
- ALEXANDER, K. A. et al. Osteal macrophages promote in vivo intramembranous bone healing in a mouse tibial injury model. **J Bone Miner Res**, v. 26, n. 7, p. 1517-32, Jul 2011.
- ALNAEELI, M.; PENNINGER, J. M.; TENG, Y. T. Immune interactions with CD4+ T cells promote the development of functional osteoclasts from murine CD11c+ dendritic cells. **J Immunol**, v. 177, n. 5, p. 3314-26, Sep 01 2006.
- ANDERSON, J. M.; MCNALLY, A. K. Biocompatibility of implants: lymphocyte/macrophage interactions. **Semin Immunopathol**, v. 33, n. 3, p. 221-33, May 2011.
- ANDERSON, J. M.; RODRIGUEZ, A.; CHANG, D. T. Foreign body reaction to material não absorvível s. **Semin Immunol**, v. 20, n. 2, p. 86-100, Apr 2008.
- BAB, I. A. Postablation bone marrow regeneration: an in vivo model to study differential regulation of bone formation and resorption. **Bone**, v. 17, n. 4 Suppl, p. 437S-441S, Oct 1995.
- BOEHLER, R. M.; GRAHAM, J. G.; SHEA, L. D. Tissue engineering tools for modulation of the immune response. **Biotechniques**, v. 51, n. 4, p. 239-40, 242, 244 passim, Oct 2011.
- BOMBONATO-PRADO, K. F. et al. Alcohol intake and osseointegration around implants: a histometric and scanning electron microscopy study. **Implant Dent**, v. 13, n. 3, p. 238-44, Sep 2004.
- BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S.; LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 337-42, May 15 2003.
- BROCKMANN, L. et al. Regulation of TH17 Cells and Associated Cytokines in Wound Healing, Tissue Regeneration, and Carcinogenesis. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 5, May 11 2017.
- BUSENLECHNER, D. et al. Simultaneous in vivo comparison of bone substitutes in a guided bone regeneration model. **Material não absorvível s**, v. 29, n. 22, p. 3195-200, Aug 2008.
- CHANG, M. K. et al. Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and mouse bone lining tissues and regulate osteoblast function in vitro and in vivo. **J Immunol**, v. 181, n. 2, p. 1232-44, Jul 15 2008.
- CHARATCHAROENWITTHAYA, N. et al. Effect of blockade of TNF-alpha and interleukin-1 action on bone resorption in early postmenopausal women. **J Bone Miner Res**, v. 22, n. 5, p. 724-9, May 2007.

CHARLES, J. F. et al. Inflammatory arthritis increases mouse osteoclast precursors with myeloid suppressor function. **J Clin Invest**, v. 122, n. 12, p. 4592-605, Dec 2012.

CHARLES, J. F.; NAKAMURA, M. C. Bone and the innate immune system. **Curr Osteoporos Rep**, v. 12, n. 1, p. 1-8, Mar 2014.

CHEN, K. et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells hUC-MSCs exert immunosuppressive activities through a PGE2-dependent mechanism. **Clin Immunol**, v. 135, n. 3, p. 448-58, Jun 2010.

CHOI, P.; REISER, H. IL-4: role in disease and regulation of production. **Clin Exp Immunol**, v. 113, n. 3, p. 317-9, Sep 1998.

CHUNG, L. et al. Key players in the immune response to material não absorvível scaffolds for regenerative medicine. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 114, p. 184-192, May 15 2017.

DA SILVA MEIRELLES, L.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **J Cell Sci**, v. 119, n. Pt 11, p. 2204-13, Jun 01 2006.

DANKS, L.; TAKAYANAGI, H. Immunology and bone. **J Biochem**, v. 154, n. 1, p. 29-39, Jul 2013.

DATTA, H. K. et al. The cell biology of bone metabolism. **J Clin Pathol**, v. 61, n. 5, p. 577-87, May 2008.

DELVES, P. J.; ROITT, I. M. The immune system. Second of two parts. **N Engl J Med**, v. 343, n. 2, p. 108-17, Jul 13 2000.

DUCY, P.; KARSENTY, G. Genetic control of cell differentiation in the skeleton. **Curr Opin Cell Biol**, v. 10, n. 5, p. 614-9, Oct 1998.

EINHORN, T. A.; GERSTENFELD, L. C. Fracture healing: mechanisms and interventions. **Nat Rev Rheumatol**, v. 11, n. 1, p. 45-54, Jan 2015.

FERNANDES-NETO, T. S. D. É. R. L. L. Z. N. A. J.; MAGALHÃES, D. D. Bone Graft Materials and their Application in Dentistry. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde** v. 13, n. 2, p. 131-5, 2011.

FORRIOL, F. et al. Bone lengthening osteogenesis, a combination of intramembranous and endochondral ossification: an experimental study in sheep. **Strategies Trauma Limb Reconstr**, v. 5, n. 2, p. 71-8, Aug 2010.

GARTNER, L. P. H., JAMES L. Tratado de Histologia Em Cores. In: BRASIL, E. (Ed.). 3ª, 2007. p.576 páginas. ISBN 8535223479, 9788535223477

GERSTENFELD, L. C. et al. Impaired fracture healing in the absence of TNF-alpha signaling: the role of TNF-alpha in endochondral cartilage resorption. **J Bone Miner Res**, v. 18, n. 9, p. 1584-92, Sep 2003.

GINALDI, L.; DE MARTINIS, M. Osteoimmunology and Beyond. **Curr Med Chem**, v. 23, n. 33, p. 3754-3774, 2016.

GLASS, G. E. et al. TNF-alpha promotes fracture repair by augmenting the recruitment and differentiation of muscle-derived stromal cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 4, p. 1585-90, Jan 25 2011.

GOODNOUGH, L. H. et al. Distinct requirements for cranial ectoderm and mesenchyme-derived wnts in specification and differentiation of osteoblast and dermal progenitors. **PLoS Genet**, v. 10, n. 2, p. e1004152, Feb 2014.

GOSWAMI, J. et al. A bone-protective role for IL-17 receptor signaling in ovariectomy-induced bone loss. **Eur J Immunol**, v. 39, n. 10, p. 2831-9, Oct 2009.

GRIMES, R. et al. The transcriptome of fracture healing defines mechanisms of coordination of skeletal and vascular development during endochondral bone formation. **J Bone Miner Res**, v. 26, n. 11, p. 2597-609, Nov 2011.

GUIHARD, P. et al. Oncostatin m, an inflammatory cytokine produced by macrophages, supports intramembranous bone healing in a mouse model of tibia injury. **Am J Pathol**, v. 185, n. 3, p. 765-75, Mar 2015.

HALL, B. K.; MIYAKE, T. The membranous skeleton: the role of cell condensations in vertebrate skeletogenesis. **Anat Embryol (Berl)**, v. 186, n. 2, p. 107-24, Jul 1992.

HALLAB, N. J.; JACOBS, J. J. Chemokines Associated with Pathologic Responses to Orthopedic Implant Debris. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 8, p. 5, 2017.

HANSON, S.; D'SOUZA, R. N.; HEMATTI, P. Material não absorvível -mesenchymal stem cell constructs for immunomodulation in composite tissue engineering. **Tissue Eng Part A**, v. 20, n. 15-16, p. 2162-8, Aug 2014.

HARADA, S.; RODAN, G. A. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 349-55, May 15 2003.

HORWOOD, N. J. et al. Activated T lymphocytes support osteoclast formation in vitro. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 265, n. 1, p. 144-50, Nov 1999.

HOU, W. S. et al. Cathepsin k is a critical protease in synovial fibroblast-mediated collagen degradation. **Am J Pathol**, v. 159, n. 6, p. 2167-77, Dec 2001.

ISHII, M. et al. The Development of the Calvarial Bones and Sutures and the Pathophysiology of Craniosynostosis. **Curr Top Dev Biol**, v. 115, p. 131-56, 2015.

ITOH, S. et al. Effect of electrical polarization of hydroxyapatite ceramics on new bone formation. **Calcif Tissue Int**, v. 78, n. 3, p. 133-42, Mar 2006.

JACOME-GALARZA, C. E. et al. Identification, characterization, and isolation of a common progenitor for osteoclasts, macrophages, and dendritic cells from murine bone marrow and periphery. **J Bone Miner Res**, v. 28, n. 5, p. 1203-13, May 2013.

JAL, M. C. H. Local Regulators of Bone: IL-1, TNF, Lymphotoxin, Interferon- $\gamma$ , the LIF/IL-6 Family, and Additional Cytokines. In: ELSEVIER (Ed.). **Principles of bone biology**. 3rd ed. San Diego, Calif, 2008. p.1209-34.

JOSHI, A. D. et al. Interleukin-33 contributes to both M1 and M2 chemokine marker expression in human macrophages. **BMC Immunol**, v. 11, p. 52, Oct 19 2010.

KANG, Y. J. et al. A novel function of interleukin-10 promoting self-renewal of hematopoietic stem cells. **Stem Cells**, v. 25, n. 7, p. 1814-22, Jul 2007.

KAWAI, T. et al. Synthetic octacalcium phosphate augments bone regeneration correlated with its content in collagen scaffold. **Tissue Eng Part A**, v. 15, n. 1, p. 23-32, Jan 2009.

KIDO, H. W. et al. Porous bioactive scaffolds: characterization and biological performance in a model of tibial bone defect in rats. **J Mater Sci Mater Med**, v. 26, n. 2, p. 74, Feb 2015.

KOMORI, T. et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. **Cell**, v. 89, n. 5, p. 755-64, May 30 1997.

KONG, Y. Y. et al. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. **Nature**, v. 402, n. 6759, p. 304-9, Nov 18 1999.

KRAMPERA, M. et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 24, n. 2, p. 386-98, Feb 2006.

KRONENBERG, H. M. Developmental regulation of the growth plate. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 332-6, May 15 2003.

LI, C. et al. Paracrine effect of inflammatory cytokine-activated bone marrow mesenchymal stem cells and its role in osteoblast function. **J Biosci Bioeng**, v. 121, n. 2, p. 213-9, Feb 2016.

LIEW, F. Y.; GIRARD, J. P.; TURNQUIST, H. R. Interleukin-33 in health and disease. **Nat Rev Immunol**, v. 16, n. 11, p. 676-689, Nov 2016.

LIN, T. et al. Establishment of NF-kappaB sensing and interleukin-4 secreting mesenchymal stromal cells as an "on-demand" drug delivery system to modulate inflammation. **Cytotherapy**, v. 19, n. 9, p. 1025-1034, Sep 2017.

LOI, F. et al. Inflammation, fracture and bone repair. **Bone**, v. 86, p. 119-30, May 2016.

MAEDA, S. et al. Endogenous TGF-beta signaling suppresses maturation of osteoblastic mesenchymal cells. **EMBO J**, v. 23, n. 3, p. 552-63, Feb 11 2004.

MANDELIN, J. et al. Interface tissue fibroblasts from loose total hip replacement prosthesis produce receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand, osteoprotegerin, and cathepsin K. **J Rheumatol**, v. 32, n. 4, p. 713-20, Apr 2005.

MARIE, P. J.; KASSEM, M. Osteoblasts in osteoporosis: past, emerging, and future anabolic targets. **Eur J Endocrinol**, v. 165, n. 1, p. 1-10, Jul 2011.

MARSELL, R.; EINHORN, T. A. The biology of fracture healing. **Injury**, v. 42, n. 6, p. 551-5, Jun 2011.

MASSAGUE, J. The transforming growth factor-beta family. **Annu Rev Cell Biol**, v. 6, p. 597-641, 1990.

MORAN, M. M. et al. Intramembranous bone regeneration differs among common inbred mouse strains following marrow ablation. **J Orthop Res**, v. 33, n. 9, p. 1374-81, Sep 2015.

MORGAN, E. F. et al. Vascular development during distraction osteogenesis proceeds by sequential intramuscular arteriogenesis followed by intraosteal angiogenesis. **Bone**, v. 51, n. 3, p. 535-45, Sep 2012.

MORI, G. et al. The Interplay between the bone and the immune system. **Clin Dev Immunol**, v. 2013, p. 720504, 2013.

MOUNTZIARIS, P. M.; MIKOS, A. G. Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. **Tissue Eng Part B Rev**, v. 14, n. 2, p. 179-86, Jun 2008.

MURATA, M. et al. Bone augmentation by recombinant human BMP-2 and collagen on adult rat parietal bone. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 28, n. 3, p. 232-7, Jun 1999.

NAKASHIMA, K. et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. **Cell**, v. 108, n. 1, p. 17-29, Jan 11 2002.

NAKASHIMA, T. et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. **Nat Med**, v. 17, n. 10, p. 1231-4, Sep 11 2011.

OBOKI, K. et al. IL-33 and IL-33 receptors in host defense and diseases. **Allergol Int**, v. 59, n. 2, p. 143-60, Jun 2010.

OKRAGLY, A. J. et al. Elevated levels of Interleukin (IL)-33 induce bone pathology but absence of IL-33 does not negatively impact normal bone homeostasis. **Cytokine**, v. 79, p. 66-73, Mar 2016.

ONO, T. et al. IL-17-producing gammadelta T cells enhance bone regeneration. **Nat Commun**, v. 7, p. 10928, Mar 11 2016.

ONO, T.; TAKAYANAGI, H. Osteoimmunology in Bone Fracture Healing. **Curr Osteoporos Rep**, v. 15, n. 4, p. 367-375, Aug 2017.

OTTO, F. et al. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. **Cell**, v. 89, n. 5, p. 765-71, May 30 1997.

PALMER, G.; GABAY, C. Interleukin-33 biology with potential insights into human diseases. **Nat Rev Rheumatol**, v. 7, n. 6, p. 321-9, Jun 2011.

PARK, S. H. et al. IL-33-matured dendritic cells promote Th17 cell responses via IL-1beta and IL-6. **Cytokine**, v. 99, p. 106-113, Aug 10 2017.

PERREN, S. M. Evolution of the internal fixation of long bone fractures. The scientific basis of biological internal fixation: choosing a new balance between stability and biology. **J Bone Joint Surg Br**, v. 84, n. 8, p. 1093-110, Nov 2002.

PINILLA, M. et al. Development of interface in hydroxyapatite implanted in the middle ear of the rat: a light and scanning microscopy study. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 128, n. 1, p. 124-31, Jan 2003.

RAMMELT, S. et al. Collagen type I increases bone remodelling around hydroxyapatite implants in the rat tibia. **Cells Tissues Organs**, v. 178, n. 3, p. 146-57, 2004.

RUNYAN, C. M.; GABRICK, K. S. Biology of Bone Formation, Fracture Healing, and Distraction Osteogenesis. **J Craniofac Surg**, v. 28, n. 5, p. 1380-1389, Jul 2017.

SAIDI, S.; MAGNE, D. Interleukin-33: a novel player in osteonecrosis of the femoral head? **Joint Bone Spine**, v. 78, n. 6, p. 550-4, Dec 2011.

SALEH, H. et al. Interleukin-33, a target of parathyroid hormone and oncostatin m, increases osteoblastic matrix mineral deposition and inhibits osteoclast formation in vitro. **Endocrinology**, v. 152, n. 5, p. 1911-22, May 2011.

SARAIWA, M.; O'GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 3, p. 170-81, Mar 2010.



SATO, K. et al. Prolonged decrease of serum calcium concentration by murine gamma-interferon in hypercalcemic, human tumor (EC-GI)-bearing nude mice. **Cancer Res**, v. 52, n. 2, p. 444-9, Jan 15 1992.

SCHULZE, J. et al. Interleukin-33 is expressed in differentiated osteoblasts and blocks osteoclast formation from bone marrow precursor cells. **J Bone Miner Res**, v. 26, n. 4, p. 704-17, Apr 2011.

SCHWARTZ, Z. et al. Differential effects of bone graft substitutes on regeneration of bone marrow. **Clin Oral Implants Res**, v. 19, n. 12, p. 1233-45, Dec 2008.

SHAPIRO, F. Cortical bone repair. The relationship of the lacunar-canalicular system and intercellular gap junctions to the repair process. **J Bone Joint Surg Am**, v. 70, n. 7, p. 1067-81, Aug 1988.

SHIRANE, H. Y. et al. Material não absorvível Implants in Bone Fractures Produced in Rats Fibulas. **Rev Bras Ortop**, v. 45, n. 5, p. 478-82, Sep-Oct 2010.

SPEZIANI, C. et al. Murine dendritic cell transdifferentiation into osteoclasts is differentially regulated by innate and adaptive cytokines. **Eur J Immunol**, v. 37, n. 3, p. 747-57, Mar 2007.

SPINELLA-JAEGLE, S. et al. Opposite effects of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta1 on osteoblast differentiation. **Bone**, v. 29, n. 4, p. 323-30, Oct 2001.

SUN, G. et al. Regulatory B cell is critical in bone union process through suppressing proinflammatory cytokines and stimulating Foxp3 in Treg cells. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 44, n. 4, p. 455-462, Apr 2017.

SUVA, L. J. et al. Pattern of gene expression following rat tibial marrow ablation. **J Bone Miner Res**, v. 8, n. 3, p. 379-88, Mar 1993.

TAKAYANAGI, H. et al. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. **Nature**, v. 408, n. 6812, p. 600-5, Nov 30 2000.

TRAN, T. H. et al. Role of canonical Wnt signaling/ss-catenin via Dermo1 in cranial dermal cell development. **Development**, v. 137, n. 23, p. 3973-84, Dec 2010.

TRINDADE, R. et al. Foreign Body Reaction to Material não absorvível s: On Mechanisms for Buildup and Breakdown of Osseointegration. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 18, n. 1, p. 192-203, Feb 2016.

UTSAL, L. et al. Serum interferon gamma concentration is associated with bone mineral density in overweight boys. **J Endocrinol Invest**, v. 37, n. 2, p. 175-80, Feb 2014.

WARSHAWSKY, H.; MOORE, G. A technique for the fixation and decalcification of rat incisors for electron microscopy. **J Histochem Cytochem**, v. 15, n. 9, p. 542-9, Sep 1967.

WILLIAMS. The Williams dictionary of material não absorvível s. **Liverpool, UK: Liverpool University Press, 1999.**, 1999.

WILSON, N. J. et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. **Nat Immunol**, v. 8, n. 9, p. 950-7, Sep 2007.

WOJDASIEWICZ, P.; PONIATOWSKI, L. A.; SZUKIEWICZ, D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. **Mediators Inflamm**, v. 2014, p. 561459, 2014.

WU, A. C. et al. Unraveling macrophage contributions to bone repair. **Bonekey Rep**, v. 2, p. 373, 2013.

WU, Y.; HUMPHREY, M. B.; NAKAMURA, M. C. Osteoclasts - the innate immune cells of the bone. **Autoimmunity**, v. 41, n. 3, p. 183-94, Apr 2008.

XIE, C. et al. COX-2 from the injury milieu is critical for the initiation of periosteal progenitor cell mediated bone healing. **Bone**, v. 43, n. 6, p. 1075-83, Dec 2008.

YANG, S. et al. Loss of B cell regulatory function is associated with delayed healing in patients with tibia fracture. **APMIS**, v. 123, n. 11, p. 975-85, Nov 2015.

YANG, X. et al. Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice. **Bone**, v. 41, n. 6, p. 928-36, Dec 2007.

YANG, Z. X. et al. IFN-gamma induces senescence-like characteristics in mouse bone marrow mesenchymal stem cells. **Adv Clin Exp Med**, v. 26, n. 2, p. 201-206, Mar-Apr 2017.

ZHANG, Q. et al. Interleukin-10 inhibits bone resorption: a potential therapeutic strategy in periodontitis and other bone loss diseases. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 284836, 2014.

ZUPAN, J.; JERAS, M.; MARC, J. Osteoimmunology and the influence of pro-inflammatory cytokines on osteoclasts. **Biochem Med (Zagreb)**, v. 23, n. 1, p. 43-63, 2013.

## 9.0 ANEXOS

### Anexo A: parecer do CEUA



**Universidade Federal do Triângulo Mineiro**  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS- CEUA

#### **Parecer Consubstanciado** **PROTOCOLO DE PROJETO COM ENVOLVIMENTO DE ANIMAIS**

##### **IDENTIFICAÇÃO**

**TÍTULO DO PROJETO:** Interação entre reação de corpo estranho e mecanismo de osteogênese  
**PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL:** Prof. Dr. Lenaldo Branco Rocha  
**INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA:** UFTM  
**DATA DE ENTRADA NO CEUA UFTM:** 27/11/2013  
**PROTOCOLO CEUA/UFTM:** 304

#### **SUMÁRIO DO PROJETO**

##### **1. OBJETIVOS (GERAL E ESPECÍFICOS)**

**Objetivos gerais:** avaliar a organização do tecido ósseo após injúria por ablação de medula óssea frente à resposta inflamatória causada pelo implante de material sintético

**Objetivos específicos:** analisar interação entre processo de reparo ósseo; quantificar as lesões causadas pela resposta inflamatória; quantificar a expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias e fatores de crescimento ósseo, neoformação vascular e ossificação.

##### **2. JUSTIFICATIVA**

É o animal modelo para uso no estudo de biocompatibilidade de polímeros e compósitos.

##### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

###### **3.1) Animais:**

Serão utilizados 44 Camundongos da linhagem C57BL6, machos, idade de 7 semanas, procedentes do Biotério da USP – Ribeirão Preto. Os animais serão alojados no biotério dos CEFORES - UFTM em caixas 41cm x 34cm x 16cm, sendo 2 animais por caixa, cama de maravalha. A temperatura ambiente será controlada de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $55 \pm 15\%$  e com ciclo de luminosidade claro e escuro de 12 horas. Os animais receberão ração comercial (Nuvilab) e água à vontade.

###### **3.2) Procedimentos com animais e demais procedimentos:**

Para o procedimento cirúrgico, os animais serão anestesiados pela associação de cloridrato de ketamina – 50 mg/Kg e xilazina- 5mg/ Kg, administrada via IP. A área de acesso cirúrgico sobre as duas tíbias (esquerda e direita) será tricatomizada e a assepsia será feita com clorexidina 2%. Para acessar o canal medular através da diáfise, os músculos são deslocados e um orifício será feito ao nível da borda distal da metáfise com uma broca dentária em baixa rotação. O orifício de acesso é suficientemente pequeno para permitir o controle da hemorragia somente pela sobreposição dos músculos e fechamento da incisão na pele. Uma malha de nylon será introduzida no canal medular, enrolada longitudinalmente, dentro de uma agulha estéril calibre 16. Em seguida será realizada a sutura da incisão com fio de seda 3-0. Os animais serão mantidos com analgesia (Cloridrato de Tramadol – 2mg/kg a cada 12h) por 2 dias. Decorridos os períodos experimentais de 3, 7, 15 e 30 dias, os animais serão eutanasiados com sobredose do anestésico em grupo de 5 (cinco animais por grupo). Os fragmentos de tecido serão fixados em formoldeído 10% imediatamente após a remoção. Serão avaliados a morfologia geral do tecido, fibras colágenas e reticulares respectivamente e imunohistoquímica.





## Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS- CEUA

### Parecer Consubstanciado PROTOCOLO DE PROJETO COM ENVOVIMENTO DE ANIMAIS

#### IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: Interação entre reação de corpo estranho e mecanismo de osteogênese  
PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Prof. Dr. Lenaldo Branco Rocha  
INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM  
DATA DE ENTRADA NO CEUA UFTM: 27/11/2013  
PROTOCOLO CEUA/UFTM: 304

Como parâmetros histológicos serão observados: infiltrado inflamatório, vascularização, reação de corpo estranho (RCE), tecido conjuntivo fibroso (TCF), atividade osteoblástica e neoformação óssea.

### 3. DESCRIÇÃO DOS DESCONFORTOS E RISCOS PARA OS ANIMAIS E DESCRIÇÃO DAS RESPECTIVAS MEDIDAS PREVENTIVAS E CURATIVAS QUANDO NECESSÁRIO

Os animais sentem algum desconforto no pós-operatório, será utilizado o uso de analgésico no pós-operatório como minimização do desconforto da cirurgia. Os desconfortos ou riscos serão minimizados para os animais uma vez que todos os procedimentos que possam causar grande dor aos mesmos serão realizados sob anestesia. Quanto à eutanásia, a mesma será realizada através da administração de dose excessiva de anestésico. Todos os procedimentos realizados no presente estudo seguem os princípios éticos do uso de animais em experimentação

### 4. DESCRIÇÃO DOS DESCONFORTOS E RISCOS PARA AS PESSOAS ENVOLVIDAS NA PESQUISA

O risco envolve a manipulação descuidada dos animais quando conscientes e o mesmo para o instrumental cirúrgico. Alunos envolvidos no experimento serão acompanhados e treinados pelo docente responsável e liberados para fazer os experimentos sem assistência quando julgados aptos. Os equipamentos de proteção individual utilizados serão: Luvas de procedimento, óculos de proteção, avental de manga longa, touca, sapatos fechados.

### COMENTÁRIOS DO RELATOR QUANTO À ESTRUTURA DO PROTOCOLO

Este protocolo obedece aos princípios éticos para a experimentação animal.

**PARECER DA CEUA:** Aprovado em 11/04/2014

*(O relatório anual ou final deverá ser encaminhado pelo Pesquisador um ano após o início do processo).*

**Profª. Drª. Rosângela Soares Chriguer**  
Coordenadora da CEUA/UFTM

Rua Madre Maria José, nº122 – Unidade Administrativa Temporária II - Bairro Abadia CEP: 38025-100  
Uberaba - MG - Telefone: (034) 3318 5764 - E-mail: [ceua@pesqpg.uftm.edu.br](mailto:ceua@pesqpg.uftm.edu.br)

**Anexo B:** Artigo submetido.

**From:** Experimental and Molecular Pathology <[EviseSupport@elsevier.com](mailto:EviseSupport@elsevier.com)>

**Subject:** **Successfully received: submission Foreign body reaction and its influence in the osteogenesis process: an experimental model for Experimental and Molecular Pathology**

**Date:** 21 de março de 2018 17:31:57 BRT

**To:** [lenaldo.uftm@outlook.com](mailto:lenaldo.uftm@outlook.com)

**Reply-To:** [yexmp@elsevier.com](mailto:yexmp@elsevier.com)

*This message was sent automatically. Please do not reply.*

Ref: EMP\_2018\_104

Title: Foreign body reaction and its influence in the osteogenesis process: an experimental model

Journal: Experimental and Molecular Pathology

Dear Dr. Rocha,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Experimental and Molecular Pathology. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at:

[http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL\\_ACR=EMP](http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=EMP) and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Experimental and Molecular Pathology

**Have questions or need assistance?**

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

-----

Copyright © 2018 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.