

Uso de marcadores fluorescentes na engenharia tecidual óssea: estudo piloto

Use of fluorescent markers in bone tissue engineering: pilot study

Raísa Cavalcante Dourado¹, Ana Emília Holanda Rolim², Fabiana Paim Rosa^{3*}

¹Mestre em Odontologia e saúde UFBA; ²Doutora em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas UFBA;

³Doutora em Periodontia UNESP

Resumo

Introdução: a regeneração e o reparo de tecidos ósseos perdidos é objeto de estudo da Bioengenharia Tecidual. O uso de biomateriais substitutos ósseos biomiméticos visa estimular os sistemas celulares e bioquímicos para restabelecer de modo mais eficiente o tecido ósseo nos casos de sua reconstrução. Ao investigar o processo de remodelação, é vital identificar áreas de novo crescimento para avaliar a eficácia dos biomateriais implantados e respectivos regimes de tratamento. A avaliação qualitativa e quantitativa da regeneração óssea pode ser realizada através da aplicação de marcadores como o Xilenol, a Tetraciclina, a Calceína e a Alizarina. A administração desses marcadores de forma associada possibilita ainda marcar sequencialmente camadas de nova deposição e remodelação durante o reparo. **Objetivo:** estabelecer um protocolo para utilização dos marcadores fluorescentes de reparo ósseo xilenol, tetraciclina, calceína e alizarina, em ratos. **Metodologia:** foram utilizados 35 ratos da linhagem Wistar, machos adultos, com massa corpórea entre 350 e 400g, e idade aproximada de 4 a 5 meses, distribuídos randomicamente em 5 grupos experimentais, submetidos à confecção de defeito ósseo circular de 8 mm em região de calvária, e administração dos diferentes marcadores segundo os grupos; XO – Xilenol; Ca – Calceína; Al – Alizarina; Te – Tetraciclina; C – Controle. Após 15 dias de experimento, os animais foram eutanasiados e as calvárias processadas e analisadas por histomorfometria, microscopia de epifluorescência e microscopia de fluorescência. **Resultados:** todos protocolos empregados para utilização dos marcadores fluorescentes xilenol, calceína, alizarina e tetraciclina foram úteis para identificar área de deposição mineral durante o período analisado de regeneração óssea em ratos. As imagens obtidas pela microscopia de fluorescência revela a presença dos marcadores incorporados à matriz óssea neoformada, no entanto a utilização da Alizarina e Calceína dentro dos protocolos testados mostraram-se mais eficientes. **Conclusão:** os protocolos testados nesse estudo apresentaram-se viáveis para utilização em pesquisas envolvendo marcadores de regeneração óssea, com resultados superiores para Alizarina e Calceína.

Palavras-Chaves: Regeneração Óssea. Corantes Fluorescentes.

Abstract

Introduction: The regeneration and repair of lost bone tissues is the subject of a study of Tissue Bioengineering. The use of biomimetic biomaterial bone substitutes aims to stimulate the cellular and biochemical systems to restore more efficiently the bone tissue in the cases of its reconstruction. When investigating the remodeling process, it is vital to identify areas of new growth to evaluate the efficacy of implanted biomaterials and their treatment regimens. The qualitative and quantitative evaluation of bone regeneration can be performed through the use of markers such as Xylenol, Tetracycline, Calcein and Alizarin. The administration of such markers in an associated manner also makes it possible to sequentially mark layers of new deposition and remodeling during the repair. **Objective:** to establish a protocol for the use of fluorescent xyleneol, tetracycline, calcein and alizarin bone repair markers in rats. **Methodology:** thirtyfive male adult Wistar rats with a body mass ranging from 350 to 400 g and approximately 4 to 5 months old were randomly assigned to 5 experimental groups submitted to a circular bone defect of 8 mm in the region of calvaria, and administration of the different markers according to the groups; XO – Xylenol; Ca – Calcein; Al-Alizarin; Te – Tetracycline; C – Control. After 15 days of experiment, the animals were euthanized and the calvaria processed and analyzed by histomorphometry, epifluorescence microscopy and fluorescence microscopy. **Results:** all protocols used for fluorescence markers xyleneol, tetracycline, calcein, alizarin and tetracycline were useful to identify area of mineral deposition during the analyzed period of bone regeneration in rats. The images obtained by fluorescence microscopy revealed the presence of the markers incorporated into the neoformed bone matrix, however the use of Alizarin and Calcein within the protocols tested were more efficient. **Conclusion:** the protocols tested in this study were feasible for use in research involving markers of bone regeneration, with superior results for Alizarin and Calcein.

Key Words: Bone Regeneration. Fluorescent Dyes.

INTRODUÇÃO

A avaliação qualitativa e quantitativa do uso de biomateriais no reparo ósseo pode ser realizada através de

diversas técnicas que percorrem desde a microscopia de luz comum até a difração com radiação iônica (CAMINHA, 2012). Dentre estas, a microscopia de fluorescência permite visualizar a distribuição espacial dos marcadores ósseos num sistema biológico, assim como, observar alterações na intensidade ao emitirem fluorescência após absorção de energia ultravioleta (MARCHI; CASTRO, 2005).

Correspondente/Corresponding: *Fabiana Paim Rosa – Instituto de Ciências da Saúde –UFBA 4º andar, Sala 404 – End: Av. Reitor Miguel Calmon S/N Canela Salvador-Ba CEP: 40231-300 – E-mail: fabianapaim@hotmail.com – Tel:(71)3283-8859

O uso de marcadores fluorescentes permite identificar a direção e localização topográfica da neoformação óssea. Além disso, a associação de marcadores fluorescentes tem sido promissora em estudos envolvendo a análise do reparo ósseo, uma vez que são capazes de marcar sequencialmente camadas de nova deposição e remodelação óssea durante o mecanismo de reparo (STUART; SMITH, 1992). Esta marcação ocorre durante o processo de mineralização devido a incorporação dos marcadores à matriz óssea por meio da união aos íons de cálcio por quelatação (NKENKE et al., 2002).

Embora as propriedades fluorescentes dos marcadores *Xylenol Orange*, Tetraciclina, Calceína e Alizarina sejam amplamente aceitas no reparo ósseo, mais estudos são necessários para estabelecer protocolos que sejam viáveis para a utilização experimental dos fluorocromos no campo de pesquisas de bioengenharia tecidual óssea.

REVISÃO DE LITERATURA

O osso apresenta grande potencial regenerativo espontâneo e está em constante remodelação de sua microestrutura (YANG et al., 2014), entretanto, tal potencial reparativo apresenta limitações especialmente em defeitos ósseos críticos. Nesses defeitos e em situações em que haja quebra da homeostase, há danos funcionais ou estéticos que limitam a qualidade de vida do indivíduo. Tais situações ocorrem em regiões com extenso comprometimento da malha vascular, em anomalias de desenvolvimento, doenças sistêmicas degenerativas, em distúrbios metabólicos, em tumores ósseos, traumas ou infecções e nas lesões ósseas extensas em que o reparo da lesão leva à formação de tecido conjuntivo fibroso cicatricial (BOROJEVIC, 2008).

Os materiais biomiméticos com propriedades similares ao tecido ósseo apresentam grande interesse, não apenas em função de suas propriedades mecânicas e elásticas, mas também devido à ampla utilização que poderiam alcançar à regeneração óssea (ROLIM, 2013). Nesse contexto, um dos focos da bioengenharia tecidual encontra-se na criação de biomateriais nanoestruturados, uma vez que o osso é naturalmente nanoestruturado. Estes biomiméticos são construídos a partir de conceitos inspirados na natureza e devem ser capazes de estimular os sistemas celulares e bioquímicos para restabelecer de modo mais eficiente o tecido ósseo nos casos de sua reconstrução (AZAMI; RABIEE; MOZTARZADEH, 2010). A expectativa, portanto, é que esses materiais tenham performances superiores, principalmente em trabalhos de reconstrução tridimensional em defeitos críticos (ROLIM, 2013).

Os materiais nanoestruturados são muito complexos e o processo biológico que ocorre após a implantação destes materiais em defeitos críticos ainda precisa ser melhor compreendido. Não está claro como os biomateriais nanoestruturados são incorporados ao tecido ósseo neoformado, e desse modo, a administração de marcadores fluorescentes, distinguíveis pela cor por meio da Microscopia de Fluorescência (MF), torna-se um meio promissor

quando associado ao uso de biomateriais, para avaliação do reparo tecidual ósseo induzido.

A presença destes marcadores, em determinado sítio, pode indicar o local, o tempo e a quantidade de deposição óssea, portanto a implantação de biomateriais associados a administração de marcadores fluorescentes permite identificar, em alguns pontos biológicos, se ainda existe e a localização de fragmentos do biomaterial na região do reparo. Sabe-se que estes fragmentos alteram as propriedades mecânicas do tecido neoformado, logo o uso desses marcadores permite ainda compreender de que forma ocorre a deposição do tecido mineralizado e o processo de remodelação (MAEDA, 2013).

A Microscopia de Fluorescência (MF) é uma técnica muito eficaz para otimizar a captação de imagens em pesquisas direcionadas ao tecido ósseo, as quais não são possíveis de se observar com microscópios ópticos tradicionais (YANG et al., 2014). O objetivo da utilização desta técnica é detectar corantes fluorescentes ligados a biomoléculas do tecido ósseo analisado. A distribuição dos marcadores fluorescentes pode ser identificada com precisão pela luz emitida devido a radiação eletromagnética emitida pelas moléculas que absorveram a excitação primária (MARTIN et al., 2002).

Para os princípios de excitação e emissão de fluoróforos, detecção de fluorescência e a descrição dos mecanismos de microscopia de fluorescência, o artigo de Lichtman e Conchello são recomendados para leitura adicional (LICHTMAN; CONCHELLO, 2005). Em resumo, fluorocromos contêm fluoróforos que são moléculas com propriedades fluorescentes. Fluoróforo portanto é um grupo funcional da molécula que absorverá energia de um comprimento de onda específico e posteriormente a emitirá em um outro determinado comprimento de onda maior dentro do espectro da luz visível. Para isso, todas as fontes de luz dos microscópios de fluorescência precisam emitir uma ampla faixa de comprimentos de onda, incluindo ultravioleta e luz visível azul, que são os comprimentos de onda de interesse na microscopia de fluorescência (VONESCH et al., 2006).

Os fluorocromos, quando ligadas a íons de cálcio, podem ser incorporada em locais de mineralização na forma de cristais de hidroxiapatita. Isso significa que a marcação fluorescente indicará todos os locais de formação óssea ou deposição de dentina, além de cartilagem hipertrófica na placa de crescimento (TAGUE; SCHULTZ; MILLER, 2002). A mineralização de superfícies ósseas neoformadas são comumente identificadas com o uso da tetraciclina e outros agentes fluorescentes, como a calceína, alizarina e xilenol. A taxa de aposição óssea na formação de osso novo pode ainda ser calculada quando é empregada uma sequência policromada por administração *in vivo* de agentes fluorescentes e avaliados por Microscopia de Fluorescência. (YANG et al., 2014).

A tetraciclina faz parte de um grupo de antibióticos, policetônicos de largo espectro produzido pelas actinobactérias do gênero *Streptomyces*. É um inibidor da sín-

tese protéica em procariotos. Nos eucariotos é absorvida pelos ossos, por formar quelatos insolúveis com cálcio, zinco, alumínio e ferro, por isso é usada como marcador de crescimento ósseo (FONSECA, 2007).

Outro marcador muito utilizado é a calceína, um éster lipofílico não fluorescente que se difunde no meio celular passivamente e transforma-se em calceína fluorescente por esterases intracelulares. A calceína livre insolúvel, quando hidrolisada, em meio lipídico e com alta carga negativa, é aprisionada dentro de células com membranas intactas torna-se fluorescente a um comprimento de onda de 530 nm (FONSECA, 2007). Este é um marcador cuja ligação com o grupamento acetoximetil impede a emissão de fluorescência pelo bloqueio dos sítios de ligação com o cálcio. Ao penetrar nas células, as enzimas esterases, ativas apenas em células vivas, clivam a ligação com o grupamento AM. A calceína livre conjuga-se ao cálcio intracelular e passa a emitir fluorescência, com coloração verde, quando estimulada pela radiação ultravioleta (CASTRO, 2011).

A alizarina é caracterizado por uma coloração vermelho amarronzada. Este marcador é utilizado em ensaios bioquímicos para determinar quantitativamente, por calorimetria, a presença de deposição calcificada por células de linhagem osteogênica. Além disto, é utilizado, também, como um marcador histoquímico de cálcio, em células de linhagem não osteogênica e um indicador de pH no intervalo da colorimetria. (VERMA; KATTI; KATTI, 2010)

O xilenol é um corante fluorescente vermelho, ligante ao cálcio, capaz de marcar a deposição de osso novo em superfícies de neoformação óssea (ZHANG et al., 2012). A fluorescência deste marcador entra em contraste com a fluorescência de outros corantes conhecidos, permitindo, desta forma, a identificação de regiões com síntese de matriz óssea em períodos distintos. Além disto, os locais de marcação fluorescente são os mesmos para o *xyleneol*, tetraciclina e calceína (RAHN; PERREN, 1971). Por isto, este marcador tem sido utilizado para avaliar o reparo tecidual decorrente da implantação de biomateriais em diferentes pesquisas. As camadas formadas pelos marcadores possibilita a comparação do processo de formação óssea dinâmico no periosteio, e nas regiões de osso cortical e esponjoso (GRASSER, 1997).

A associação de marcadores permite observar a evolução da formação de novos tecidos mineralizados (OTTONI; CHOPARD, 2004; SALMON, 2004). Essa associação entre diferentes marcadores após a implantação de biomateriais tem permitido avaliar o tecido ósseo próximo a superfície do implante (IYAMA et al., 1997). Entretanto, esta associação precisa ser melhor investigada. Segundo Kim et al. (2012) ao avaliarem a taxa de aposição mineral com a administração de calceína e XO, em ratos observaram redução de formação de novo osso e da remodelação.

Conforme Barros (2009), a calceína verde, a alizarina, a oxitetraciclina e a calceína azul são fluorocromos com expressão colorimétrica diferentes, por isso podem promover informações sequenciais sobre o tecido ósseo,

como neoformação e remodelação, quando administradas intercaladamente durante diferentes estágios do processo de cicatrização.

Para que a utilização do protocolo de associação dos marcadores fluorescentes seja confiável no campo da engenharia tecidual óssea, é necessário avaliar o uso isolado de marcadores fluorescentes na neoformação óssea nas diferentes faixas de coloração, por Microscopia de Fluorescência. Assim, o estabelecimento de protocolos individualizados dos fluorocromos xilenol, tetraciclina, calceína e alizarina que sejam viáveis à avaliação da neoformação óssea pode fornecer aplicabilidade para uso dos fluorocromos isolados ou combinados nas pesquisas de bioengenharia tecidual óssea.

METODOLOGIA

Esta pesquisa foi aprovada no Comitê de Ética em Pesquisas no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Bahia (UFBA) sob registro de nº 94/2016, e utilizou protocolos estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), bem como as Normas Nacionais de Biossegurança e as diretrizes do Instituto Nacional de Saúde para o cuidado e uso de animais de laboratório (Publicação nº 85-23, Rev. 1985).

AMOSTRA

A amostra deste estudo foi composta por 25 ratos da linhagem *Wistar*, machos adultos, com massa corpórea entre 350 e 400g, e idade aproximada de 4 a 5 meses, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). Durante todo o experimento os animais foram mantidos em caixas plásticas autoclavadas, forradas com maravalha autoclavada; alimentados com ração Nuvital® (CR-1) e água *ad libitum*.

Para estabelecimento do protocolo do uso de marcadores fluorescentes, os animais foram randomicamente distribuídos em 5 subgrupos (Quadro 1):

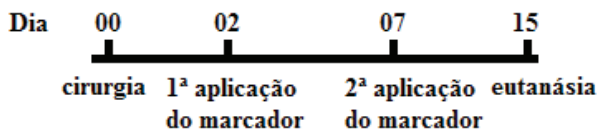
Quadro 1 – Número de animais de acordo com o grupo e ponto biológico.

Tipo de defeito	GRUPOS	15 DIAS
8 mm	XO: confecção do defeito ósseo e administração do Xyleneol Orange	7
	Ca: confecção do defeito ósseo e administração de Calceína	7
	Al: confecção do defeito ósseo e administração de Alizarina	7
	Te: confecção do defeito ósseo e administração de Tetraciclina	7
	C: confecção do defeito ósseo (grupo controle)	7
Total de animais		35

Fonte: Autoria própria

Nos grupos XO, Ca, Al e Te, cada marcador será aplicado duas vezes em cada animal, em períodos de 2 e 7 dias antes de cada ponto biológico avaliado (Figura 1).

Figura 1 – apresentação esquemática da aplicação de cada marcador



Fonte: Autoria própria

PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

O procedimento cirúrgico foi realizado no Biotério da Universidade Estadual de Feira de Santana sob a supervisão de equipe treinada e capacitada. A princípio, os animais foram submetidos à sedação e anestesia geral com injeção intramuscular de cloridrato de xilazina (0,04mL/100g de peso corporal) e cloridrato de quetamina (0,1mL/100g de peso corporal). Em seguida, os animais foram posicionados em decúbito ventral, tricotomizados

em região de calvária e submetidos à antissepsia do campo operatório com álcool iodado.

A técnica cirúrgica empregada na confecção dos defeitos ósseos seguiu o protocolo semelhante ao descrito por Takagi, Urist, 1982 e Rolim, 2013. Nesta técnica, o acesso cirúrgico à porção mediana da calvária é obtido com uma incisão cutânea semilunar com aproximadamente 3 cm de extensão, mediante a utilização de lâmina de bisturi nº 15; seguida da exposição do periósteo e sua remoção para exposição do tecido ósseo. Posteriormente, o defeito ósseo circular não crítico (para os grupos XO; Ca, Al e Te) foi transfixado com aproximadamente 8,5 mm de diâmetro na porção mediana da calvária, entre os vértices da sutura anterior (coronal) e posterior (lambdoidea). Para isto, serão utilizadas fresas trefinas (Dentoflex®) com 8,0 mm de diâmetro, montadas em contra ângulo (Driller®) com redução de 16:1, acoplado em motor para implante (Driller®), a 1500 rpm, sob irrigação constante com solução fisiológica (Figura 2).

Figura 2 – (a) desenho esquemático do defeito crítico na porção mediana da calvária (b) confecção do defeito ósseo com fresa trefina (c) Defeito ósseo crítico confeccionado.



Fonte: Autoria própria

Durante dois dias pós-cirúrgicos, os ratos foram submetidos à analgesia com acetaminofeno (Paracetamol, Tylenol® gotas, 200mg/mL), com dosagem de 80mg/kg/dia diluído na água, pois apesar de ser um antiinflamatório de baixo efeito, estudos anteriores relatam que o mesmo não interfere no reparo ósseo. (BERGENSTOCK et al., 2005; FERRY et al., 2007)

Os marcadores foram administrados por via intraperitoneal dois e sete dias antes do ponto biológico. Após 15 dias de pós-operatório, os animais foram eutanasiados por aprofundamento de anestesia com injeção intraperitoneal de Tiopental (100 mg/Kg) associado a um anestésico local (lidocaína, 10mg/ml). Este método está de acordo com as Diretrizes de Prática da Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal de 2013, e com os métodos estabelecidos na Resolução 1.000/ 2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

MARCADORES FLUORESCENTES

Os marcadores fluorescentes utilizados neste estudo foram o Xylenol Orange (Sigma-Aldrich®), a Calceína (Sigma-Aldrich®), a Alizarina (Sigma-Aldrich®) e a Tetraciclina (Sigma-Aldrich®). O procedimento de aplicação dos

marcadores fluorescentes utilizados neste experimento, referente à via de administração, sequência e dosagem média (por peso corporal), baseou-se em estudos anteriores, os quais utilizaram os mesmos marcadores em ratos *Wistar*. (BEOLCHI, 2009; MAEDA, 2013; O'BRIEN; TAYLOR; LEE, 2002; PAUTKE et al., 2005, 2007). Os fluorocromos foram administrados por via intraperitoneal, conforme a seguinte ordem e dosagem: Xylenol Orange, 90mg/kg; Calceína, 15mg/kg; Alizarina, 30mg/kg; Tetraciclina, 25mg/kg. Foram realizadas administrações duplas destes marcadores de acordo com o grupo e ponto biológico.

ETAPA LABORATORIAL (PROCESSAMENTO)

Todas as etapas laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais (LBTB) no Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da UFBA. Após o sacrifício dos animais, as calvárias foram removidas, reduzidas e fixada em formaldeído tamponado a 4%, por 72 horas. Posteriormente, a calvária foi reduzida e dividida em porção anterior e posterior. A porção posterior foi incluída em resina de metilmetacrilato, com os blocos cortados com 100 µm de espessura para a análise em microscópio de fluorescência. A porção anterior foi

reservada para processamento posterior de descalcificação, inclusão em parafina, e coloração com Hematoxilina-Eosina para avaliação histológica, etapa não realizada nessa fase de estudo piloto.

ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os cortes do grupo controle foram avaliados por microscopia de luz comum, para avaliar o reparo ósseo. Para isto, foi utilizado microscópio de luz comum (DM1000, Leica®, Wetzlar, Germany) com câmera digital DFC 310 FX (Leica®, Wetzlar, Germany), utilizando o Sistema de Análise de Processamento de Imagens QWin 3.1 (Leica®, Wetzlar, Germany).

ANÁLISE DE FLUORESCÊNCIA

A análise de fluorescência foi realizada no laboratório de microscopia eletrônica do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – Fiocruz (CPQGM-FIOCRUZ – Bahia). As leituras foram realizadas através de Microscópio Confocal Leica SP8 (Leica®, Wetzlar, Germany) e em microscopia invertida de epifluorescência (Leica DMI8), acoplados com Câmera DFC 310 FX (Leica®, Wetzlar, Germany), e Sistema de Análise de Processamento de Imagens QWin 3.1 (Leica®, Wetzlar, Germany). Para tanto, foram utilizados filtros específicos para cada marcador, descritos no Quadro 2 e Quadro 3.

Quadro 2 – Comprimentos de onda para aquisição das imagens no confocal

LASER DE EXCITAÇÃO (nm)	488	552	405	488
MARCADOR	XO	Al	Te	Ca
COR	amarela	vermelha	amarela	verde

Fonte: Autoria própria

Quadro 3 – Utilizamos os seguintes comprimentos de onda para excitação para a aquisição das imagens na epifluorescência:

LASER DE EXCITAÇÃO (nm)	460-500	541-551	325-375	460-500
MARCADOR	XO	Al	Te	Ca
COR	amarela	vermelha	amarela	verde

Fonte: Autoria própria

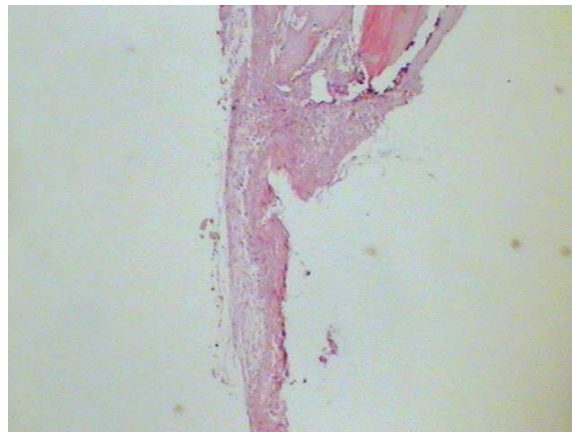
RESULTADOS

Na avaliação histomorfológica do grupo controle aos 15 dias observou-se neoformação óssea reacional restrita às bordas do defeito, e na região central do defeito houve preenchimento por tecido conjuntivo frouxo delgado, bem vascularizado na região voltada à dura-máter, em todos as amostras desse grupo experimental (Figura 3).

As imagens obtidas pela fluorescência mostraram áreas marcadas em vermelho, verde e amarelo que representam regiões de precipitação de cálcio marcadas por diferentes fluorocromos durante a mineralização tecidual em todos grupos experimentais. De acordo com as figuras 4 e 5, a marcação pela Alizarina está representada pela coloração vermelha, a Calceína pela

coloração verde, e os fluorocromos Tetraciclina e Xilenol marcam em amarelo.

Figura 3 – fotomicrografia do grupo controle, 15 dias. Extensão do defeito preenchido com tecido conjuntivo frouxo (Tcf). Neoformação óssea reacional associada à borda óssea (Bo). Região de dura-máter (Rdm). HE. Barra 200µm.



Fonte: Autoria própria

No grupo controle, todos animais apresentaram imagens de locais isolados de mineralização nas bordas do defeito e a marcação por fluorescência não foi observada. Os sítios de mineralização apresentaram características semelhantes com áreas intensamente marcadas em região da borda óssea, em contraste com grandes áreas sem marcação por fluorocromos ou com áreas de marcação mais fraca na região central do defeito ósseo.

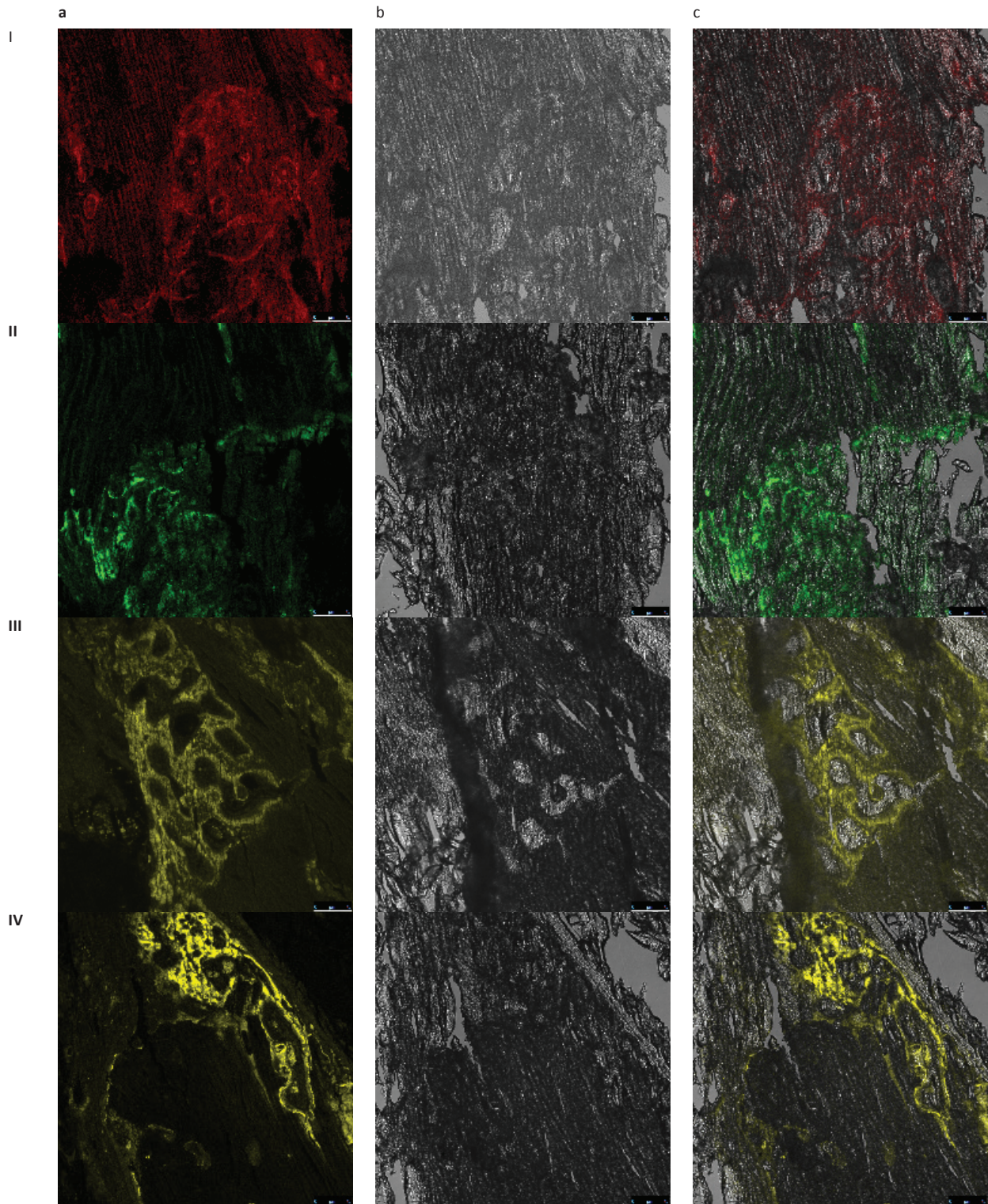
Dentre os marcadores testados, a calceína e a alizarina foram os que mostraram uma marcação mais intensa. As imagens revelaram ainda que uma das superfícies (periosteal ou dural) dos defeitos sempre apresentavam marcação mais extensa, principalmente pela calceína. A calceína (em verde) apresentou locais de marcação com maior densidade e uma tendência de formação óssea em blocos, enquanto que a alizarina (em vermelho) foi caracterizada por marcação menos intensa, com um padrão de formação mais laminar localizada principalmente nas superfícies periosteais.

Foram realizadas análises em lâminas silanizadas e não silanizadas no microscópio confocal e de epifluorescência, e não foi observada diferença entre os resultados. As amostras foram submetidas ao microscópio invertido de epifluorescência e no microscópio confocal de verredura a laser. Obteve-se obtidas aproximadamente 900 imagens dos grupos experimentais, pois na mesma lâmina foram adquiridas imagens em 3 regiões; uma em cada borda e uma na região central do defeito ósseo. As figuras abaixo exemplificam resultados para as duas leituras feitas; no microscópio confocal em objetiva de 10x, sendo utilizados em média 25 planos para cada aquisição de cada imagem reconstruída tridimensionalmente (Figura 4), e o resultado para a leitura em microscopia de epifluorescência.

cia obtida em objetiva de 20x, de um único plano (Figura 5). Em cada região da leitura obteve-se 3 imagens: a do

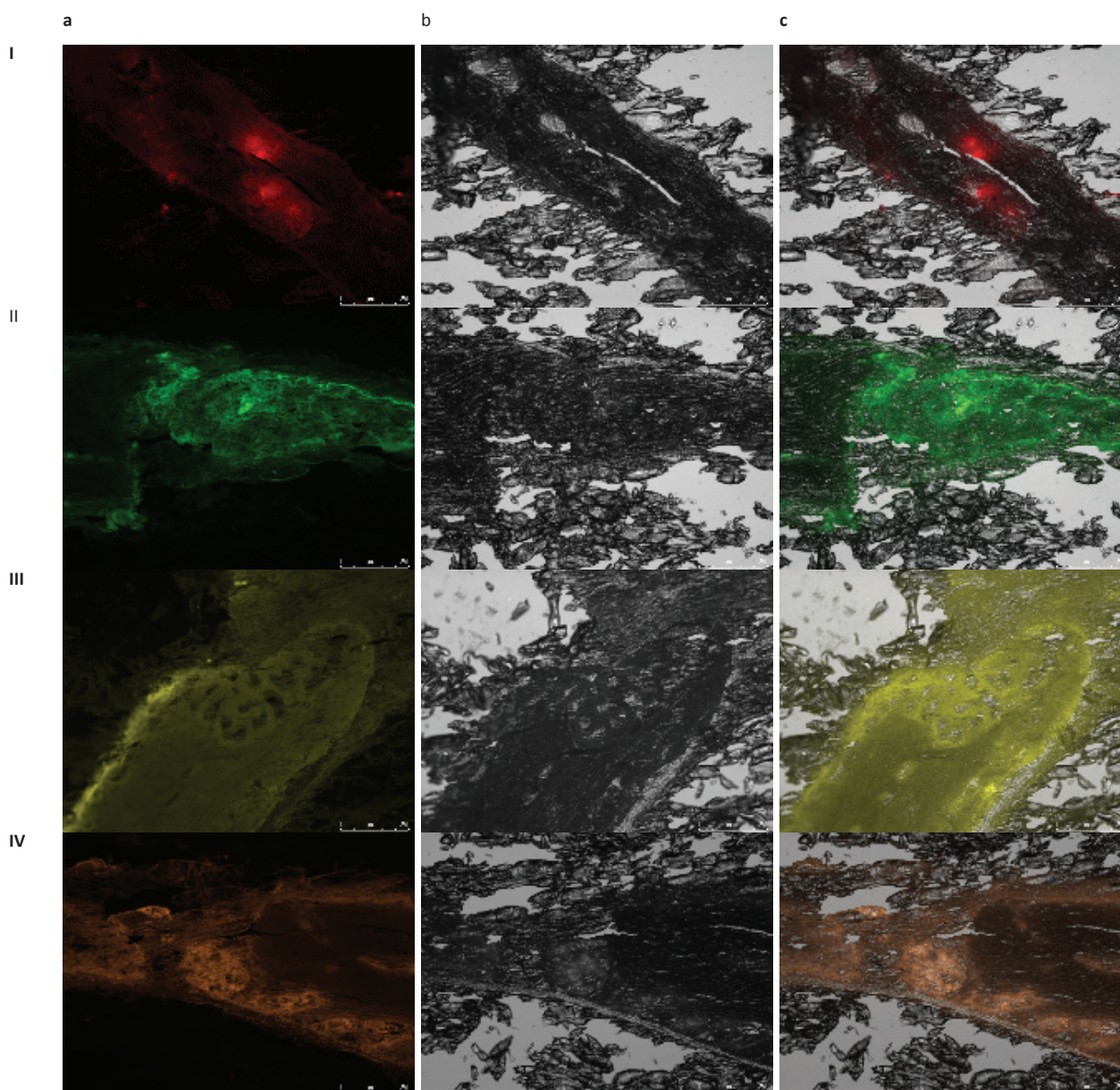
fluorocromo, da imagem por microscopia de contraste por interferência diferencial (DIC), e a sobreposição destas.

Figura 4 – Região de borda óssea evidenciando osso antigo e a neoformação óssea com a fluorescência pela alizarina (I), calceína (II), tetraciclina (III) e xilenol (IV), aos 15 dias. a. fluorocromo; b. filtro; c. sobreposição das imagens anteriores. Microscópio confocal de varredura a laser.



Fonte: Autoria própria

Figura 5 – Região de borda óssea evidenciando osso antigo e a neoformação óssea com a fluorescência pela alizarina (I), calceína (II), tetraciclina (III) e xilenol (IV), aos 15 dias. a. fluorocromo; b. filtro; c. sobreposição das imagens anteriores. Microscópio invertido de epifluorescência.



Fonte: Autoria própria

DISCUSSÃO

O osso é um tecido conjuntivo mineralizado especializado composto por matriz orgânica rica em colágeno tipo I e, principalmente, matriz inorgânica contendo cristais de hidroxiapatita (WHITSON, 1998). A mineralização é um processo complexo que envolve numerosos eventos ainda não totalmente esclarecidos. Após o depósito de matriz osteóide por células osteoblásticas, as fibras de colágeno da matriz apresentam áreas de microtrincas em suas moléculas, onde os íons de cálcio são ligados a proteoglicanos. Sob ação enzimática, as fosfoproteínas ocupam o lugar dos proteoglicanos e iniciam a precipitação

do fosfato de cálcio. Desta forma, a formação de hidroxiapatita começa e os cristais de hidroxiapatita gradualmente ocupam os espaços vazios, expandindo-se entre as fibras e mineralizando completamente o tecido (LIMEBACK, 1991).

A distinção entre tecidos ósseos mais antigos e osso recém modelado é possível pela técnica de fluorescência. O microscópio de fluorescência usa a capacidade de algumas moléculas em fluorescer sob luz ultravioleta, visualizando moléculas autofluorescentes, ou ainda marcando as amostras, com a fluorescência introduzida por meio de fluorocromos. A excitação e a emissão de luz das moléculas fluorescentes com comprimento de onda na

faixa visível são reguladas por filtros para promover cor e contraste (VONESCH et al., 2006).

O espectro de emissão fluorescente está intimamente relacionado ao tipo de microscópio utilizado (TAGUE; SCHULTZ; MILLER, 2002), e nesse estudo, todas as amostras foram submetidas à duas leituras, utilizando tanto o microscópio invertido de epifluorescência com objetiva de 10x, quanto o microscópio confocal de varredura a laser com objetiva de 20x. Observou-se entre esses que a imagem da microscopia confocal representa a melhor escolha para a visualização e morfometria em todos os grupos.

Segundo Van Gaalen (2010), a microscopia confocal permite a reconstrução tridimensional da imagem histológica em três planos, tem alta especificidade de marcação, alto contraste e alto poder de resolução espacial em comparação ao microscópio de epifluorescência, que oferece custo reduzido e rapidez na aquisição das imagens, mas não apresentou viabilidade no presente estudo. O microscópio de epifluorescência não gera imagens seccionadas, e por isso, regiões de dobras na amostra representam uma importante limitação para a aquisição de boas imagens.

O mecanismo de ação dos fluorocromos ainda não está completamente compreendido. Imagens obtidas por esse estudo (Figuras 4 e 5) sugere que esses marcadores estabelecem ligação ao cálcio enquanto disponível na matriz osteoide, antes da formação de cristais de hidroxiapatita. Portanto, os fluorocromos atuam apenas em tecidos submetidos a mineralização, com pouca ou nenhuma afinidade por tecidos já mineralizados. A ausência de marcação sobre as superfícies de osso antigo reforça essa hipótese. De acordo com este processo de incorporação descrito, pode-se considerar as áreas marcadas como novas áreas de formação óssea, que estão em processo de mineralização da matriz osteoide.

Todas amostras do grupo experimental exibiram o evento da osteogênese, sinalizada através da marcação fluorescente. As imagens obtidas através da microscopia de fluorescência permitiram diferenciar o osso recém formado como uma matriz osteoide impregnada por marcador fluorescente que cerca partículas ósseas antigas nas bordas do defeito. Embora não tenha sido calculado o índice de formação óssea, nenhum dos marcadores testados parece ter interferido na osteogênese, pois até mesmo para a Tetraciclina, citada como um potencial inibidor da formação óssea (PARFITT et al., 1990), foi observada marcação de osso recém formado dentro do período analisado de 15 dias pós-cirúrgico.

Embora não haja estudos testando a discrepância entre os fluorocromos, O'Brien, Taylor e Lee (2002) classificaram os fluorocromos de acordo com seu nível de afinidade ao cálcio. A alizarina foi considerada como tendo o maior afinidade, seguido de xilenol, calceína azul, calceína verde e tetraciclina. Dentre os marcadores testados, a marcação com brilho mais intenso observada para alizarina, calceína e xilenol (Figuras 4 e 5) indicariam supostamente áreas com maior precipitação de cálcio. No entanto, considerando que a mineralização ocorreu na

mesma intensidade durante o período avaliado, pode-se considerar que as marcações mais intensas observadas nesse estudo podem indicar maior afinidade da alizarina, calceína e xilenol ao cálcio. Por outro lado, a tetraciclina provocou um padrão de marcação mais discreta.

Embora todos protocolos testados tenham mostrado eficiência para marcação da osteogênese, alguns marcadores mostraram-se desvantajosos ao uso, quando os protocolos são individualmente comparados. Nesse aspecto, em relação ao custo de obtenção, preparo e a administração das substâncias, a alizarina e a calceína foram superiores. Todos os marcadores podem ser preparados na noite anterior à aplicação, acondicionados em geladeira dentro de recipientes fechados de vidro escuro. A única exceção é a tetraciclina, que devido sua vida útil mais curta que os demais marcadores (GUSKUMA et al., 2010), deve ser preparada imediatamente antes da administração no animal, o que representa uma desvantagem em relação ao preparo dos demais fluorocromos.

Outro fator que exerce importância para a comparação dos protocolos é a administração de cada marcador no tecido subcutâneo dos animais. Enquanto que a alizarina, calceína e tetraciclina são aplicados por injeção única, o xilenol requer múltiplas injeções em locais variados do dorso e do abdômen, para distribuição de toda a solução. Dentre os quatro marcadores utilizados nesse estudo, o xilenol é o que requer a maior quantidade de solvente para sua diluição, e, por isso, o volume da solução aplicada no animal é comparativamente nove vezes maior que a Tetraciclina, seis vezes maior que a calceína e três vezes maior que Alizarina. Assim, a aplicação do xilenol oferece maior desconforto ao animal e, além disso, após a aplicação é necessário aguardar entre dois a três dias para que ocorra adequada absorção.

Assim, a alizarina, calceína e xilenol exibiram melhores resultados de fluorescência considerando o período de eutanásia de 15 dias. Como o protocolo do xilenol apresenta uma especificidade desvantajosa, sugere-se entre os quatro marcadores testados a alizarina e a calceína como melhores marcadores individuais. Consideramos portanto o xilenol como um dos piores marcadores, ao lado da tetraciclina, que exibiu marcação mais discreta, e uma dificuldade adicional no preparo.

Sabe-se que os fluorocromos podem ser utilizados de forma combinada em intervalos de tempo específicos e esse método permite evidenciar camadas sequenciais de aposição óssea no tempo (YANG et al., 2014). No campo da pesquisa com biomateriais faz-se necessário identificar fragmentos dos biomateriais incorporados à matriz óssea e os diferentes períodos de deposição mineral durante o processo de reparo ósseo. A utilização destes marcadores combinados poderá futuramente contribuir com a redução do número de animais sacrificados, pois em um mesmo animal pode-se obter informações de diversos períodos de tempo. Para esta finalidade, todos os marcadores testados incluindo a tetraciclina e o xilenol são supostamente úteis, pois esse método de estudo para

ser efetivo depende da visualização ao redor de implantes enxertados de depósitos de marcadores na sequência de sua administração, sendo que a qualidade de marcação de cada fluorocromo em si não é prioritária para estudos com marcadores combinados.

CONCLUSÃO

Os protocolos para marcação fluorescente foram testados individualmente, e as imagens captadas asseguram que os fluorocromos testados foram incorporados na matriz óssea neoformada. Foi possível identificar o osso recém modelado pelo marcadores fluorescentes e a capacidade de correlacionar as micrografias visuais com outros tipos de análise fornecem um método confiável para avaliar o tecido ósseo em estudos de bioengenharia tecidual. Os quatro protocolos individuais testados para os marcadores xilenol, alizarina, calceína e xilenol apresentaram-se viáveis, entretanto o uso da alizarina e calceína apresentaram-se mais vantajosos.

REFERÊNCIAS

- AZAMI, M.; RABIEE, M.; MOZTARZADEH, F. A porous gelatin/hydroxyapatite nanocomposite scaffolds for bone repair: in vitro and in vivo evaluation. **J. biomaterial Science**, Utrecht, v. 31 n. 12, p. 2112-2220, 2010.
- BARROS, R. R. M. **Dinâmicas da remodelação óssea ao redor de superfícies bioativas de implante**: análise de fluorescência em cães. 2009. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.
- BEOLCHI, R. S. **Adição de complexo vitamínico em duas biocerâmicas e seu efeito na regeneração óssea**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência na área de Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- BERGENSTOCK, M. et al. A comparison between the effects of acetaminophen and celecoxib on bone fracture healing in rats. **J. orthop. trauma**, New York, v. 19, n.10, p. 717-723, Dec. 2005.
- BOROJEVIC, R. Terapias celulares e bioengenharia. **Gazeta Médica da Bahia**, Salvador, v. 78, supl. 1, p. 42-46, 2008.
- CAMINHA, M. W. **Caracterização físico-química de onze biomateriais de enxertos ósseos utilizados na implantodontia**. 2012. 35f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade do Grande Rio, Escola de Ciências da Saúde, 2012.
- CASTRO, S. V. **Criopreservação de tecido ovariano caprino**: eficiência de diferentes agentes crioprotetores. 2011. 130f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2011.
- FERRY, S.T. et al. The effects of common anti-inflammatory drugs on the healing rat patellar tendon. **Am. j. sports med.**, Baltimore, v. 37, n.8, p. 1326-1333, 2007.
- FONSECA, F. M. **Biocerâmicas porosas bifásicas e trifásicas à base de hidroxiapatita produzidas por gelcasting**. 2007. 102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia dos Materiais) – Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2007.
- GRASSER, J. A. Quantitative assessment of bone mass and geometry by pQCT in rats in vivo and site specificity of changes at different skeletal sites. **J. Jpn Soc. Bone Morphom.**, [S.l.], v. 7, p.107-114, 1997.
- GUSKUMA, M. H. et al. Bone regeneration in surgically created defects filled with autogenous bone: an epifluorescence microscopy analysis in

rats. **J. app., oral sci.**, Buaru, v. 18, n. 4, 2010.

- IYAMA, S. et al. A study of the regional distribution of bone formed around hydroxyapatite implants in the tibiae of streptozotocin induced diabetic rats using multiple fluorescent labeling and confocal laser scanning microscopy. **J. Periodontol.**, Indianapolis, v. 68, n. 12, p.1169-1175, 1997.
- KIM, H. J. et al. Plasma membrane calcium ATPase regulates bone mass by fine-tuning osteoclast differentiation and survival. **J. cell biol.**, New York, v.199, n. 7, p.1145-1158, 2012.
- LIMEBACK, H. Molecular mechanisms in dental hard tissue mineralization. **Curr. Opin. dent.**, Philadelphia, v.1, n.6, p. 826-835, 1991.
- LICHTMAN, J.W.; CONCHELLO, J.A. Fluorescence microscopy. **Nat. methods**, New York, v.2, n. 12, p. 910-919, 2005.
- MAEDA, N. T. **Avaliação da neoformação óssea em tibia de coelho utilizando cúpula de HA associada a diferentes biomateriais**. 2013. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2013.
- MARCHI, E. C. S.; CASTRO, D. M. De. **Revisão de microscopia**. Ministério da Educação e do Desporto, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2005.
- MARTIN, I. et al. Fluorescence microscopy imaging of bone for automated histomorphometry. **Tissue Eng.**, [s.l.] v. 8, n.5, p.847-852, 2002.
- NKENKE, E. et al. Análise microscópica histomorfométrica e fluorescência de remodelação óssea após a instalação dos implantes utilizando uma técnica osteótomo. **Clin. res implantes orais**, [s.l.], v. 13, n. 6, p. 595-602, 2002.
- O'BRIEN, F. J.; TAYLOR, D.; LEE, C. An improved labelling technique for monitoring microcrack growth in compact bone. **J. biomech.**, Elmsford, v. 35, n. 4, p.523-526, 2002.
- OTTONI, C. E. C.; CHOPARD, R. P. Histomorphometric Evaluation of New Bone Formation in Diabetic Rats Submitted to Insertion of Temporary Implants. **Braz. dent. j.**, Ribeirão Preto, v.15, n. 2, p.87-92, 2004.
- PARFITT, A. M. Bone forming cells in clinical disorders. In: HALL, B.K. (ed). **Bone: a treatise**. Caldwell: Teford Press, 1990. v. 1
- PAUTKE, C. et al. Polychrome labeling of bone with seven different fluorochromes: enhancing fluorochrome discrimination by spectral image analysis. **Bone**, New York, v. 37, n. 4, p. 441-445, 2005.
- PAUTKE, C. et al. New advances in fluorochrome sequential labelling of teeth using seven different fluorochromes and spectral image analysis. **J. Anat.**, London, v. 210, p.117-121, 2007.
- RAHN, B. A.; PERREN, S. M. Xylenol orange, a fluorochrome useful in polychrome sequential labeling of calcifying tissues. **Stain technol.**, Baltimore, v. 46, n. 3, p.125-129, May 1971.
- ROLIM, A. E. H. **Estudo in vivo de materiais biomiméticos, associados ou não à administração enteral de estrôncio, para o reparo de defeito ósseo**. 2013. 215f. il. Tese (Doutorado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.
- SALMON, C. R. **Remodelação óssea do periodonto de incisivo de Rato em erupção normal e alterada**: estudo com Marcadores fluorescentes. 2004. 40 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Buco-Dental, área Histologia) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Piracicaba, 2004.
- STUART, A. J.; SMITH, D. A. Use of the fluorochromes xylenol orange, calcein green, and tetracycline to document bone deposition and remodeling in healing fractures in chickens. **Avian dis.**, Amherst, v. 36,

n.2, p. 447-449, Apr-June 1992.

TAGUE, T. J.; SCHULTZ, C. P.; MILLER, L. Analysis of bone utilizing infrared and raman chemical imaging. **Microw. microanal.**, New York, v. 8, Supl. 2, 2002. DOI 10.1017.S14319276021041931512CD.

VAN GAALEN, S. et al. Use of fluorochrome labels in in vivo bone tissue engineering research. **Tissue Eng. Part. B Rev.**, New Rochelle, v. 16, n. 2, p. 209-217, 2010. DOI: 10.1089=ten.teb.2009.0503.

VONESCH, C. et al. The colored revolution of bioimaging. **IEEE Signal Processing Magazine**, [S.l.], v. 23, n. 3, p. 20-31, 2006.

VERMA, D.; KATTI, K. S.; KATTI, D. R. Osteoblast adhesion, proliferation and growth on polyelectrolyte complex-hydroxyapatite nanocomposites.

Philos Trans. A Math Phys Eng. Sci., [S.l.], v. 368, n.1917, p.2083-2097, Apr. 2010.

WHITSON, S.W. Bone. In: TEN CATE, R. (Ed.) **Oral histology – development, structure, and function**. 5th ed. St Louis: Mosby, 1998. p.104-127.

YANG, X. et al. New Bone formation and microstructure assessed by combination of confocal laser scanning microscopy and differential interference contrast microscopy. **Calcif. Tissue Int.**, Berlin, v. 94, n. 3, p.338-347, 2014.

ZHANG, G. et al. A delivery system targeting bone formation surfaces to facilitate RNAi-based anabolic therapy. **Nat. med.**, New York, v.18, n.2, p.307-314, 2012.

Submetido em: 14/11/2018

Aceito em: 29/11/2018