



Universidade Federal da Bahia
Faculdade de Odontologia
Mestrado em Odontologia

FLÁVIO AUGUSTO AQUINO CARVALHO

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DE MATRIZES TRIDIMENSIONAIS DE
QUITOSANA PARA A BIOENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA**

Salvador
2008

FLÁVIO AUGUSTO AQUINO CARVALHO

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DE MATRIZES TRIDIMENSIONAIS DE
QUITOSANA PARA A BIOENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Fabiana Paim Rosa

Salvador
2008

TERMO DE APROVAÇÃO

FLÁVIO AUGUSTO AQUINO CARVALHO

AVALIAÇÃO *IN VIVO* DE MATRIZES TRIDIMENSIONAIS DE QUITOSA PARA A BIOENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Fabiana Paim Rosa – Orientadora _____
Doutora em Periodontia, Universidade Estadual Paulista (UNESP)
Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Prof. Dr. Élcio Marcantônio Jr. _____
Doutor em Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP)
Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Profa. Dra. Luciana Maria Pedreira Ramalho _____
Doutora em Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Salvador, 18 de abril de 2008.

A Kátia, Artur e Mateus, pelo carinho, cumplicidade e amor que nos une.

Aos meus pais Gileno e Maria do Socorro, minha infindável gratidão.

AGRADECIMENTOS I

A Deus todo poderoso, por estar presente em todos os momentos de minha vida.

E ao Senhor do Bonfim da Bahia.

AGRADECIMENTOS II

À Profa. Dra. Fabiana Paim Rosa, minha orientadora, pela dedicação, determinação e conduta acadêmica durante o período que estive sob sua batuta. Seguirá sempre como exemplo em minha caminhada.

Aos Profs. Drs Edmar José Borges de Santana, Luciana Maria Pedreira Ramalho e Jean Nunes dos Santos pela atenção dispensada durante o período em que estiveram coordenando o Curso de Mestrado em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia - UFBA.

Ao Prof. Dr. Aryon A. Barbosa Júnior, do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (CPqGM-Fiocruz), pela valiosa colaboração durante a leitura e documentação dos resultados desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Mauro Guilherme de Barros Quirino Martins, Diretor da Faculdade de Ciência Biológicas e da Saúde (FCBS) da Fundação Educacional Jayme de Altavila - FEJAL/CESMAC- Maceió-Al, pelo apoio e incentivo nesta jornada.

À Profa. Dra. Izabel Maria Santana Ramos de Freitas Amaral, do Departamento do Instituto de Engenharia Biomédica INEB – Universidade do Porto – Portugal, pelo preparo, caracterização e desenvolvimento das matrizes de quitosana utilizadas neste trabalho.

À amiga Profa. Rhyna Carla Cunha, pela amizade e parceria durante a realização deste trabalho.

Ao amigo Prof. Diogo Câmara, Médico Veterinário responsável pelo Biotério da FCBS/FEJAL/CESMAC, pela amizade e cuidado com a saúde dos animais que fizeram parte do experimento deste trabalho.

Aos Funcionários Sr. João, Carlos e Karine, técnicos do Biotério FCBS/FEJAL/CESMAC, pela disponibilidade e atenção durante a realização do experimento deste trabalho.

À funcionária Cristina, do CPqGM – Fiocruz, pelo cuidado e atenção durante o processamento histotécnico das lâminas apresentadas neste trabalho.

Ao funcionário Cristóvão do Laboratório de Biomateriais do Instituto de Ciências da Saúde – ICS / UFBA pela atenção e disponibilidade.

Aos colegas de turma Manoela, Lúcio, Letícia, Maíra, Thiago, Margareth, Leonardo, Caliandra, Jorge, Cristiano, Bárbara, Gleicy, Larissa, Rosângela, Adna, Danilo e Kátia, pelo companheirismo durante nossa caminhada, novos amigos conquistados na Bahia.

A Sueli Aparecida Tavares da Paixão, funcionária do Departamento de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia, pela atenção dispensada a mim durante toda esta temporada.

“ Vós sois os arcos dos quais vossos filhos são arremessados como flechas vivas
O arqueiro mira o alvo na senda do infinito e vos estica com toda a sua força
Para que suas flechas se projetem, rápidas e para longe.
Que vosso encurvamento na mão do arqueiro seja vossa alegria:
Pois assim como ele ama a flecha que voa,
Ama também o arco que permanece estável.”

Gibran Khalil Gibran

RESUMO

Este estudo avaliou o comportamento histomorfológico *in vivo* de matrizes tridimensionais de quitosana com 4% e 15% de graus de acetilação, em um defeito crítico de 9mm de diâmetro criado em calvária de rato. Sessenta ratos *Wistar albinus*, dispostos em três grupos, foram avaliados. No grupo GI (grupo controle) o defeito foi preenchido apenas com coágulo sanguíneo; no grupo GII, o defeito foi preenchido com uma biomatriz de quitosana de 4% de grau de acetilação; no grupo GIII o defeito foi preenchido com uma matriz de quitosana de 15% de grau de acetilação, avaliados nos pontos biológicos de 7, 15, 45 e 120 dias. Os resultados demonstraram não haver diferenças significantes entre os grupos avaliados, quanto ao reparo ósseo, que se manteve limitado às bordas ósseas do defeito, de forma reparativa. Os grupos GII e GIII apresentaram uma reação inflamatória predominantemente granulomatosa, com deposição de tecido fibroso entre os biomateriais implantados. Concluiu-se que ambos os biomateriais foram biocompatíveis, entretanto não houve neoformação óssea associada à sua implantação.

Palavras-Chave: Biomaterial; Bioengenharia tecidual; Defeito crítico; Matriz tridimensional; Quitosana; Regeneração Óssea.

ABSTRACT

This study evaluated the histomorphological behavior *in vivo* of tridimensional matrices of chitosan with 4% and 15% degrees of acetylene process, in a 9mm critical size defect of diameter created in rat calvaria. Sixty rats *Wistar Albinus*, disposed in three groups were evaluated. In the GI group (control group) the defect was filled only with blood coagulant; in the GII group, the defect was filled with a chitosan scaffold of 4% degree of acetylation; in the GIII group, the defect was filled with a 15% of acetylation chitosan matrix, evaluated in the biological points of 7, 15, 45 and 120 days. The results demonstrated that there were no significant differences amongst the evaluated groups, concerning the osseous repair, which remained limited to the osseous edges of the defect, in a repairing way. The GII and GIII groups presented an inflammatory reaction predominantly granulomatose, with fibrous tissue deposition among the implanted biomaterials. It is possible to conclude that both biomaterials were biocompatible, however, there was no osseous neoformation associated to the implantation of them.

Key-words: Biomaterial; Tissue Bioengineering; Critical Size Defect; Tridimensional Matrix; Chitosan; Osseous Regeneration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Representação esquemática da estrutura molecular da quitina e da quitosana	34
Figura 2 –	Fotografia da Microscopia eletrônica de varredura das biomatrizes 3D planas de quitosana. Imagens correspondentes aos cortes seccionais transversais das biomatrizes preparadas: (a e b) quitosana com 4% de acetilação e (c,d) quitosana com 15% de acetilação	49
Figura 3 –	Incisão bicoronal na calvária do animal	51
Figura 4 –	Posicionamento da trefina circular, durante a realização do procedimento de transfixação da calvária do animal	52
Figura 5 –	Vista superior do defeito crítico após remoção do bloco ósseo	52
Figura 6 –	Desenho esquemático da vista frontal da posição do defeito criado na calvária do animal	53
Figura 7 –	Desenho esquemático da vista lateral da posição do defeito criado na calvária do animal	53
Figura 8 –	Implantação da biomatriz 3D no defeito crítico criado na calvária do animal	54
Figura 9 –	Desenho esquemático das linhas de referência utilizadas para o corte dos espécimes	56
Figura 10 –	a. Vista esquemática superior da calvária animal, o tracejado, corresponde as linhas de orientação para os cortes anterior e posterior da peça. b. Vista esquemática lateral da calvária do animal, visão lateral do defeito. c. Vista esquemática do corte frontal da calvária do animal. d, Perspectiva esquemática da calvária e do respectivo defeito crítico, preenchido com a biomatriz	56
Figura 11 –	Desenho esquemático, da área seccional do de defeito, após corte no micrótomo	58
Figura 12 –	GI 7D HE. Borda óssea remanescente do defeito (BO), com proliferação óssea reacional (POR), e no interstício tecido conjuntivo fibroso (TCF). Região do retalho (RRE); Região da dura máter (RDM)	60

- Figura 13 – **GI 15D HE 1X.** Área central do defeito, preenchida por tecido conjuntivo fibroso (TCF). Região do retalho (**RRE**); Região da dura máter (**RDM**) 61
- Figura 14 – **GI 15D HE.** Área central do defeito, preenchida por tecido conjuntivo fibroso (**TCF**), em destaque a veia central (**VC**). Região do retalho (**RRE**); Região da dura máter (**RDM**) 61
- Figura 15 – **GI 15D HE.** Área central do defeito, preenchida por tecido conjuntivo fibroso delgado (**TCFD**), com redução da espessura do defeito. Região do retalho (**RRE**); Região da dura máter (**RDM**) 62
- Figura 16 – **GI 45D HE.** Tecido conjuntivo fibroso (**TCF**), na área central do defeito, com redução linear da sua espessura. Região do retalho (**RRE**); Região da dura máter (**RDM**) 63
- Figura 17 – **GI 45D HE.** Aspecto da borda óssea (**BO**) com discreta ossificação reparativa, e o interstício preenchido com tecido conjuntivo fibroso (**TCF**). Região do retalho (**RRE**); Região da dura máter (**RDM**) 63
- Figura 18 – **GI 45D HE.** Área central do defeito, preenchida por tecido conjuntivo fibroso (**TCF**), em detalhe a veia central (**VC**). Região do retalho (**RRE**); Região da dura máter (**RDM**) 64
- Figura 19 – **GI 45D GOLD.** Proliferação de células fusiformes (fibroblastos) (**FB**); pigmentos acastanhados de hemossiderina (**HM**). Vaso sanguíneo (**V**) 64
- Figura 20 – **GI 120dias HE.** Borda óssea (**BO**) sem proliferação óssea reparativa, presença de tecido conjuntivo fibroso (**TCF**), no interstício. Região do retalho (**RRE**); Região da dura máter (**RDM**) 65
- Figura 21 – **GI 120dias HE.** Área central do defeito, com núcleo de mineralização (**NM**) esporádico, contaminante e focal. Veia central (**VC**). Região do retalho (**RRE**); Região da dura máter (**RDM**) 66
- Figura 22 – **GII 7dias HE.** Região próxima à borda óssea (**BO**), com área de deposição de tecido conjuntivo fibroso (**TCF**) na interface entre a borda e o biomaterial (**BM**). Região do retalho (**RRE**); Região da dura máter (**RDM**) 67
- Figura 23 – **GII 7dias HE.** Reação inflamatória com mononucleares (**MNN**) e polimorfonucleares (**PMN**), associadas ao biomaterial (**BM**). Célula gigante (**CG**); Edema (**ED**) 68

Figura 24 –	GII 7dias PIFG. Biomaterial (BM) associado à reação inflamatória, com presença de tecido conjuntivo fibroso (TCF) com migração centrípeta. Região do retalho (RRE); Região da dura máter (RDM)	68
Figura 25 –	GII 7dias PIFG. Detalhe da figura anterior, com destaque para deposição centrípeta de tecido conjuntivo fibroso (TCF) de permeio ao biomaterial (BM). Dura máter (DM)	69
Figura 26 –	GII 7dias. PIFG Luz Polarizada. Detalhe da figura anterior, em que o biomaterial (BM) aparece polarizado em cor branca e colágeno (C). em cor avermelhada	69
Figura 27 –	GII 7dias PIFG. Fibras colágenas (FC) de permeio ao biomaterial e reação granulomatosa sobre o biomaterial (BM). Células gigantes (CG)	70
Figura 28 –	GII 7dias PIFG. Fragmentos do biomaterial (BM). Presença de células mononucleares (MNN) e deposição de fibras colágenas (FC)	70
Figura 29 –	GII 7dias GOLD. Biomaterial (BM) com deposição de tecido conjuntivo (TC), presença de células inflamatórias e fibroblastos (FB)	71
Figura 30 –	GII 7dias GOLD. Áreas hemorrágicas de permeio ao biomaterial (BM). Hemáceas (He)	71
Figura 31 –	GII 7dias HE. Presença de células gigantes (CG) sobre o biomaterial (BM). Tecido conjuntivo fibroso (TCF); Fibroblastos (FB)	72
Figura 32 –	GII 15dias HE. Aspecto da área central do defeito caracterizado pela deposição de tecido conjuntivo fibroso (TCF) entre o biomaterial (BM)	73
Figura 33 –	GII 15dias GOLD. Presença de tecido conjuntivo fibroso (TCF) e reação granulomatosa, células fusiformes (CF) e vasos sanguíneos (V)	73
Figura 34 –	GII 15dias GOLD. Detalhe da figura anterior. Biomaterial (BM); Células fusiformes (CF); Tecido conjuntivo fibroso(TCF). Células Mononucleares, (MNN)	74
Figura 35 –	GII 15 dias GOLD. Ampliação da figura anterior. Em destaque a presença de células mononucleares (MNN); e biomaterial (BM)	74
Figura 36 –	GII 45dias GOLD. Maior dissociação do biomaterial (BM), reação granulomatosa e deposição de tecido conjuntivo (TCF).	

	Presença de vasos sangüíneos (VS) e células gigantes (CG)	75
Figura 37 –	GII 45dias HE. Tecido conjuntivo fibroso (TCF), células gigantes (CG) sobre os fragmentos do biomaterial (BM)	76
Figura 38 –	GII 45dias PIFG. Migração centrípeta de tecido conjuntivo (TCF) sobre o biomaterial (BM), com a mesma tendência de migração de células gigantes (CG). Biomaterial em dissociação. Dura máter (DM); Colágeno (C)	76
Figura 39 –	GII 45dias PIFG. Detalhe da figura anterior, com destaque para células gigantes (CG), e fibras colágenas (FC) entre o biomaterial (BM)	77
Figura 40 –	GII 45dias GOLD. Reação granulomatosa sobre o biomaterial (BM). Células gigantes (CG)	77
Figura 41 –	GII 45dias GOLD. Células gigantes (CG) e mononucleares (MNN) associadas ao biomaterial (BM), células fusiformes (CF) vasos sangüíneos (VS). fibras colágenas (FC)	78
Figura 42 –	GII 45dias GOLD. Vasos sanguíneos (VS), células fusiformes (CF), células gigantes (CG) e tecido conjuntivo fibroso (TCF) de permeio ao biomaterial (BM) em fragmentação	78
Figura 43 –	GII 120dias HE. Biomaterial (BM) mais fragmentado do que no período anterior, com maior deposição de tecido conjuntivo (TCF) de permeio	79
Figura 44 –	GII 120dias HE. Biomaterial (BM) fragmentado com presença de células gigantes (CG) sobre os fragmentos; Tecido conjuntivo fibroso (TCF)	80
Figura 45 –	GII 120dias HE. Tecido conjuntivo fibroso (TCF) entre os fragmentos do biomaterial (BM), células gigantes (CG)	80
Figura 46 –	GII 120dias GOLD. Biomaterial (BM) bastante dissociado, com deposição de tecido conjuntivo fibroso (TCF), e reação granulomatosa associada	81
Figura 47 –	GII 120dias GOLD. Biomaterial (BM) bastante fragmentado com intensa atividade gigante-celular sobre os fragmentos residuais. Células gigantes (CG)	81
Figura 48 –	GII 120dias PIFG. Maior deposição de tecido conjuntivo fibroso (TCF) de forma delimitante ao biomaterial (BM), bem como de permeio a este. Septo fibroso (SF)	82
Figura 49 –	GIII 7dias PIFG. Aspecto da área central da biomatriz, o biomaterial (BM) aparece em início de fragmentação. Tecido	83

	conjuntivo frouxo (TCFx); Região do retalho (RRE); Região da dura máter (RDM)	
Figura 50 –	GIII 7dias GOLD. Intensa reação inflamatória (RI) com polimorfonucleares e mononucleares, associada ao biomaterial (BM). Região do retalho (RRE); Região da dura máter (RDM), Vaso sanguíneo (V)	83
Figura 51 –	GIII 15dias HE. Biomaterial (BM) em fragmentação progressiva, com infiltrado inflamatório (RI) por polimorfonucleares e mononucleares e reação granulomatosa. Tecido conjuntivo frouxo(TCFx)	84
Figura 52 –	GIII 15dias HE. Deposição de tecido conjuntivo frouxo (TCFx), com vasos sanguíneos (V) na superfície do biomaterial (BM), sem permeá-lo; intensa atividade macrofágica (M) sobre o biomaterial	85
Figura 53 –	GIII 15dias HE. Deposição de tecido conjuntivo fibroso (TCF) na interface borda óssea reparativa (BO) e biomaterial (BM)	85
Figura 54 –	GIII 15dias HE. Intensa reação inflamatória associada aos fragmentos do biomaterial (BM), predominantemente granulomatosa. Neutrófilos (N); Células gigantes (CG)	86
Figura 55 –	GIII 15dias PIFG. Deposição de tecido conjuntivo fibroso (TCF) em torno do biomaterial (BM), com raras regiões de permeio a este. Borda óssea (BO); Neoformação óssea (NO)	86
Figura 56 –	GIII 15dias PIFG. Biomaterial (BM) bastante fragmento, delimitado por tecido conjuntivo fibroso (TCF) e com finos septos de deposição de fibras colágenas (FC) entre o biomaterial, mais localizadas na sua periferia	87
Figura 57 –	GIII 15dias PIFG. Detalhe da figura anterior, com biomaterial (BM) bastante fragmentado, circundado na periferia por tecido conjuntivo fibroso (TCF)	87
Figura 58 –	GIII 45dias HE. Grande fragmentação do biomaterial (BM), circundado por tecido conjuntivo fibroso (TCF)	88
Figura 59 –	GIII 45dias PIFG. Detalhe da fragmentação do biomaterial (BM)	89
Figura 60 –	GIII 45dias GOLD. Biomaterial (BM) em grande fragmentação, com células inflamatórias associadas aos fragmentos. Células gigantes(CG)	89
Figura 61 –	GIII 45dias GOLD. Restos de fragmentos do biomaterial(BM) com células inflamatórias(CI) sobre estes, circundados, na sua periferia, por tecido conjuntivo fibroso(TCF)	90

Figura 62 –	GIII 45dias GOLD. Detalhe da figura anterior, presença de biomaterial (BM), bastante fragmentado permeado por células inflamatórias (CI)	90
Figura 63 –	GIII 120dias HE. Borda óssea (BO) sem proliferação reparativa, com interposição de tecido conjuntivo fibroso (TCF) na interface biomaterial (BM) e poucos fragmentos do biomaterial	91
Figura 64 –	GIII 120dias HE. Restos de fragmentos do biomaterial (BM) circundados por tecido conjuntivo fibroso (TCF)	92
Figura 65 –	GIII 120dias PIFG. Poucos fragmentos do biomaterial (BM), com raras fibras colágenas (FC) de permeio	92
Figura 66 –	GIII 120dias PIFG. Tecido conjuntivo fibroso (TCF) mais adensado referente à porção do retalho forma uma delimitação para os poucos fragmentos do biomaterial (BM); raras fibras colágenas (FC) de permeio a estes fragmentos	93
Figura 67 –	GIII 120dias HE. Poucos fragmentos do biomaterial (BM) na região central do defeito, circundados por tecido conjuntivo fibroso (TCF)	93
Figura 68 –	GIII 120dias HE. Reação inflamatória gigante-celular sobre os poucos fragmentos restantes do biomaterial (BM). Fibras colágenas (FC)	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição dos animais nos pontos biológicos utilizados no estudo	46
Tabela 2 – Caracterização das biomatrizes 3D planas antes da hidratação em termos de porosidade, densidade e diâmetro dos poros, determinadas pela análise de degradação líquida e microscopia eletrônica de varredura	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
β	Beta
°C	Graus Celsius
μm	Micrômetro
mm	Milímetro
AL	Alagoas
BA	Bahia
BM	Biomaterial
BMP	Bone morphogenetic Protein = Proteína Morfogênica Óssea
BO	Borda Óssea
C	Carbono
CESMAC	Centro de Estudos Superiores de Maceió
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CF	Células Fusiformes
CG	Células Gigantes
CI	Células Inflamatórias
Cm	Centímetro
CpGM	Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz
3D	Tridimensional
DM	Dura Mãter
ED	Edema
FB	Fibroblastos
FC	Fibras Colágenas
FCBS	Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblastos
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
g	Gramas
GAG	Glicossaminoglicana
HA	Hidroxiapatita
HE	Hematoxilina-eosina

He	Hemáceas
HM	Hemossiderina
ICS	Instituto de Ciências da Saúde
INEB	Instituto de Engenharia Biomédica
mL	Militro
mm	Milímetro
MNN	Mononucleares
n°	Número
N	Netrófilo
NEPE	Núcleo de Ensino e Pesquisa
NM	Núcleo de Mineralização
NO	Neoformação Óssea
PBS	Phosphate Buffer Saline
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
Pifg	Picrosirius Red
PLGA	Ácido Poliglicólico - Lático
PMN	Polimorfonucleares
POR	Proliferação Óssea Reparativa
RDM	Região da Dura Mãter
RI	Reação Inflamatória
RRE	Região do Retalho
rpm	Rotações por minuto
SF	Septo Fibroso
TC	Tecido Conjuntivo
TCF	Tecido Conjuntivo Fibroso
TCFx	Tecido Conjuntivo Frouxo
TG	Tricrômico de Goldner
TGF- β	Fator de Crescimento Transformador β
V	Vaso Sanguíneo
Vc	Veia Central
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 TECIDO ÓSSEO E A ENGENHARIA TECIDUAL	22
2.2 BIOMATERIAIS E A BIOMATRIZ TRIDIMENSIONAL	28
2.3 QUITOSANA COMO UM BIOMATERIAL	32
3. OBJETIVOS	44
3.1 GERAL	44
3.2 ESPECÍFICOS	44
4. METODOLOGIA	45
4.1 AMOSTRA	45
4.2 BIOMATRIZES	46
4.2.1. Preparo e Caracterização das matrizes	47
4.2.2. Recorte e Esterilização das Biomatrizes	47
4.3 TÉCNICA CIRÚRGICA	49
4.3.1 Procedimentos Cirúrgicos Iniciais	49
4.3.2. Implantação das Biomatrizes e Procedimentos Cirúrgicos Finais	54
4.4. OBTENÇÃO DAS PEÇAS E CLIVAGEM	55
4.5 PROCESSAMENTO LABORATORIAL	57
5. RESULTADOS	59
5.1 ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA	59
5.1.1 Grupo I	59
5.1.2 Grupo II	66
5.1.3 Grupo III	82
6. DISCUSSÃO	95
7. CONCLUSÕES	105
REFERÊNCIAS	106
9. ANEXOS	112

1. INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é complexo e multifuncional, apresenta-se composto por um número diversificado de estruturas celulares com funções específicas de diferenciação, proliferação, crescimento, formação da matriz extracelular, renovação e remodelamento; entretanto, em certas condições o seu processo de reparo torna-se inviável (SMITH; HUYGHE; COWIN, 2002; MA et al., 2003; ROSCHGER et al., 2008).

A busca de soluções para essa limitação é o foco de atenção da bioengenharia tecidual óssea, uma promissora área das ciências biomédicas que aplica conhecimentos de engenharia e biologia com o objetivo de reconstruir o tecido ósseo danificado por situações clínico-patológicas como: lesões, infecções, anomalias de desenvolvimento, traumas e seqüelas resultantes de neoplasias ou desordens sistêmicas. Recentemente essa área tem recebido um número alto de esforços e investimentos em pesquisa. Uma diversidade de possibilidades é aplicada com o intuito de desenvolver substitutos que apresentem características e comportamento semelhantes ao tecido ósseo (ZANG; ZANG, 2004; ZHAO; CHANG, 2004; HO et al., 2005; MAUNEY et al., 2005; JIAO; LIU; ZHOU, 2006; REIS, 2007).

Dentre estas várias estratégias desenvolvidas com intuito de permitir a reestruturação tecidual óssea, uma delas tem demonstrado ser extremamente

versátil e favorável: a utilização de matrizes tridimensionais com desenho estrutural que facilite no seu interior a diferenciação, o crescimento, a proliferação tecidual, bem como a angiogênese e o conseqüente suprimento de oxigênio para o tecido neoformado (WAN et al., 2005; JIANG; FATTAH; LAURENCIN, 2006; WANG et al., 2007; ZHANG et al. 2007a).

A dificuldade de selecionar um biomaterial ideal para montar este arcabouço justifica-se exatamente no desafio de agregar na mesma estrutura um material que apresente um perfil de propriedades físico-químicas e biológicas ideais, como: resistência mecânica, porosidade, biocompatibilidade, biodegradação, atoxicidade, ação antibacteriana e antifúngica, hidrofília, pH adequado, facilidade de adesão protéica, entre outras, todas desejáveis a uma boa performance dentro do sítio de implantação (MAUNEY et al., 2005; HSIEH; CHANG; LIN, 2007; LAWRIE et al., 2007).

Nesse universo, uma série de materiais metálicos, cerâmicos, polímeros (sintéticos e biógenos) e compósitos tem sido testada. Um polímero natural, mais especificamente a quitosana, tem demonstrado ser uma alternativa, pois apresenta um perfil bastante favorável à osteocondução e à osteoindução (SEOL et al., 2004, WAN et al., 2006).

A quitosana é um biopolímero derivado da quitina, um homopolissacarídeo encontrado em abundância na natureza. Embora possua algumas limitações dependentes de seu percentual de acetilação, ela tem apresentado propriedades e características adequadas para uma boa performance dentro do tecido ósseo (HUANG et al., 2005; JUNG et al. 2007, COUTINHO et al., 2008).

Baseado na perspectiva de encontrar um substituto ósseo para as situações citadas, foi proposta neste trabalho a avaliação histomorfológica de duas matrizes de

quitosana com dois diferentes graus de acetilação, implantadas em defeitos ósseos críticos em calvária de rato.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TECIDO ÓSSEO E A ENGENHARIA TECIDUAL

O osso é um tecido de sustentação altamente especializado, complexo, vascularizado, que apresenta como características principais rigidez e dureza. São suas funções inerentes proporcionar apoio mecânico, possibilitar locomoção, proteger e agir como um reservatório metabólico de sais minerais (TUZLAKOGLU e REIS, 2007; ROSCHGER et al., 2008).

Essa estrutura organizacional apresenta uma camada externa densa e rígida de osso compacto, o córtex, e uma zona medular central ou esponjosa de delgadas trabéculas ósseas interconectadas. O osso cortical forma um arcabouço rígido, resistente à deformação, enquanto internamente a rede trabecular confere força (KONG et al., 2007; ROSCHGER et al., 2008).

A superfície externa do osso é recoberta por uma densa camada de tecido conjuntivo chamada de perióstio, onde se inserem músculos, tendões e ligamentos, enquanto a superfície interna, a qual inclui aí as trabéculas do osso esponjoso, é revestida por uma camada fina chamada de endóstio. O osso compacto é composto por colunas ósseas paralelas, constituídas por camadas ósseas concêntricas, chamadas de lamelas, dispostas em torno de um canal central

denominado de Canal de Havers, que contém vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos. Os feixes neurovasculares se interconectam uns com os outros, com o endósteo e com periósteo, através dos Canais de Volkmann, dispostos obliquamente em relação ao Sistema de Havers (YOUNG e HEATH, 2000; SMIT; HUYGHE; COWIN, 2002).

A estrutura microscópica óssea é constituída por células osteoprogenitoras, células de sustentação (osteoblastos e osteócitos); células remodeladoras (osteoclastos); e uma matriz extracelular não mineralizada chamada de osteóide, composta predominantemente de colágeno (colágeno do tipo I) e proteínas não colagênicas como a osteonectina, a osteocalcina, a proteína óssea morfonética (BMP), glicosaminoglicanas (GAG) e sialoproteínas ósseas; sua mineralização ocorre pela deposição de cristais de hidroxiapatita de cálcio (HA) (ANSELME, 2000; STEVENS e LOWE, 2001; JIANG et al., 2006).

As células osteoprogenitoras são pequenas células fusiformes encontradas em todas as superfícies ósseas não reabsorvíveis; derivam das células mesenquimais primitivas e formam uma população de células precursoras que pode se diferenciar em células mais especializadas (osteoblastos e osteócitos). No estado maduro, em fase de lenta renovação, as células osteoprogenitoras são células fusiformes achatadas, estreitamente dispostas sobre a superfície óssea, geralmente denominadas de osteoblastos inativos. Já no osso em crescimento ativo, em um período de renovação intensa, tais células são maiores e mais numerosas, contendo núcleos ovalados, grandes e citoplasma fusiforme (CORMACK, 2003; BONEWALD, 2007).

Os osteoblastos totalmente diferenciados são células especializadas, que não se dividem, são responsáveis pela síntese osteóide, e participam da sua

mineralização. Sua presença caracteriza superfícies de crescimento, apresentam-se grandes, de contorno arredondado e poligonal e núcleos excêntricos. A ultra-estrutura dos osteoblastos é típica de células ativamente secretoras (BLAIR; SUN; KOHANSKI, 2007).

Quando os osteoblastos completam um ciclo de atividade produtora de osteóide, retornam em sua maioria a um estado inativo, tornam-se achatados e fusiformes, muito próximos de uma superfície óssea que agora está inativa. Alguns osteoblastos, contudo, ficam circundados por matriz óssea mineralizada e se estabelecem no interior de pequenas cavidades no osso. Quando isso acontece, essa unidade celular é chamada de osteócito. Os osteócitos são estruturas menos basófilas, apresentando dimensão reduzida quando comparados com os osteoblastos (BONEWALD, 2007).

Já os osteoclastos apresentam-se grandes, com núcleos múltiplos, com citoplasma abundante; acredita-se que derivem de monócitos do sangue, estão ligados à superfície óssea onde ocorre reabsorção óssea ativa. Eles são necessários para a remodelação que ocorre durante o crescimento e reparos ósseos. Recentes estudos têm relatado também sua relação com o processo de angiogênese (CACKOWKI e ROODMAN, 2007).

O tecido ósseo é constantemente remodelado, reabsorvido e reformado, e este processo é conduzido por células. Basicamente, consiste na reabsorção do osso existente pelos osteoclastos, seguida da deposição de osteócitos recém-formados de osteoblastos. A ativação da remodelação inicia-se por estímulos de ordem mecânica ou hormonal que atuam como fatores predisponentes para iniciar o ciclo de remodelação óssea (BLAIR; SUN; KOHANSKI, 2007; ROSCHGER et al., 2008). Enzimas lisossômicas são liberadas por células osteoclásticas que

hidrolisam o colágeno e as glicosaminoglicanas da matriz óssea. Condições ácidas locais, resultantes provavelmente da secreção de ácidos orgânicos como o ácido carbônico, láctico e cítrico liberados pelos osteoclastos, hidrolisam a hidroxiapatita, liberando íons solúveis Ca^{+2} e PO_4^{-3} . Os produtos resultantes dessa degradação são reabsorvidos pelos osteoclastos por endocitose. (STEVENS e LOWE, 2001; AMARAL, 2005).

Acredita-se ser este papel funcional das células de linhagem osteogênica controlado por uma cascata de eventos que envolvem a combinação e a regulação gênica por vários hormônios, citocinas e fatores de crescimento. As proteínas morfogenéticas BMPs, caracterizadas por sua capacidade de promover a formação óssea, são importantes moléculas sinalizadoras. Essas citocinas são capazes de induzir diferenciação de células mesenquimais em diversas linhagens celulares, inclusive participam na diferenciação osteoblástica. (GONÇALVES; GUIMARÃES; GARCIA, 1998; SAADEH et al., 2001; AMARAL, 2005).

Quando lesões induzidas por trauma ou implantação acontecem, desencadeia-se uma reação vascular provocada pela ruptura de vasos. Fluídos, proteínas e componentes celulares sanguíneos são lançados na área lesada. Como consequência, um complexo processo de desenvolvimento vascular ocorre com o objetivo de sinalizar a liberação de oxigênio e nutrientes para a área lesada. Esse processo, conhecido como angiogênese, é um componente fundamental para o reparo tecidual ósseo e é regulado por sinais moleculares mediados por fatores de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento transformador β (TGF- β) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (BARRETO, 2006).

Entretanto, nem sempre tal processo de reparação pode ocorrer em sua totalidade. Muito freqüentemente, nos deparamos com determinadas condições

clínico-patológicas nas quais a perda tecidual é excessiva, e a capacidade de regeneração óssea, limitada. Como consequência, o seu reparo pode resultar na formação de um tecido conjuntivo fibroso cicatricial, eventualmente, com comprometimento estético e/ou funcional (SAADEH et al., 2001; MIGUEL et al., 2003).

Quando essa dificuldade de regeneração do tecido ósseo acontece, esses defeitos são chamados de críticos. Segundo Schmitz e Hollinger (1986), defeitos ósseos definidos como críticos são aqueles que apresentam determinadas características morfológicas de extensão e largura que impedem a regeneração óssea espontânea durante a vida do animal, a não ser que algum tipo de biomaterial com potencial osteogênico seja implantado.

Estudos em bioengenharia tecidual óssea têm-se utilizado desse modelo de defeito crítico e aplicado-o sobre a calvária de rato para avaliar o desempenho de diversos biomateriais (CARDOSO, 2003; BARRETO, 2006; MIGUEL et al., 2006; MESSORA et al., 2008). Para estes autores a calvária é uma área favorável à avaliação da capacidade osteogênica de biomateriais por apresentar características de pobre suporte sanguíneo e osso medular, o que dificultaria a regeneração óssea.

Outro fator a se considerar nesse modelo é o papel da membrana dura-máter anatomicamente situada imediatamente abaixo da calvária: além de ser uma fonte de células para a formação óssea, apresenta-se resistente o suficiente para propiciar integridade durante os procedimentos cirúrgicos de criação do defeito crítico, fundamental para o bom desempenho do estudo. (MESSORA et al., 2008).

Nessa direção, a abordagem empregada pela Bioengenharia Tecidual tem seu fundamento centrado na possibilidade de restaurar e reconstruir a função de tecidos comprometidos estrutural e funcionalmente (POUND et al., 2007). Ela é a

área de atuação das ciências biomédicas, de caráter multidisciplinar, que se utiliza de princípios da Engenharia, da Química, da Física e das Ciências Biológicas para o desenvolvimento de substitutos ósseos.

A Bioengenharia Tecidual Óssea apresenta uma série de aplicações, tais como: o cultivo de células e tecidos, o transplante e a regeneração tecidual, além da construção de matrizes que apresentam em sua composição uma diversidade de biomateriais, os quais assumem um papel importante na criação e no desenvolvimento de espaços, que sob uma concepção tridimensional possibilitam o transporte de nutrientes e metabólitos, bem como favorecem a organização estrutural do tecido ósseo (WAN et al., 2005; SHI et al., 2006).

Assim, a Bioengenharia Tecidual Óssea tem seu fundamento também baseado na necessidade de implantes ortopédicos que sejam mecânica e biologicamente mais adequados, e na busca de biomateriais que possam ser utilizados na reconstrução de grandes defeitos ósseos. Mais especificamente em odontologia, esta abordagem pode ser aplicada na possibilidade de oferecer soluções que venham a suprir seqüelas provocadas pela perda óssea alveolar. Como também na tentativa de oferecer soluções mais viáveis estruturalmente para periodontia, implantes e tratamentos cirúrgicos na cavidade oral (WU et al., 2006; ZHANG et al., 2007a.; KONG et al., 2007; ZHANG et al., 2007b.).

A Bioengenharia Tecidual Óssea tem se tornado um promissor método de reparação de defeitos ósseos, pois pode, potencialmente, fornecer soluções alternativas que possuam melhores propriedades mecânicas do que aquelas utilizadas atualmente, nas quais são várias as deficiências encontradas. Os enxertos ósseos são essencialmente avasculares e dependentes de oxigenação. O tamanho da loja óssea pode também limitar sua aplicação; além disso, a

manutenção do volume do osso neoformado pode ser problemática devido a sua imprevisível reabsorção óssea. (BURG; PORTER; KELLAM, 2000).

A Bioengenharia Tecidual Óssea utiliza-se de materiais que possam servir de biomatriz, cuja finalidade é induzir a formação óssea do tecido circundante ou agir como um transportador ou modelo para implantar células ósseas ou outros agentes, como aquelas confeccionadas para possibilitar a liberação de substâncias como fatores de crescimento (DI MARTINO; SITTINGER; RISBUD, 2005). Sabe-se que essas citocinas têm potencial para aumentar significativamente a eficácia dessas matrizes; assim o papel do fator β e, mais recentemente, o papel das proteínas morfogenéticas (BMP), envolvidas embriologicamente na regulação da formação óssea, têm sido também objeto de estudo dessa área (ZHANG et al., 2007b).

2.2. BIOMATERIAIS E A BIOMATRIZ TRIDIMENSIONAL

Em Bioengenharia Tecidual Óssea a biomatriz é projetada para servir como uma matriz extracelular temporária, devendo ela apresentar características estruturais que facilitem sua substituição pelo trabeculado tecidual (JIANG et al., 2006). A utilização crescente das biomatrizes como alternativa terapêutica tem favorecido o surgimento de diversas possibilidades de biomateriais. Eles podem ter origem biógena ou sintética e são classificados de acordo com a sua composição em cerâmicos, polímeros, metálicos e compósitos. Em todas estas opções esses biomateriais devem apresentar características e propriedades físico-químicas que favoreçam a formação óssea.

Nesse contexto eles apresentam-se sob a forma de pó, soluções aquosas, gel, membranas, grânulos, blocos e matrizes tridimensionais (3D). A técnica de

aplicação pode ser injetável para as soluções e os géis, ou quando rígidos, requerem a utilização de manobras e procedimentos cirúrgicos que possibilitem sua implantação no sítio (RICHARDSON et al., 2008).

Esses biomateriais podem apresentar-se como uma estrutura sólida acelular, sob a forma de preenchimentos absorvíveis que desaparecem com o passar do tempo, ou na forma de biomatriz 3D. A matriz 3D é um tipo de matriz porosa, na qual os poros presentes no interior da matriz devem estar interconectados entre si, com o objetivo de favorecer o crescimento, a proliferação, a diferenciação celular e a angiogênese dentro de sua estrutura. Mais recentemente, com os avanços da Bioengenharia Tecidual Óssea, têm-se associado a essas matrizes células de linhagem osteogênica e drogas estimulantes que favorecem o desenvolvimento ósseo (HO et al., 2005; MAUNEY et al., 2005; JIANG et al., 2006).

Para este fim, inicialmente faz-se necessário compreender dois termos empregados em regeneração tecidual utilizados pela bioengenharia tecidual óssea, imprescindíveis para a compreensão do papel da biomatriz 3D: são os conceitos de osteocondução e osteoindução (MAUNEY et al., 2005) .

Entende-se por osteoindução a capacidade de induzir células progenitoras a se diferenciarem em osteoblastos e/ou condrócitos, tendo como consequência a formação óssea, enquanto que osteocondução é o processo pelo qual uma estrutura tridimensional é utilizada para servir como arcabouço para a sustentação de células e capilares que resulta em formação óssea posterior (BURG; PORTER; KELLAM, 2000; CARVALHO; BASSI; PEREIRA, 2004).

Espera-se da biomatriz uma série de características que favoreçam seu desempenho dentro do sítio ósseo implantado. Prioritariamente, as respostas tissulares ao biomaterial no sítio ósseo são dependentes de biocompatibilidade

(LEE; SINGLU e LEE, 2001; WU et al., 2006). A biocompatibilidade é influenciada pela estrutura física e pelas propriedades físico-químicas da interface formada entre o biomaterial e o biosistema, desencadeando no organismo respostas que se manifestam por processo inflamatório ou respostas expressadas pelo sistema imunológico que resultam, via de regra, na eliminação do biomaterial, ou no seu encapsulamento por tecido conjuntivo, ou em calcificação (THULL, 2002).

Segundo Wataha (2001), os biomateriais não são biologicamente inertes, pois não existe material inerte. Quando o material é instalado dentro do sítio tecidual, complexas interações com sistema biológico ocorrem, e estas resultam, no mínimo, em uma pequena resposta biológica. Essa interação é dependente do material, do hospedeiro e da função do biomaterial. Embora o biomaterial afete o hospedeiro e o hospedeiro afete o biomaterial, segundo o autor, sua inércia implicaria a ausência desta interação.

Ainda segundo Wataha (2001), a biocompatibilidade é um processo dinâmico, porque a resposta do organismo ao biomaterial é dinâmica, o organismo sofre mudanças devido a doenças ou à idade, e, por outro lado, o biomaterial também pode sofrer alterações. Assim, a biocompatibilidade não é uma propriedade dependente apenas do biomaterial, mas também do resultado da interação deste com o ambiente de sua instalação.

Uma estratégia largamente utilizada em Bioengenharia Tecidual é a utilização de matrizes biodegradáveis. Nestes casos, à proporção que o polímero se degrada e a matriz é desmontada pelo organismo, mais rapidamente a neoformação tecidual deve ocorrer e ocupar o arcabouço deixado, e manter dessa forma a arquitetura óssea (HUTMACHER, 2000; MAUNEY et al., 2005).

Por essa razão, diferentes aplicações e utilizações requerem diferentes níveis de degradação e comportamento erosivo da biomatriz 3D. A compreensão do mecanismo de ação do processo de degradação é necessária para explicar as específicas aplicações da biomatriz 3D, pois a ação da matriz pode ser afetada por alguns fatores e suas propriedades intrínsecas, como também sua morfologia (CHARULATHA e RAJARAM, 2003; REIS et al., 2007).

Para Liu et al. (2007) a biomatriz adequada, além de possuir excelente biocompatibilidade e uma biodegradação controlável, deve apresentar adequada microestrutura e propriedades mecânicas favoráveis. Uma outra característica fundamental para o desempenho da biomatriz está relacionada a sua porosidade, pois tem relação direta com a migração celular e a angiogênese no interior do arcabouço matricial (TIGH; KARAKEÇILI; GUMUSDERELIOGLU, 2007).

O tamanho dos poros e sua orientação influenciam diretamente também as propriedades mecânicas da biomatriz. Testes de tensão em amostras hidratadas mostraram que biomatrizes porosas tinham uma grande redução no módulo de elasticidade (0,1-0,5MPa) quando comparadas com biomatrizes não porosas (5-7Mpa) (DI MARTINO; SITTINGER e RISBUD, 2005). Ainda segundo o mesmo autor, a elasticidade de uma matriz varia de valores entre 30% aproximadamente para as matrizes não porosas, a valores de 100% para as matrizes porosas.

Segundo Li et al. (2005), as matrizes de biopolímeros levam vantagem quando comparadas com matrizes confeccionadas à base de materiais cerâmicos. Além de serem de fácil fabricação, são mais flexíveis para a implantação, e podem se apresentar em vários formatos. A maior preocupação associada às matrizes poliméricas é sua baixa resistência mecânica e falhas relacionadas ao seu padrão

de retenção ao sítio ósseo. Um número considerável de polímeros sintéticos e biógenos têm sido estudados para a confecção de biomatrizes.

Entretanto, os biopolímeros sintéticos têm apresentado insuficiente adesão celular, e suas superfícies têm demonstrado ser hidrofóbicas, o que dificulta sobremaneira o crescimento celular na sua arquitetura tridimensional. Continuam afirmando Li et al. (2005) que quando implantados *in vivo*, esses materiais liberam produtos de degradação ácida, o que resulta numa reação imunológica crônica prejudicial ao tecido hospedeiro.

Nessa perspectiva, um determinado biomaterial, a quitosana, que é um polímero biógeno, vem sendo foco de atenção, e um grande número de estudos têm relatado seu potencial e propriedades favoráveis ao seu uso em Bioengenharia Tecidual Óssea (SHI et al., 2006; WAN et al., 2005; WU et al., 2006; HSIEH; CHANG; LIN, 2007; KONG et al., 2007; TUZLAKOGLU e REIS, 2007; ZHANG et al., 2007b).

2.3 QUITOSANA COMO UM BIOMATERIAL

A quitosana é um aminopolissacarídeo derivado do processo de desacetilação da quitina, o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose, sendo o principal componente do exoesqueleto de crustáceos e insetos. Sua presença ocorre também em nematóides e na parede celular de fungos e leveduras (HSIEH; CHANG; LIN, 2007).

Na década de sessenta do século passado, um considerável número de estudos sobre quitina e quitosana, vindos principalmente da Ásia, mais predominantemente do Japão, começaram a ser realizados com objetivo de

entender melhor as características, propriedades, métodos de produção, purificação e derivação química desses materiais. Com o passar do tempo e o contínuo enfoque, suas aplicações biomédicas foram descobertas e aperfeiçoadas (KHOR e LIM, 2003).

Desde então a pesquisa da quitosana tem aumentado exponencialmente em diversas áreas, como na agricultura, indústria de alimentos, na indústria farmacêutica no desenvolvimento de cosméticos (KIMURA et al., 1999, SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006; CHEN et al., 2006) e na área biomédica, na qual os estudos concentram-se principalmente no desenvolvimento de biomatrizes utilizadas pela bioengenharia tecidual, como uma alternativa para a reconstrução de estruturas do organismo danificadas por doenças ou lesões (CHUPA et al., 2000; KHOR e LIM, 2003; MA et al., 2003; GREHA et al., 2007; TAN et al., 2007; XU et al., 2007; RICHARDSON et al., 2008).

A quitina é um homopolissacarídeo linear insolúvel, composto por unidade de N-acetil-D-glucosamina em ligação β (Figura 1). Diferencia-se quimicamente da celulose pela substituição de um grupo hidroxila em C-2 por um grupo amino acetilado. Estruturalmente, a quitina apresenta-se na forma de fibras estendidas similares àquelas da celulose, e não é digerível por animais vertebrados (NELSON e COX, 2002).

A fórmula molecular genérica pode ser expressa como $(C_6H_{11}O_4N)_n$, conforme ilustração da Figura 1. Apesar de numerosas tentativas, os grupos N-acetil não podem ser completamente removidos da quitina. Como consequência, a quitosana sempre contém um número de N-acetil de unidades; é a proporção destas em relação ao total de unidades (N-acetil-D-glucosamina + D-glucosamina)

que representa o seu grau de acetilação (PRASHANTH; KITTUR; THARANATHAN, 2002; ASSIS e SILVA, 2003).

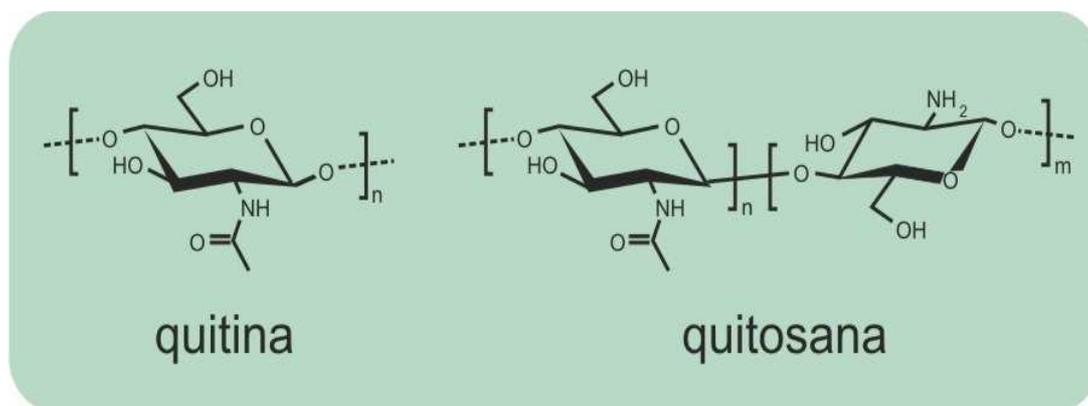


Figura 1. Representação esquemática da estrutura molecular da quitina e da quitosana

É possível alterar o grau de desacetilação da quitina mudando as condições de desacetilação da reação, o que possibilita preparar várias quitosanas com diferentes graus de acetilação (LI et al., 2005; PRASHANTH; KITTUR; THARANATHAN, 2002; TORRES et al., 2005; MELLO et al., 2006).

Essa alteração na mudança de acetilação da quitosana é de uma importância fundamental para o seu desempenho como biomaterial, pois influencia diretamente o seu comportamento no organismo. Estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado esse potencial em matrizes tridimensionais de quitosana utilizadas como estratégia para o suporte e organização tecidual na regeneração tecidual óssea. Essas mudanças têm possibilitado um ambiente mais favorável à resposta do organismo em relação a diferenciação, adesão, proliferação e crescimento celular.

Chaletet; Damour e Domart (2001) avaliaram o grau de acetilação e sua relação com algumas propriedades biológicas da quitosana e demonstraram que o grau de acetilação da quitosana influencia a adesão e o crescimento celular em

filmes confeccionados com este material. Foi comprovado que quanto maior o grau de acetilação menor é a adesão celular sobre filmes de quitosana. Embora fibroblastos tenham apresentado um nível duas vezes maior de adesão quando comparados com queratinócitos, e esta adesividade pareça favorável, em um nível muito alto ela impede o crescimento desse tipo celular sobre o biomaterial.

Amaral et al (2005) examinou o efeito da acetilação da quitosana sobre a adesão, expansão, proliferação e diferenciação osteogênica de células de uma linhagem óssea extraída da medula de rato, em membranas de quitosana com 4%, 13%, 22%, 30%, 49% de acetilação. Segundo estes autores, os resultados obtidos possibilitam afirmar que as propriedades da superfície da matriz afetam a conformação de proteínas e, conseqüentemente, a adesão, a expansão e a expressão do fenótipo das células estudadas. Foram observadas nesse estudo altas concentrações de fibronectina na superfície da matriz de quitosana. O que leva a crer que a adsorção desta glicoproteína desempenhou um papel importante para a proliferação e diferenciação osteogênica da linhagem de células estudadas. O autor concluiu ainda que a quitosana com 4% de acetilação mostrou ser a melhor performace dos grupos avaliados no estudo, uma vez que foi altamente favorável à adsorção da fibronectina, o que facilitou o desempenho alcançado em relação ao alto grau de diferenciação osteogênica.

Em um outro estudo, baseado na mesma perspectiva, Amaral, Sampaio e Barbosa (2006) avaliaram a interferência de diferentes graus de acetilação (4 a 49%) de filmes de quitosana frente à adesão e proliferação de osteoblastos humanos (linhagem MG-63). A adesão celular foi avaliada após 3 e 24 horas de cultura celular. Depois do segundo período, ou seja, das 24 horas de incubação, um claro efeito do grau de acetilação foi notado. Menores graus de acetilação

promoveram uma maior intensidade de adesão celular. Ao longo do tempo, o arranjo celular, assim como a organização do citoesqueleto, estavam, ambos, unicamente presentes no grau de acetilação de 13%. No que diz respeito à proliferação celular, quanto menor o grau de acetilação, maiores foram as taxas de crescimento celular, quando comparadas com graus de acetilação maiores.

Com o mesmo propósito, Tigh; Karakeçili; e Gumusderelioglu (2007) avaliaram *in vitro* a influência da composição e do grau de desacetilação de matrizes tridimensionais de quitosana. Seus resultados demonstraram que na cultura de células estudadas, a adesão e a proliferação de fibroblastos foram afetadas pelo grau de desacetilação da biomatriz. As biomatrizes com alto grau de desacetilação mostraram-se mais favoráveis à adesão e à proliferação celular do que as biomatrizes com baixo grau de desacetilação.

No passado o desenvolvimento de matrizes teciduais apresentava limitações que eram estabelecidas entre a manutenção das condições vitais da área e a neoformação tecidual. Estatisticamente, variações no nível de oxigênio e pH, diminuição do suprimento de nutrientes e acúmulo de produtos de degradação são fatores que podem resultar em morte celular, necrose do sítio implantado e falta de estímulo mecânico para promover a síntese tecidual. A utilização de modelos tridimensionais associados à cultura de células tem mostrado ser um modelo atrativo para o crescimento celular e a interação entre tecido em formação e a matriz implantada (POUND et al. 2007).

Para compreender como a quitosana comunica-se com proteínas e estruturas celulares, segundo Coutinho et al. (2008), é de notável importância modular o comportamento desse biomaterial *in vivo* no organismo. Durante o contato da superfície da biomatriz com os fluídos biológicos, a adsorção protéica

ocorre instantaneamente; é esta camada da biomolécula que controla os mecanismos de interação com o sítio onde o material está implantado. Por esta razão, a interpretação da adsorção de proteínas determina a compreensão da resposta celular, o que elucida o sistema biomédico de implantação no organismo vivo.

Segundo Muzzareli et al. (1994), a quitosana tem capacidade de estimular células na liberação de citocinas que favorecem a organização estrutural do tecido conjuntivo, o que facilita a osteogênese e a angiogênese.

A quitosana é também considerada um polímero reativo de alta biocompatibilidade (SUH; MATTHEW, 2000; CHATELET; DAMOUR; DOMARD, 2001; KHOR e LIM, 2003; MA et al. 2004; HU et al., 2004; SHI et al., 2006; HSIEH; CHANG; LIN, 2007). Comporta-se como um agente hemostático que apresenta propriedades antitrombogênicas, e também estimula o sistema imune a responder contra infecções provocadas por microorganismos (AMARAL, 2005). Esta atividade antibacteriana intrínseca, para Di Martino; Sittinger; Risbud, (2005), deve-se ao fato de a capacidade do grupo amino de caráter catiônico presente na estrutura química da quitosana poder associar-se com anions presentes na parede celular, o que resulta na supressão da biosíntese e transporte de metabólitos através da parede celular, e a conseqüente morte do microorganismo bacteriano.

Vande Vord et al. (2002) avaliaram a biocompatibilidade de matrizes porosas de quitosana implantadas em modelo animal. Os animais foram sacrificados depois de 1, 2, 4, 8 e 12 semanas. A inspeção macroscópica da região do implante revelou resposta inflamatória branda. A análise histológica evidenciou elevada densidade de neutrófilos no interior da área do implante, o que diminuiu progressivamente em intensidade nos pontos biológicos mais distantes a partir da data do implante.

Técnicas tintoriais como as de Gram e ensaios de limulus revelaram a ausência de infecção ou presença de endotoxinas. Foram observados depósitos de fibras colágenas, o que indicou a formação de matriz conjuntiva no sítio operado.

Ainda segundo Vande Vord et al. (2002), esta atividade angiogênica também foi observada. Os imunoenaios demonstraram proliferação linfocitária, sendo a resposta humoral mensurada por avaliação do tipo ELISA. Essas análises indicaram ter havido uma mínima indução antigênica pela presença da quitosana. Muito embora tenha havido uma migração intensa de neutrófilos para a região do implante, houve apenas branda sinalização de reação inflamatória resultante da presença do material. Este estudo preliminar reforça, portanto, a elevada biocompatibilidade da quitosana quando implantada em modelo animal e sob as condições experimentais apontadas.

Além dessas propriedades citadas, a quitosana é facilmente hidrolisada e metabolizada por várias quitosanases e enzimas lisossômicas, sendo considerada biodegradável (JUNG et al. 2007). Sua biodegradação é caracterizada pela liberação de aminoaçúcares, que podem ser incorporados às vias metabólicas das glicosaminoglicanas e das glicoproteínas e depois excretadas (CHATELET; DAMOUR; DOMARD, 2001; TIGH; KARAKEÇILI; GUMUSDERELIOGLU, 2007; JUNG et al., 2007).

Segundo Ren et al. (2005), o comportamento de degradação é um fator crucial para a performance em longo prazo de biomatrizes de quitosana. A degradação pode afetar muitos processos celulares, inclusive crescimento celular, regeneração tecidual e a resposta do hospedeiro. Estes autores investigaram *in vitro* a degradação da quitosana por enzimas lisossômicas em diferentes graus de acetilação, e os seus resultados demonstraram que matrizes com altos graus de

acetilação (93,5%, 81,7%, e 71%) apresentavam um processo de degradação mais lento do que as matrizes com percentuais de acetilação em torno de 62,4%, 56,1% e 52,6%. Seus achados concluem que é possível controlar não só o índice de degradação como também o grau de deformação das matrizes.

Estudos mais recentes mostram uma preocupação em aprimorar as propriedades mecânicas e biológicas da quitosana. Sua associação com outros polímeros tem sido largamente estudada, e são a tendência de perspectivas futuras no que se refere à pesquisa com quitosa. Huang et al. (2005) analisaram *in vitro* o desempenho de biomatrizes de quitosana associadas à gelatina, comparando-as com biomatrizes de quitosana pura. Uma série de parâmetros como a degradação, a estabilidade dimensional, a deformação, as alterações de pH por um período de dois meses, as propriedades de tensão e compressão dos filmes e biomatrizes em água a 37°C, a viabilidade celular, entre outras características, foram avaliadas. Os resultados demonstraram que o comportamento celular foi igual em ambos os espécimes avaliados; as biomatrizes de quitosana associadas à gelatina apresentaram degradação mais rápida e perda significativa de material, embora não tenha ficado claro, para os autores, se as propriedades mecânicas também foram afetadas.

Para Li et al. (2005) a matriz biodegradável empregada em bioengenharia tecidual funciona como um esqueleto temporário que acomoda e estimula o crescimento no novo tecido. Os autores avaliaram o desempenho de uma biomatriz híbrida de quitosana-alginato e os resultados alcançados mostraram-se significativamente superiores, mecânica e biologicamente, aos alcançados com a biomatriz pura de quitosana. Esses resultados mecânicos favoráveis, segundo os pesquisadores, são justificados pela formação de uma complexa estrutura entre

alginate e quitosana. *In vivo* o grau de compatibilidade tissular foi alto, a deposição de cálcio ocorreu facilmente após quatro semanas, o que proporcionou um meio ambiente favorável à incorporação de proteínas de baixo risco de desnaturação.

Matrizes de ácido láctico e ácido glicólico (PLGA) têm sido utilizadas em Bioengenharia Tecidual Óssea. Jiang et al. (2006) avaliaram os efeitos da concentração de quitosana sobre a morfologia, propriedades mecânicas, estruturas de poros e o comportamento celular com três variáveis: biomatrizes biógenas tridimensionais de quitosana, um polímero sintético a base de ácido láctico e ácido glicólico e biomatrizes de microesferas de quitosana. Os resultados mostraram que a presença da quitosana contribuiu para o aumento, a diferenciação e a maturação da linhagem MC3T3-E1 de células osteoblásticas pesquisadas.

Wu et al. (2006) analisaram matrizes de PLGA tratadas com soluções de biomateriais naturais (colágeno, quitosana e N-succinil-quitosana). Os critérios avaliados relacionavam-se a adesão, proliferação e diferenciação de células osteoblásticas. Os resultados mostraram ser as matrizes infiltradas com os biomateriais naturais à base de colágeno mais favoráveis à adesão e à proliferação, enquanto que as matrizes com quitosana e N-succinil-quitosana tiveram uma performance melhor de diferenciação celular. Ainda segundo estes autores, apesar das matrizes de PLGA mostrarem ser adequadas, sua resistência mecânica, porosidade, e propriedades hidrofóbicas de superfície têm limitado seu uso. Em função disso, o tratamento de superfície das matrizes é um mecanismo importante para conseguir boas características de adesão e proliferação celular.

Durante o processo de regeneração óssea é necessário que a biomatriz permaneça em posição, a fim de favorecer a formação do tecido neoformado. Neste mesmo contexto, com o objetivo de aumentar a resistência da biomatriz, Jung et al.

(2007) avaliaram *in vivo* o efeito do tratamento de membranas de quitosana sobre o processo de regeneração óssea em defeitos críticos criados em calvária de ratos. Três concentrações diferentes de PLGA (0,5%, 1,0%, 3,0%) foram estudadas. Os resultados dos períodos de duas e oito semanas pós-cirúrgicos demonstraram que no grupo controle, preenchido apenas com coágulo sanguíneo, ocorreram uma leve formação de tecido conjuntivo e uma quantidade mínima de formação óssea nas margens do defeito. Enquanto que nos grupos de quitosana, no período de duas semanas, um número residual de fibras de quitosana foi encontrado envolvido por tecido conjuntivo, e com oito semanas o novo osso mostrou-se mais maturado. Embora os seus achados tenham demonstrado que a membrana de quitosana tem potencial para induzir a formação de tecido ósseo, não houve diferenças significantes entre os grupos tratados com PLGA.

Tuzlakoglu e Reis (2007) aplicaram sobre biomatrizes fibrosas de quitosana com 87% de desacetilação um spray de biovidro (Bioglass[®]) mantido em suspensão aquosa. A linhagem de células osteoblásticas humanas SaOs-2 foi selecionada para avaliar a morfologia, adesão e proliferação celular sobre a superfície da matriz. Após sete dias de observação foi encontrado um alto número de células aderidas à biomatriz tratada com spray e na biomatriz sem tratamento (grupo controle), entretanto observou-se a presença de diferentes tipos celulares com diferentes morfologias e uma maior proliferação celular na biomatriz tratada com spray. Segundo os autores, este resultado justifica-se pelas mudanças químicas ocorridas na superfície destas biomatrizes, pois a superfície química e a topografia de superfície podem afetar diretamente a resposta osteoblástica.

Como já foi citado anteriormente, porosidade e resistência mecânica são propriedades intensamente estudadas na literatura, pois interferem no desempenho

da matriz no sítio de implantação. (DI MARTINO; SITTINGER; RISBUD, 2005; WAN et al., 2005; REIS, 2007; ZHANG et al., 2007a). Um estudo *in vivo* elaborado por Kong et al. (2007) analisou o desempenho de uma biomatriz porosa composta de quitosana e nano-hidroxiapatita implantada na fíbula de coelhos. Uma porção de 5mm de extensão linear foi removida cirurgicamente do osso do animal e uma matriz tubular com arquitetura multilaminar semelhante ao osso foi implantada. Sua estrutura era composta de uma membrana externa densa de quitosana, uma camada intermediária de quitosana e nano-hidroxiapatita com pequena porosidade (20-40 μ m) e uma zona medular altamente porosa (100-150 μ m), infiltradas com a linhagem de células osteogênicas MC3T3-E1 derivadas da calvária de rato.

Diante deste desenho de biomatriz 3D expressado pelos autores supracitados, que tinha como objetivo equilibrar propriedades mecânicas, porosidade, crescimento tecidual e suplemento nutricional; os resultados demonstraram que o comportamento da membrana de quitosana foi eficiente na prevenção de invaginação de tecido fibroso, e a biomatriz celular composta de quitosana-nanohidroxiapatita apresentou boa biocompatibilidade e osteocondutividade *in vivo*.

Por esta razão, segundo Hutmacher (2000), os biopolímeros tornaram-se materiais extremamente populares, e de certa forma predominam os estudos em bioengenharia tecidual. O modelo da biomatriz com desenho estrutural tridimensional, com alto grau de porosidade, com poros interconectados entre si, facilita a sua implantação dentro do organismo humano.

Em um estudo elaborado por Hsieh, Chang e Lin (2007) biomatrizes com percentuais entre 1 e 3% apresentaram boa plasticidade. Concentrações abaixo de 1% mostraram-se insuficientemente viscosas, ao passo que concentrações acima

de 3% foram altamente viscosas. Com os resultados obtidos, os autores concluíram que o tamanho dos poros e a porosidade reduziram-se com a elevação da concentração de quitosana na matriz. Ficou comprovado que biomatrizes com altas concentrações de quitosana apresentaram baixa porosidade.

Ainda segundo o mesmo estudo, altas concentrações de quitosana diminuem a absorção de água pela biomatriz. Testes que avaliaram propriedades mecânicas demonstraram que, à proporção que a concentração de quitosana é aumentada, aumenta também a resistência à compressão da matriz. Os testes de degradação enzimática, realizados no estudo, revelaram que concentrações em torno de 20% aumentaram o tempo de degradação da biomatriz.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar morfologicamente o comportamento da implantação *in vivo* de matrizes tridimensionais de quitosana em defeitos ósseos com dimensões críticas, realizados em calvária de rato.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Analisar histomorfologicamente em quatro pontos biológicos, por meio de microscopia de luz, o potencial de neoformação óssea de matrizes tridimensionais de quitosana com 4% e 15% de graus de acetilação em defeitos ósseos circulares transfixados com dimensões críticas, realizados em calvária de rato.

4. METODOLOGIA

4.1 AMOSTRA

Este experimento em animais foi realizado no Biotério da Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde da Fundação Educacional Jayme de Altavila - FCBS/FEJAL/CESMAC – Maceió/AL; seguiu as normas de conduta de experimentação animal da referida instituição de ensino superior, após aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM)/ FIOCRUZ – Salvador-BA (Anexo A), de acordo com as Normas para a Prática Didático-Científica da Vivissecção de Animais, recomendada pela Lei 6638, de 08 de maio de 1979 (Anexo B), bem como após parecer favorável da Procuradoria da República em Alagoas/ Ministério Público Federal (Anexo C).

Foram selecionados 60 ratos *Wistar albinus*, machos, isogênicos, adultos, com massa corpórea pesando entre 300 a 400g, com 3 meses a 4 meses de idade, clinicamente saudáveis, fornecidos pelo Biotério da FCBS/FEJAL/CESMAC. Os referidos animais foram distribuídos aleatoriamente para a composição de três grupos, compostos por cinco animais cada, sendo avaliados em quatro pontos biológicos pós-operatórios de sete, quinze, quarenta e cinco e, cento e vinte dias, conforme demonstrado na Tabela 1.

Após os procedimentos cirúrgicos, estes animais foram mantidos em ambiente climatizado, em gaiolas plásticas individuais autoclaváveis, alimentados com ração sólida¹ e água *ad libitum*, em condições ideais de luminosidade, sem administração de qualquer medicação pós-operatória.

Os grupos deste estudo foram estabelecidos obedecendo a seguinte identificação: **Grupo I** para o grupo de animais com defeito ósseo circular preenchido apenas com coágulo sanguíneo; **Grupo II** para os animais com defeito ósseo circular preenchido com biomatriz 3D de quitosana a 4% de acetilação; e **Grupo III** para os animais com defeito ósseo circular preenchido com biomatriz 3D de quitosana a 15% de acetilação (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição dos animais nos pontos biológicos utilizados no estudo

GRUPOS	7 DIAS	15 DIAS	45 DIAS	120 DIAS	TOTAL
GRUPO I	5	5	5	5	20
GRUPO II	5	5	5	5	20
GRUPO III	5	5	5	5	20
TOTAL	15	15	15	15	60

4.2 BIOMATRIZES

As biomatrizes tridimensionais de quitosana foram preparadas, caracterizadas e fornecidas pelo Instituto de Engenharia Biomédica - INEB da Universidade do

¹ Purina Labina™. Purina do Brasil. Nestlé Purina Pet Care Company. Paulínia - SP

Porto – Portugal, tendo o seu protocolo estabelecido em Amaral; Barbosa e Sampaio (2006).

4.2.1. Preparo e caracterização das matrizes

As matrizes tridimensionais planas foram preparadas e caracterizadas na divisão de biomateriais do INEB, Porto – Portugal (Tabela 2 e Figura 2). Biomatrizes 3D de quitosana com dois diferentes graus de acetilação (4 e 15%) foram preparadas da quitosana de pena de lula (France – Chitine), depois de purificadas e subseqüentemente N-acetiladas. Antes da hidratação, as biomatrizes apresentavam porosidade, densidade e média de diâmetros dos poros conforme relacionados na Tabela 2. As características morfológicas foram demonstradas por meio de microscopia eletrônica de varredura conforme Figura 2.

Tabela 2. Caracterização das biomatrizes 3D planas antes da hidratação em termos de porosidade, densidade e diâmetro dos poros, determinadas pela análise de degradação líquida e microscopia eletrônica de varredura

<i>Biomatrizes</i>	<i>Porosidade (%) (n = 3)</i>	<i>Densidade (g·mL) (n = 3)</i>	<i>Diâmetro dos poros (µm) (n = 50)</i>
Quitosana a 4% de acetilação	0,981 ± 0,001	0,033 ± 0,001	114,08 ± 38,28
Quitosana a 15% de acetilação	0,939 ± 0,004	0,053 ± 0,005	96,16 ± 26,26

4.2.2 Recorte e esterilização das biomatrizes

Inicialmente, as biomatrizes foram recortadas manualmente, nos diâmetro e espessura desejados, por meio de um artefato cilíndrico, em aço inox, de margens

cortantes, desenhado exclusivamente para este fim. As biomatrizes eram posicionadas em placa de teflon e sobre elas era pressionado o cilindro, com sua margem cortante em contato direto com as mesmas. Em seguida, as biomatrizes liofilizadas eram imersas em álcool absoluto e submetidas à máquina de vácuo para remover possíveis bolhas de ar contidas no seu interior. Ao final, as biomatrizes já posicionadas ao fundo do tubo *Falcon*, permaneciam na mesma solução, por mais 10 minutos. Depois desse período de tempo, eram imersas, de forma seqüencial, em soluções de álcool a 70, 50 e 25%, por períodos de 30 minutos, para a primeira solução, e 10 minutos para as duas últimas. Todas as vezes que se fazia necessário, eram recolocadas sob tratamento para remoção de bolhas de ar na máquina de vácuo. Por fim, as matrizes foram hidratadas, por 2 vezes, em solução de PBS; 10 minutos a cada tempo.

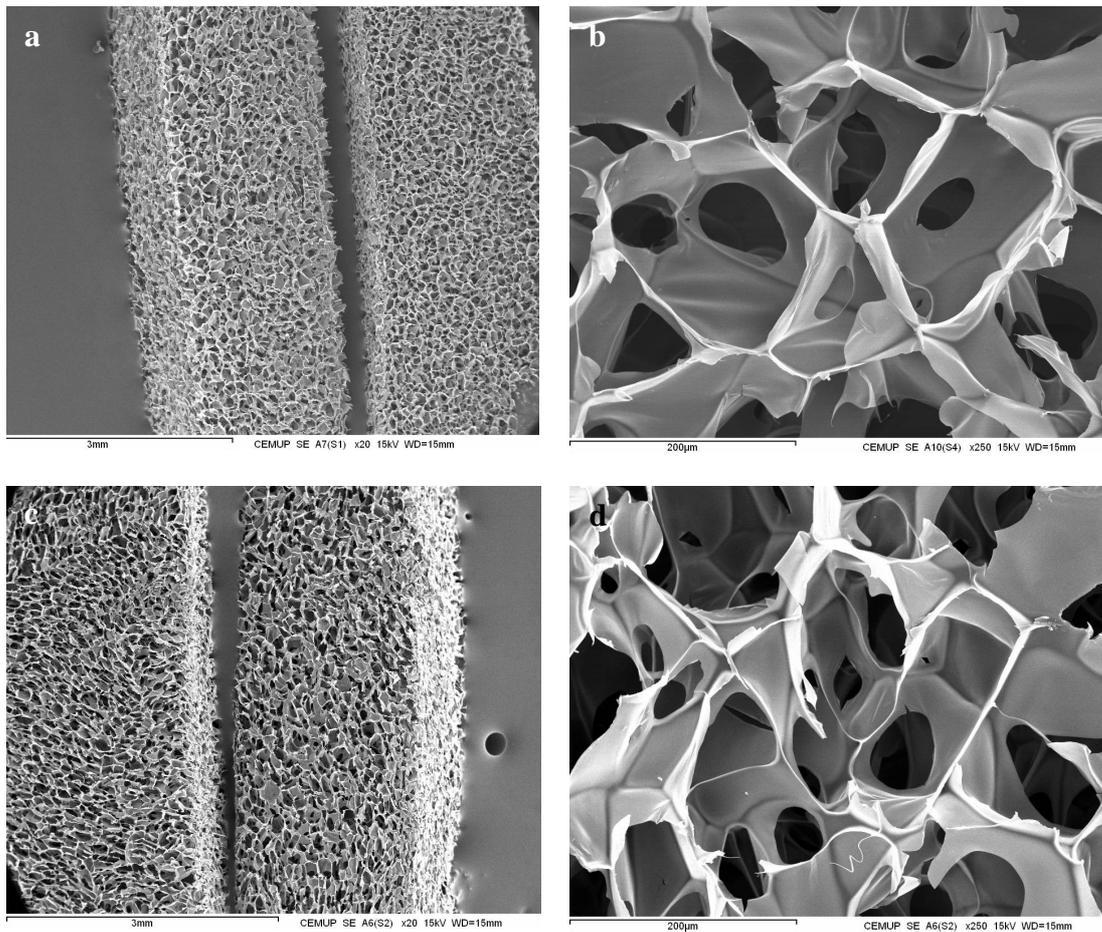


Figura 2. Fotomicrografia eletrônica de varredura das biomatrizes 3D planas de quitosana. Imagens correspondentes aos cortes seccionais transversais das biomatrizes preparadas: (a e b) quitosana com 4% de acetilação e (c,d) quitosana com 15% de acetilação

4.3 TÉCNICA CIRÚRGICA

4.3.1 Procedimentos Cirúrgicos Iniciais

Os animais foram submetidos à anestesia, analgesia e sedação com duas injeções intramusculares, sendo a primeira de cloridrato de quetamina² na proporção

² Xilazina. Agibrands do Brasil Ltda. Paulínia – SP

de 0,12mL/100g de peso, e a segunda de cloridrato de xilazina³, na proporção de 0,06mL/100g de massa corpórea. Na seqüência os animais foram tricotomizados na região da calvária, sendo realizada em seguida anti-sepsia do campo operatório com solução de iodopovidine⁴. Os animais foram posicionados em decúbito ventral para o acesso à região da calvária.

Os procedimentos cirúrgicos obedeceram à técnica descrita em Miguel et al (2006), tendo sido iniciada pela realização de um retalho bicoronal cutâneo, realizado na porção posterior da calvária, mais especificamente na porção inter-auricular externa, medindo aproximadamente 3,0 cm de extensão, conforme Figura 3. Utilizou-se para este passo uma lâmina intercambiável n°15 montada em cabo de bisturi Bader Parker. Em seguida foi feita a divulsão dos tecidos com tesoura de extremidade romba. As bordas do retalho foram mantidas afastadas com pinças tipo mosquito.

³ Dopalen injetável. Vetbrands. JACA. Divisão Vetbrands Saúde Animal. Jacaréi – SP

⁴ Iodopovidona 10%. BioTrat. L.M. Farma Indústria e Comércio Ltda. São José dos Campos – SP



Figura 3. Incisão bicoronal na calvária do animal

Logo após foi realizada transversalmente uma segunda incisão, com objetivo de atingir o periósteo, situada na porção mediana da calvária com 9mm de extensão linear. Foi utilizada para a realização deste procedimento uma lâmina intercambiável nº15, montada em cabo de bisturi Bader Parker. Em seguida o periósteo foi removido com uma espátula nº 7. Tendo sido o tecido ósseo exposto, foi realizado o defeito ósseo crítico com aproximadamente 9mm de diâmetro na metade da distância entre a sutura craniana posterior e a sutura craniana anterior. Utilizou-se para este fim uma trefina⁵ de 8mm diâmetro interno, com 1mm de espessura de parede, montada em contra-ângulo⁶ com redução de 1:16, acoplado em motor cirúrgico⁷ com 1500 rpm (Figura 4), sob irrigação constante de solução fisiológica (NaCl 0,9%)⁸. Na seqüência foi removido o bloco ósseo circular (Figuras 5,6 ,7).

⁵ Dentoflex Comércio e Indústria de Materiais Odontológicos Ltda. São Paulo – SP.

⁶ K DRILLER. Jaguaré – SP

⁷ Idem

⁸ Solução Fisiológica de Cloreto de Sódio a 0,9%. Laboratório Tayuna Ltda. Nova Odessa – SP

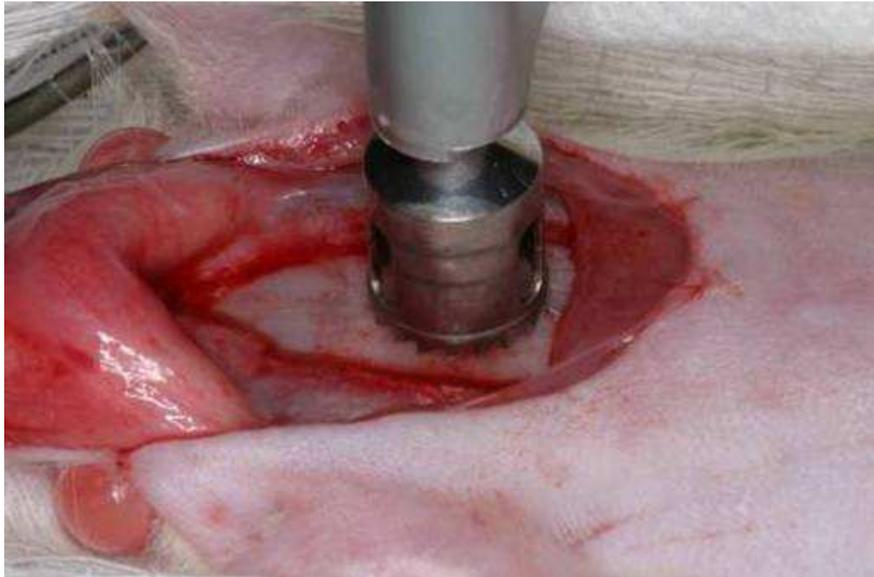


Figura 4. Posicionamento da trefina circular, durante a realização do procedimento de transfixação da calvária do animal

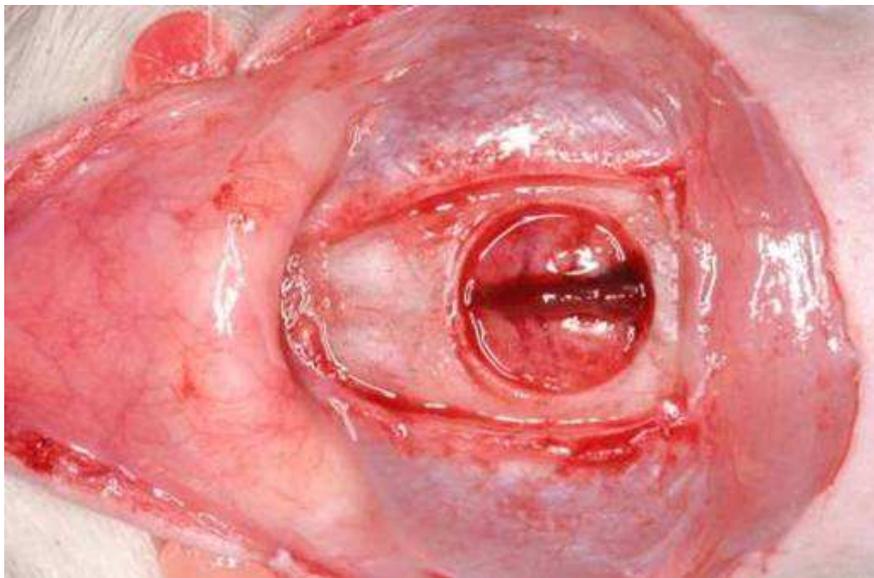


Figura 5. Vista superior do defeito crítico após remoção do bloco ósseo

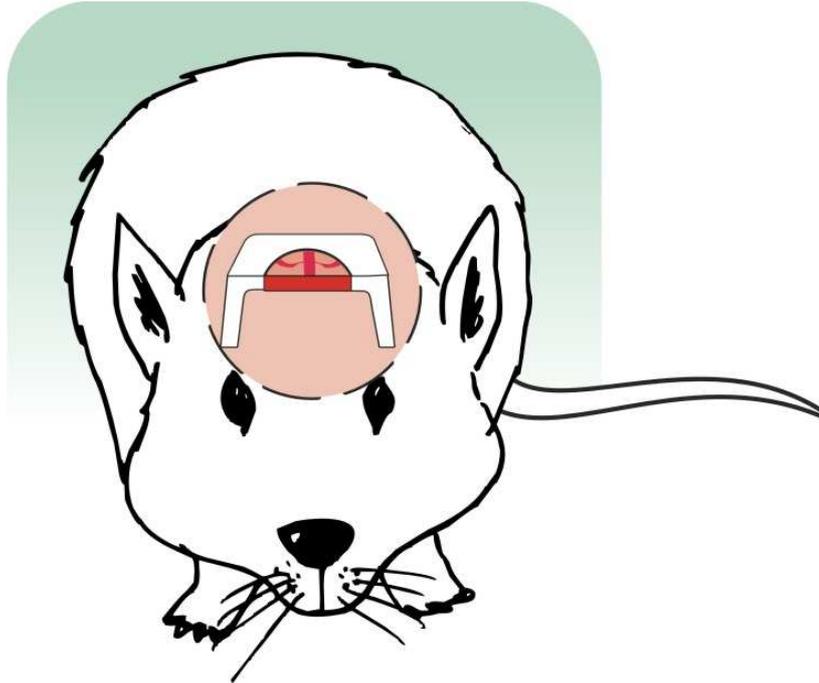


Figura 6. Desenho esquemático da vista frontal da posição do defeito criado na calvária do animal

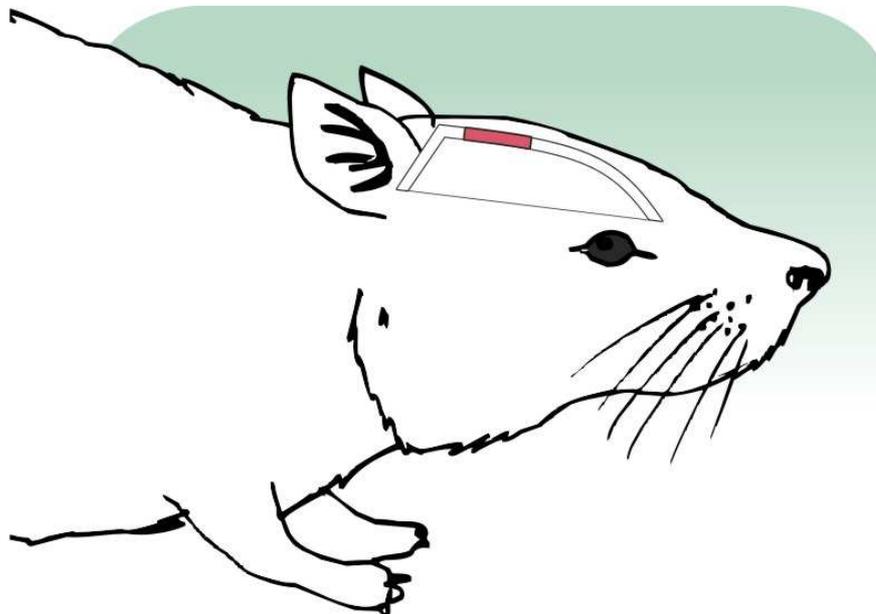


Figura 7. Desenho esquemático da vista lateral da posição do defeito criado na calvária do animal

4.3.2 Implantação das biomatrizes e procedimentos cirúrgicos finais.

Após a confecção do defeito na calvária, foi estabelecida a seguinte estratégia de implantação (Figura 8):

Grupo I – Grupo controle, não foi implantada nenhuma biomatriz, tendo sido o defeito preenchido apenas com o coágulo sanguíneo.

Grupo II – O defeito ósseo foi preenchido com uma biomatriz de quitosana a 4% de acetilação.

Grupo III – O defeito ósseo foi preenchido com uma biomatriz de quitosana a 15% de acetilação.

A sutura da calvária foi realizada em um único plano cutâneo com fio seda n° 4-0⁹.



Figura 8. Implantação da biomatriz 3D no defeito crítico criado na calvária do animal

⁹ ETHICON Johnson & Johnson São José dos Campos-SP

4.4. OBTENÇÃO DAS PEÇAS E CLIVAGEM

Após os procedimentos cirúrgicos citados, os animais foram mortos com uma injeção letal de anestésico cloridrato de quetamina via peritoneal, obedecendo à seqüência de pontos biológicos correspondentes a 7, 15, 45, 120 dias. Logo após foi removida toda porção posterior da calvária em bloco (Figura 9), seguida da remoção do tecido mole aderido, com exceção da dura-máter e do periósteo. Foi utilizado para este procedimento alicate cortante e tesoura de extremidade reta e romba. Os espécimes obtidos foram imersos numa solução de formol tamponado a 10%, contida em frascos plásticos identificados, por um período de dez dias.

Completado o período de fixação, as peças foram clivadas por meio de discos diamantados unifacetados¹⁰ montados em contra-ângulo¹¹, em motor de baixa rotação¹². O fragmento obtido media 12,5mm de comprimento antero-posterior. Foi estabelecido como referência anterior de corte da peça o diâmetro do defeito crítico correspondente a 6,5mm; a partir daí mediu-se 12,5 mm em direção à sutura craniana posterior do animal e realizou-se o segundo corte (Figura 9).

¹⁰ KG Sorensen Indústria e Comércio Ltda. São Paulo – SP

¹¹ Beltec do Brasil. Soluções portáteis. São Paulo. SP

¹² Idem

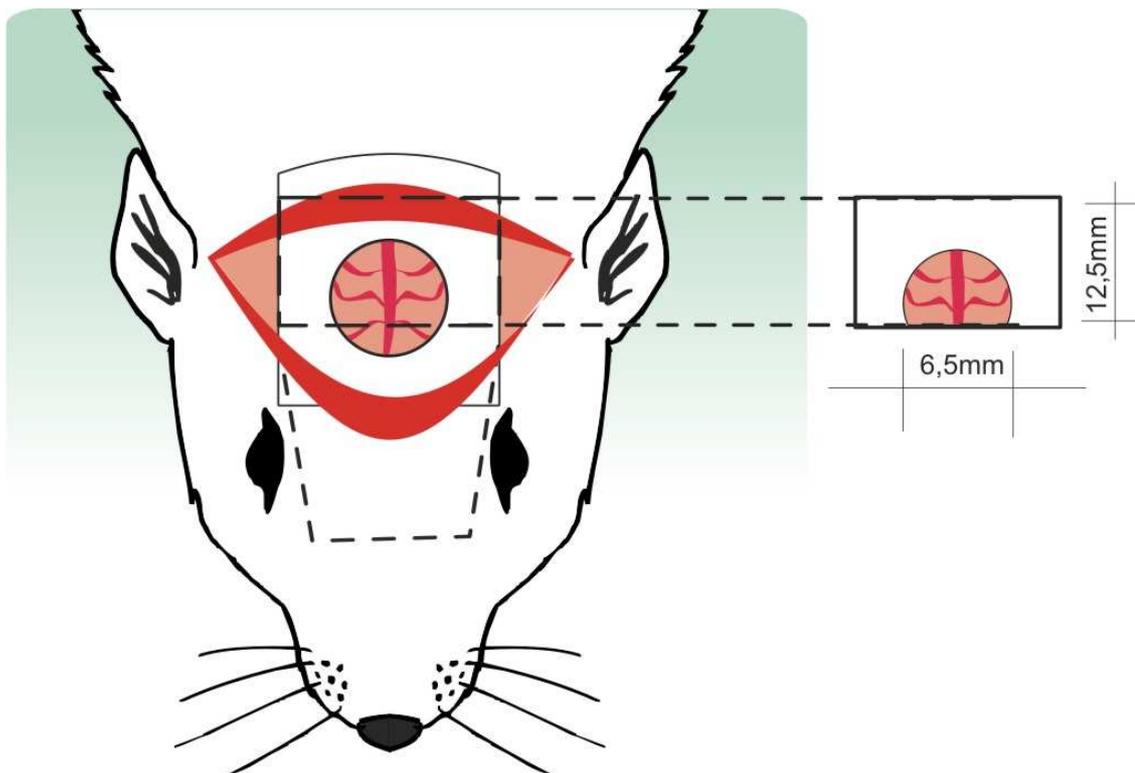


Figura 9. Desenho esquemático das linhas de referência utilizadas para o corte dos espécimes

Lateralmente, de ambos os lados, a extensão do corte estendeu-se 2mm da borda lateral do defeito, na altura do maior diâmetro (9mm), conforme demonstrado na Figura 10 **a, b, c, d.**

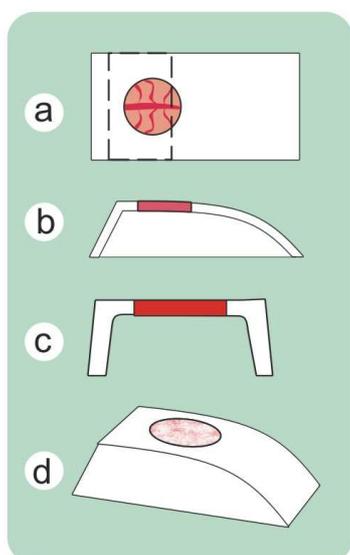


FIGURA 10.

- a.** Vista esquemática superior da calvária animal, o tracejado, corresponde as linhas de orientação para os cortes anterior e posterior da peça.
- b.** Vista esquemática lateral da calvária do animal, visão lateral do defeito.
- c.** Vista esquemática do corte frontal da calvária do animal.
- d.** Perspectiva esquemática da calvária e do respectivo defeito crítico, preenchido com a biomatriz

4.5 PROCESSAMENTO LABORATORIAL

Os espécimes foram processados histologicamente no Laboratório de Bioengenharia, Biomateriais e Cultura de Células do Instituto de Ciências da Saúde (ICS-UFBA).

Concluídos os cortes, o processo de fixação foi seguido o Protocolo estabelecido pela Profa Dra. Maria Eugênia Duarte – UFRJ¹³; para o processo de inclusão em polimetilmetacrilato, sendo os blocos resinosos resultantes de tal processo recortados com discos de corte nº 420¹⁴ montados em motor elétrico¹⁵, em formato padrão para adequada inserção no micrótomo de alto impacto utilizado para corte de tecidos calcificados¹⁶. Os cortes tissulares resultantes, destinados a coloração, obtiveram a espessura de 7µm, com o aspecto de arco transversal, cuja porção central correspondia à área do defeito crítico, e as porções laterais correspondiam às bordas ósseas remanescentes (Figuras 10 c, 11).

No processo de coloração dos cortes histológicos seriados foram utilizados: Hematoxilina-Eosina (HE), Pricrosirius Red (Pifg) e Tricrônico de Goldner (TG) e analisados por microscopia de luz comum¹⁷.

¹³. Comunicação Pessoal

¹⁴. KG Sorensen Indústria e Comércio LTDA. São Paulo – SP

¹⁵. Dremel® Bosch do Brasil. Campinas – SP

¹⁶. Leica RM 2255 - Microsystems® - Germany

¹⁷. Leica Microstar IV ®- Microsystems® - Germany

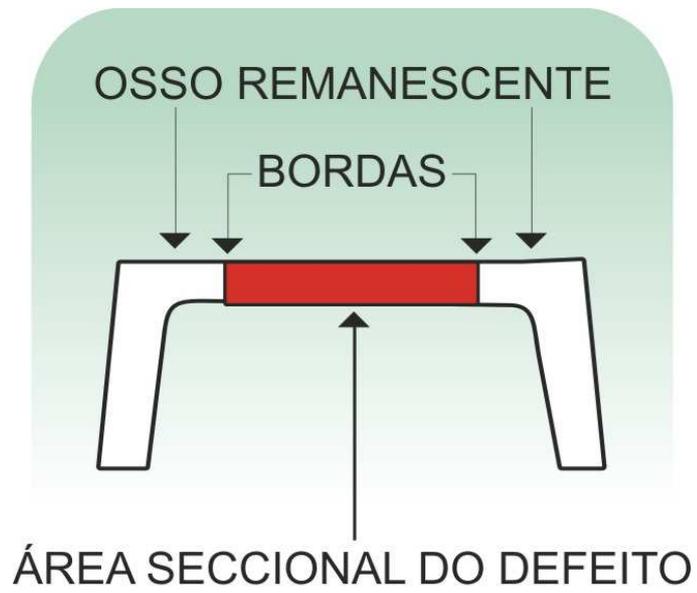


Figura 11. Desenho esquemático, da área seccional do de defeito, após corte no micrótomo

5. RESULTADOS

5.1 ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA

5.1.1 Grupo I

GRUPO I - 7 dias

Observou-se discreta proliferação reativa nas bordas ósseas do defeito, mais concentrada na porção superior da borda voltada para o retalho, com a presença de poucos osteoblastos (Figura 12).

O interstício, em toda a extensão do defeito, estava ocupado por tecido fibroso delgado, sendo mais delgada ainda no centro da lesão.

Presença esporádica de fragmentos ósseos remanescentes, e leve reação inflamatória mononuclear, acompanhada de discreta migração de células fusiformes.

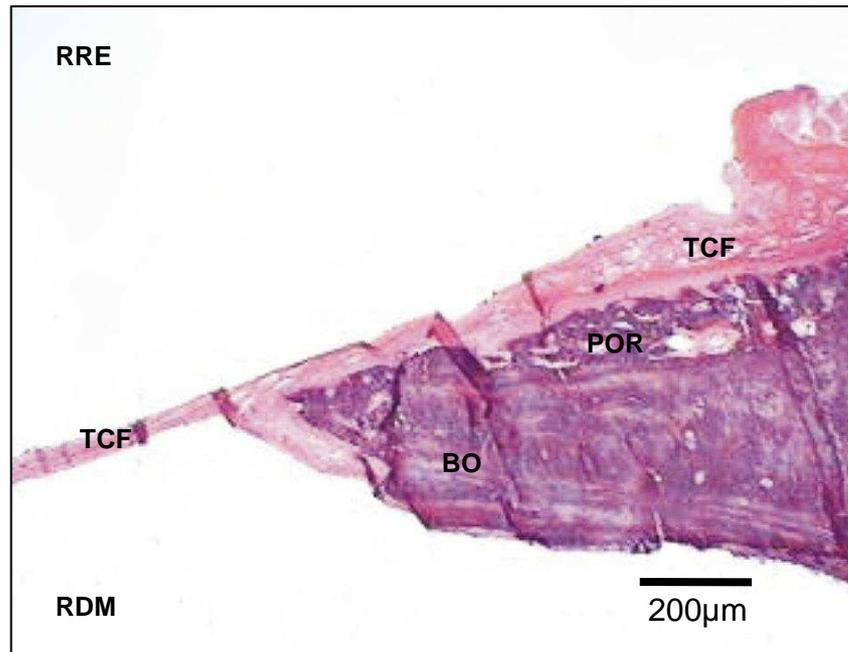


Figura 12. GI 7D HE. Borda óssea remanescente do defeito (**BO**), com proliferação óssea reacional (**POR**), e no interstício tecido conjuntivo fibroso (**TCF**). Região do retalho (**RRE**); Região da dura máter (**RDM**)

GRUPO I – 15 dias

As bordas ósseas do defeito apresentavam aspecto morfológico irregular, com a presença de tecido conjuntivo fibroso pouco denso, preenchendo toda extensão do defeito. Foi observada uma moderada proliferação de capilares sanguíneos, mais evidentes próximo às bordas ósseas.

Foi identificada inflamação crônica discreta, com proliferação moderada de células mesenquimais fusiformes e fibroblastos.

Observou-se ainda a presença de discreto pigmento castanho, a hemossiderina, em acúmulos focais. A área central do defeito foi caracterizada pela presença de pequenos núcleos de mineração (Figuras 13, 14, 15).

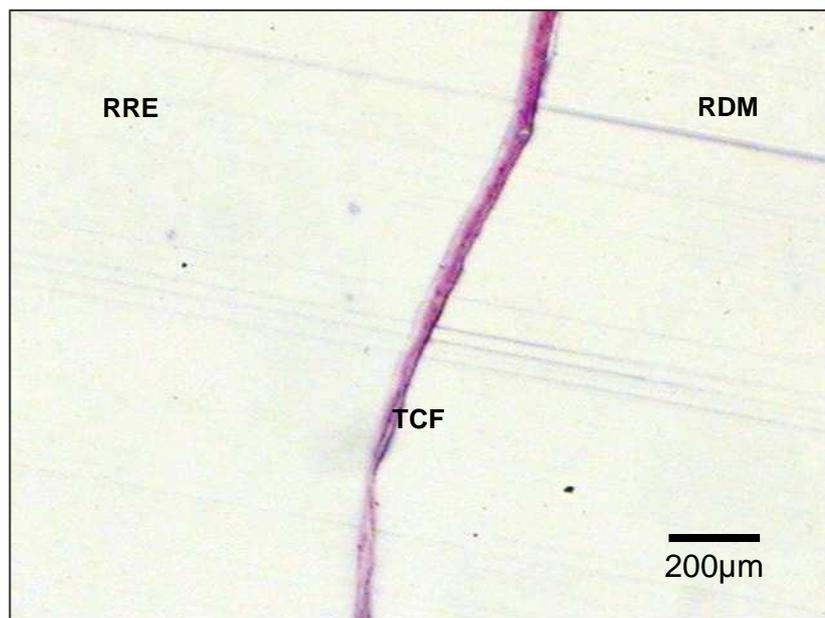


Figura 13. GI 15D HE 1X. Área central do defeito, preenchida por tecido conjuntivo fibroso (TCF). Região do retalho (RRE); Região da dura máter (RDM)

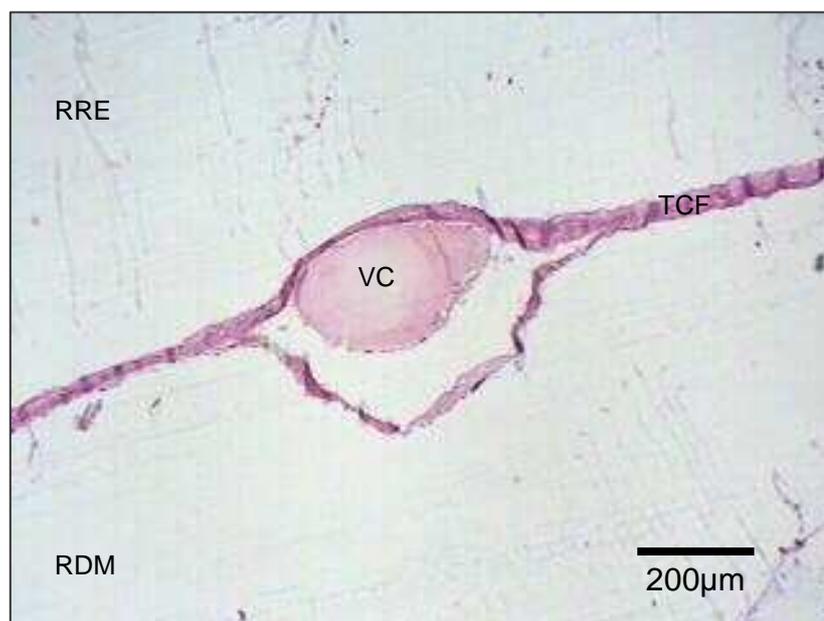


Figura 14. GI 15D HE. Área central do defeito, preenchida por tecido conjuntivo fibroso (TCF), em destaque a veia central (VC). Região do retalho (RRE); Região da dura máter (RDM)

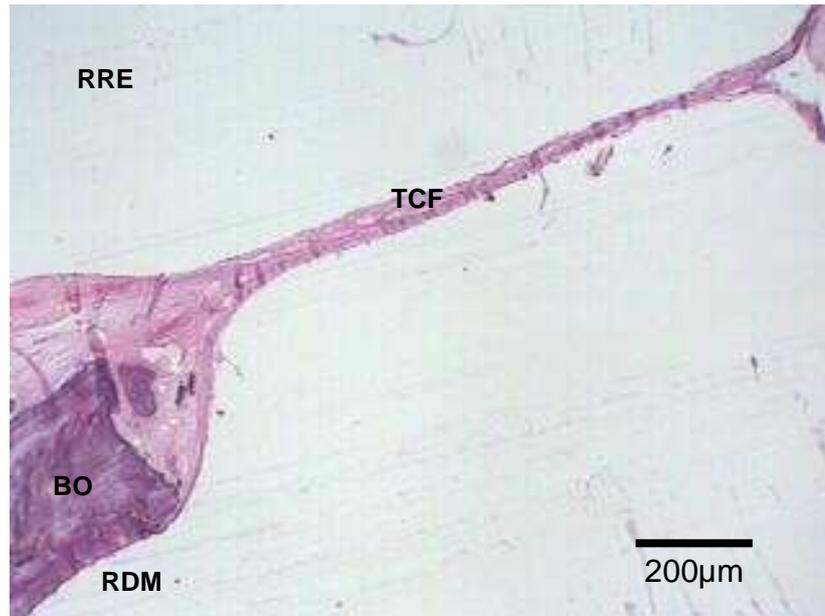


Figura 15. GI 15D HE. Área central do defeito, preenchida por tecido conjuntivo fibroso delgado (TCF), com redução da espessura do defeito. Região do retalho (RRE); Região da dura máter (RDM)

GRUPO I - 45 dias

Presença de tecido fibroso com maior densidade. Comparativamente ao aspecto observado com 15 dias, houve uma redução em espessura de toda extensão linear do defeito (Figura 16).

Observou-se em toda extensão do defeito ausência de células inflamatórias; ocorreram também proliferação vascular e proliferação de células fusiformes, com intensidade mais acentuada próxima às bordas ósseas.

Na região das bordas do reparo foi identificada a presença de uma discreta ossificação reparativa. A área central do defeito foi caracterizada pela ausência de núcleos de mineralização (Figuras 17, 18).

Um dos animais deste grupo apresentou moderada quantidade de pigmento acastanhado na coloração HE, a hemossiderina, no interior de macrófagos. Neste

caso havia concomitantemente abundante proliferação de capilares e de células fusiformes, identificadas como fibroblastos (Figura 19).

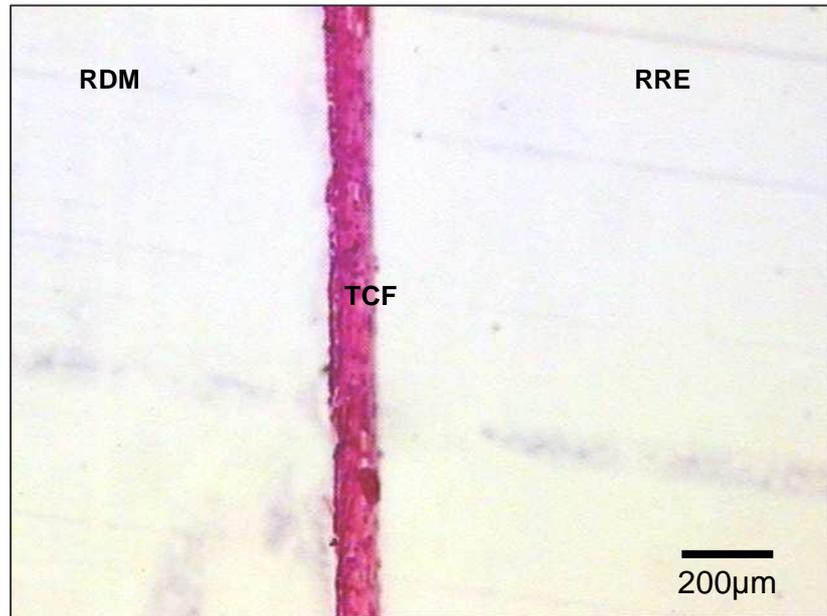


Figura 16. GI 45D HE. Tecido conjuntivo fibroso (TCF), na área central do defeito, com redução linear da sua espessura. Região do retalho (RRE); Região da dura mater (RDM)

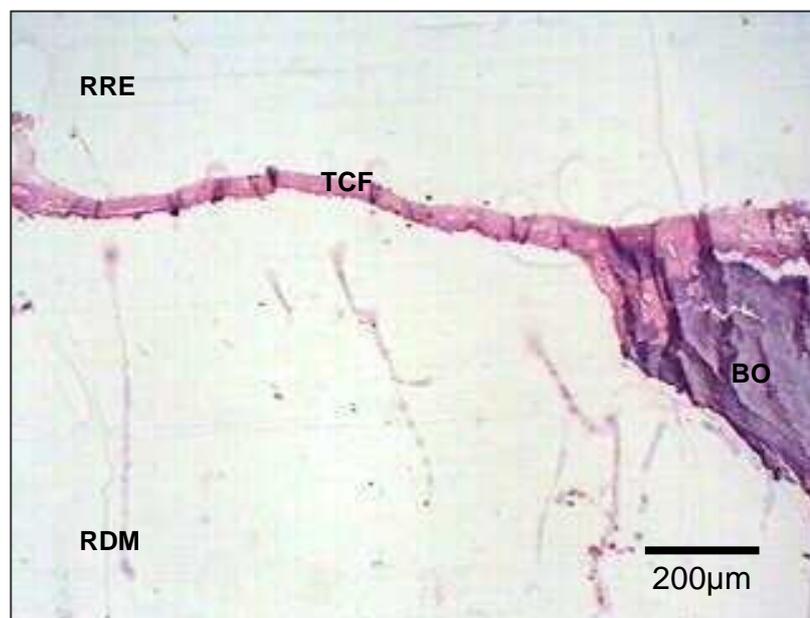


Figura 17. GI 45D HE. Aspecto da borda óssea (BO) com discreta ossificação reparativa, e o interstício preenchido com tecido conjuntivo fibroso (TCF). Região do retalho (RRE); Região da dura mater (RDM)

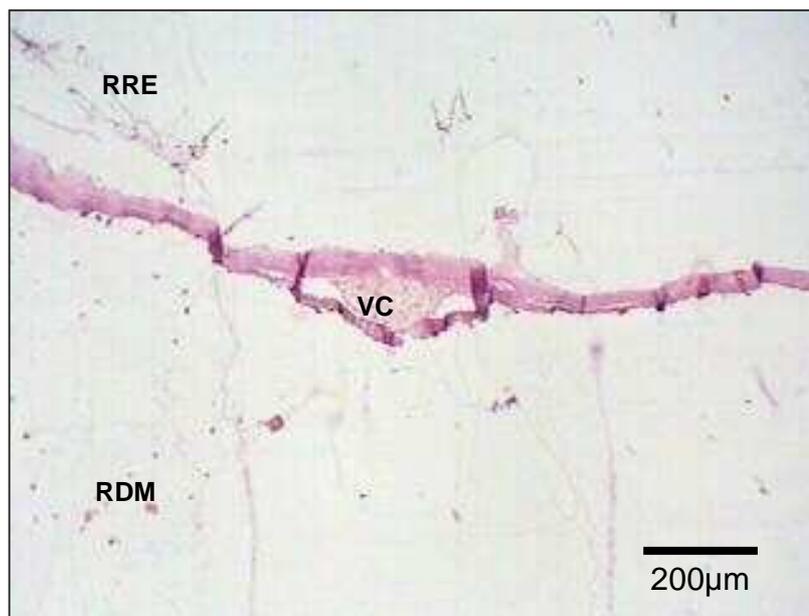


Figura 18. GI 45D HE. Área central do defeito, preenchida por tecido conjuntivo fibroso (TCF), em detalhe a veia central (VC). Região do retalho (RRE); Região da dura máter (RDM).

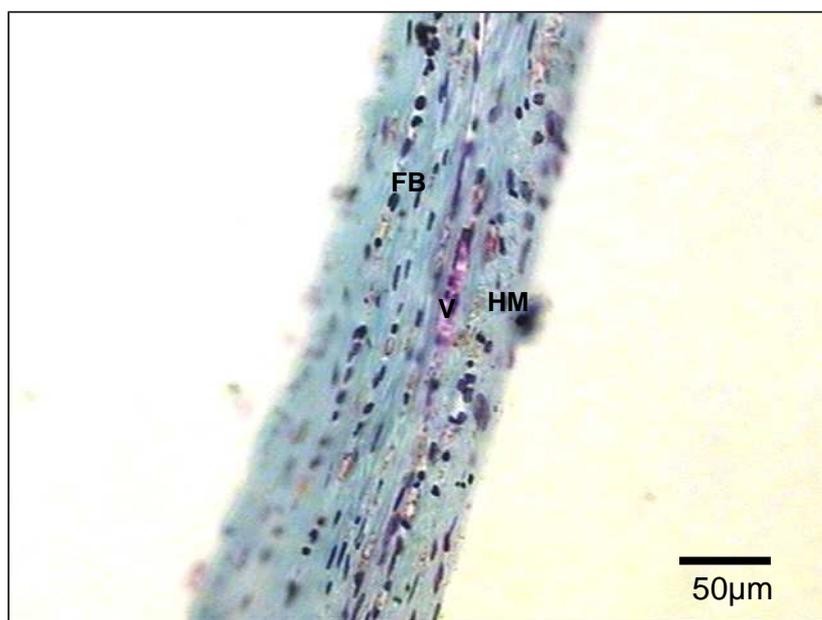


Figura 19. GI 45D GOLD. Proliferação de células fusiformes (fibroblastos) (FB); pigmentos acastanhados de hemossiderina (HM). Vaso sanguíneo (V)

GRUPO I - 120 dias

As bordas ósseas do defeito apresentavam ausência total de proliferação osteobástica (Figura 20). Observou-se na grande parte dos cortes histológicos, a presença de fibrose mais densa envolvendo toda extensão do defeito; sua intensidade apresentava-se muito maior em relação aos outros pontos biológicos relacionados com o mesmo grupo-controle deste estudo.

Mais próximo às bordas ósseas foi possível identificar a presença de proliferação vascular, que se tornava discreta à proporção que se distanciava das bordas em direção ao centro do defeito.

Em toda a extensão do defeito notou-se ausência de células inflamatórias e, em alguns casos, na região central do defeito podem-se observar núcleos de mineração focal (Figura 21).

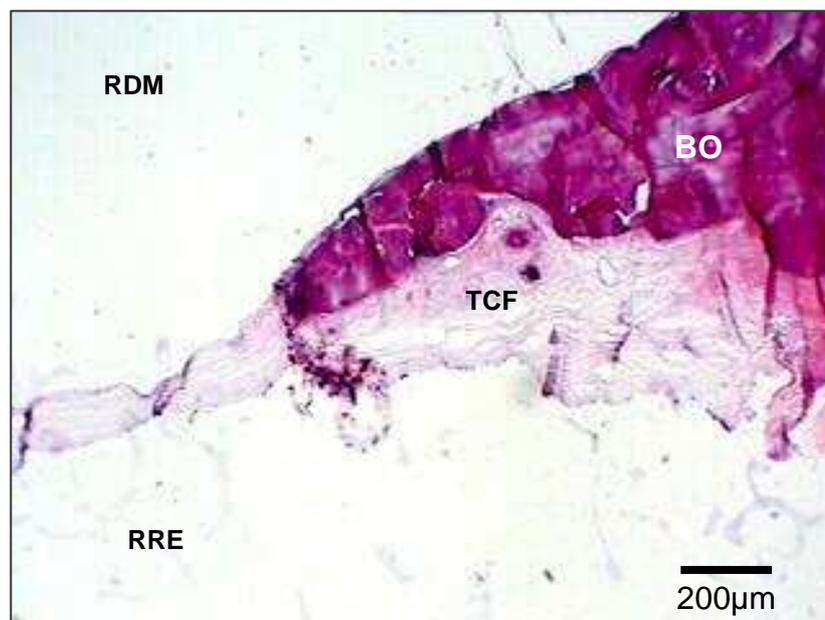


Figura 20. GI 120dias HE. Borda óssea (BO) sem proliferação óssea reparativa, presença de tecido conjuntivo fibroso (TCF), no interstício. Região do retalho (RRE); Região da dura máter (RDM)

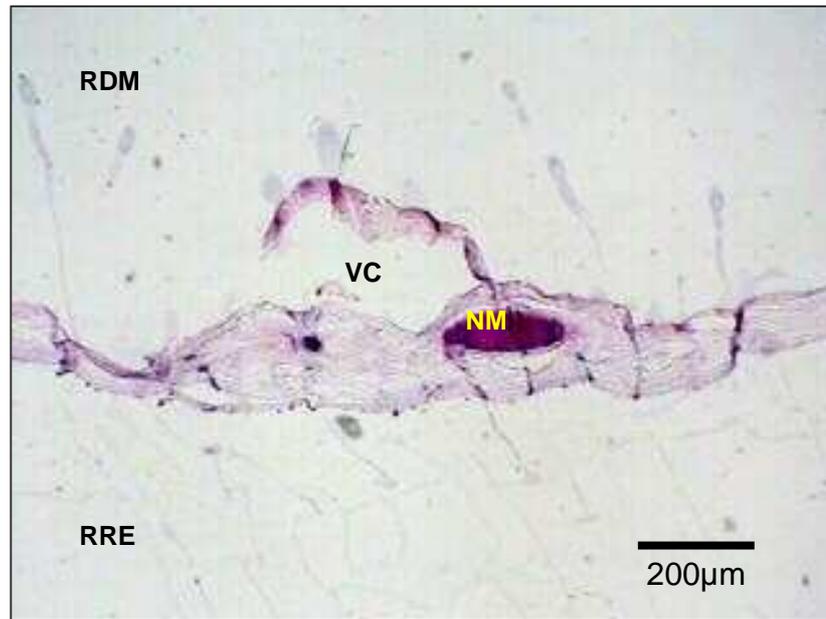


Figura 21. GI 120dias HE. Área central do defeito, com núcleo de mineralização (NM) esporádico, contaminante e focal. Veia central (VC). Região do retalho (RRE); Região da dura máter (RDM)

5.1.2 Grupo II

GRUPO II - 7 dias

As bordas ósseas apresentavam-se com discreta proliferação reativa. O biomaterial implantado ocupou quase toda a extensão do defeito, circundado por tecido de granulação, constituído de edema, proliferação vascular e denso infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear (Figura 22).

Os polimorfonucleares foram vistos em grande quantidade no interior do material implantado, em especial na região voltada para o retalho, com migração centrípeta (Figura 23).

Observou-se com freqüência, reação gigante-celular, acentuada na periferia do biomaterial, acompanhada de proliferação vascular. Na região mais central do

biomaterial, apesar da ausência de capilares, nota-se um exsudato, e acentuada hemorragia (Figuras 24, 25, 26).

Concomitante à proliferação vascular existe deposição de matriz colagênica, mais densa na periferia do material, e quase ausente no centro dele, acompanhada de proliferação fibroblástica (Figuras 27, 28, 29, 30, 31).

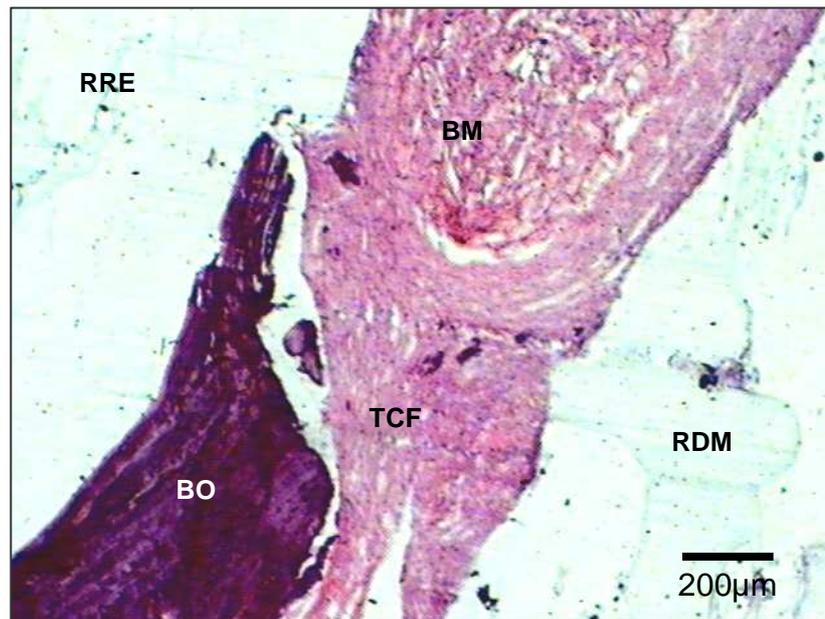


Figura 22. GII 7dias HE. Região próxima à borda óssea (BO), com área de deposição de tecido conjuntivo fibroso (TCF) na interface entre a borda e o biomaterial (BM). Região do retalho (RRE); Região da dura mater (RDM)

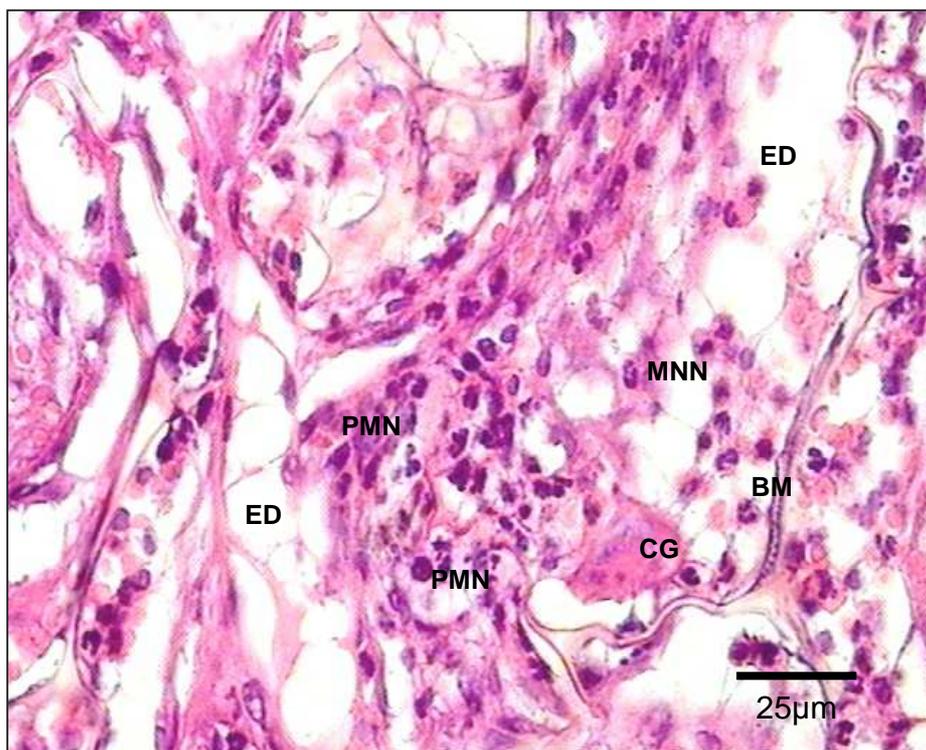


Figura 23. GII 7dias HE. Reação inflamatória com mononucleares (MNN) e polimorfonucleares (PMN), associadas ao biomaterial (BM). Célula gigante (CG); Edema (ED)

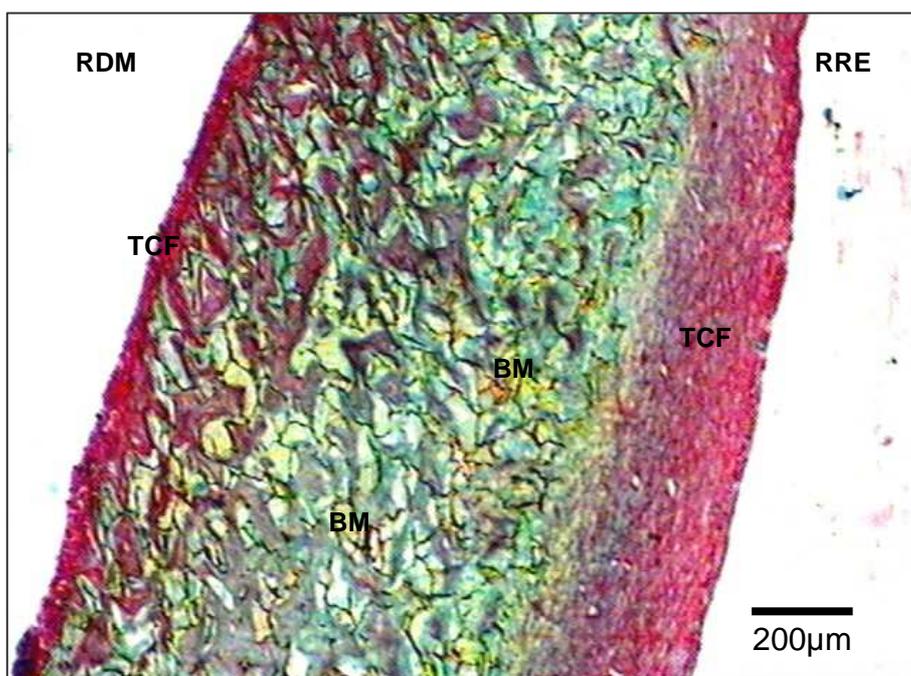


Figura 24. GII 7dias PIFG. Biomaterial (BM) associado à reação inflamatória, com presença de tecido conjuntivo fibroso (TCF) com migração centrípeta. Região do retalho (RRE); Região da dura máter (RDM)

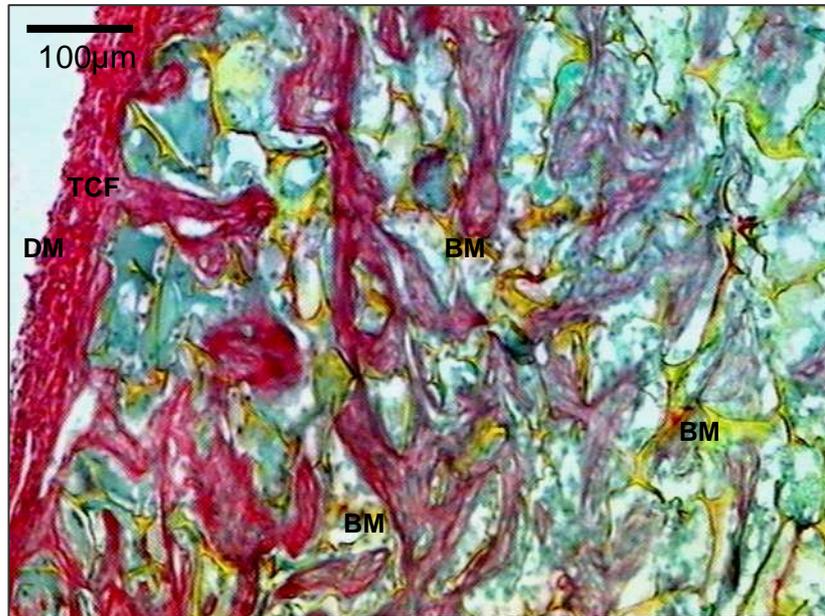


Figura 25. GII 7dias PIFG. Detalhe da figura anterior, com destaque para deposição centrípeta de tecido conjuntivo fibroso (TCF) de permeio ao biomaterial (BM). Dura máter (DM)

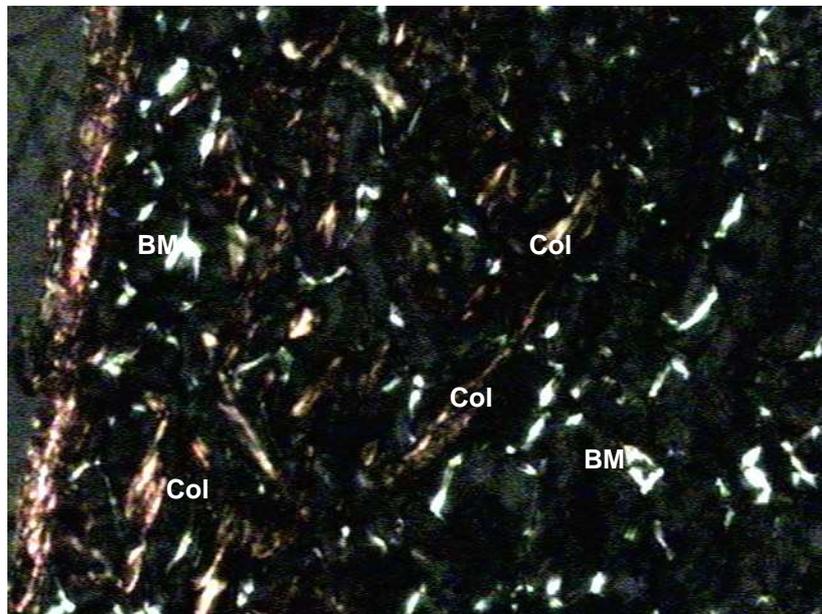


Figura 26. GII 7dias. PIFG Luz Polarizada. Detalhe da figura anterior, em que o biomaterial (BM) aparece polarizado em cor branca e colágeno (Col) em cor avermelhada

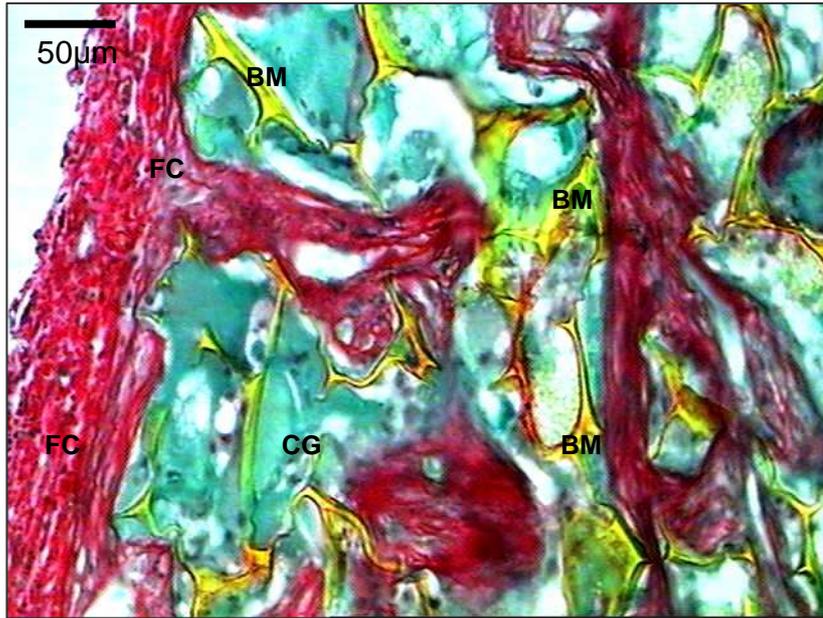


Figura 27. GII 7dias PIFG. Fibras colágenas (FC) de permeio ao biomaterial e reação granulomatosa sobre o biomaterial (BM). Células gigantes (CG)

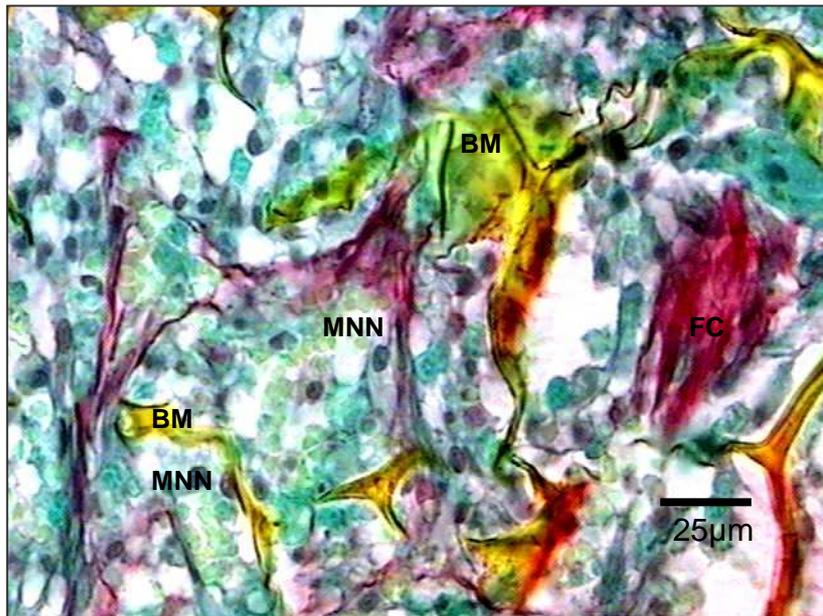


Figura 28. GII 7dias PIFG. Fragmentos do biomaterial (BM). Presença de células mononucleares (MNN) e deposição de fibras colágenas (FC)



Figura 29. GII 7dias GOLD. Biomaterial (BM) com deposição de tecido conjuntivo (TC), presença de células inflamatórias e fibroblastos (FB).

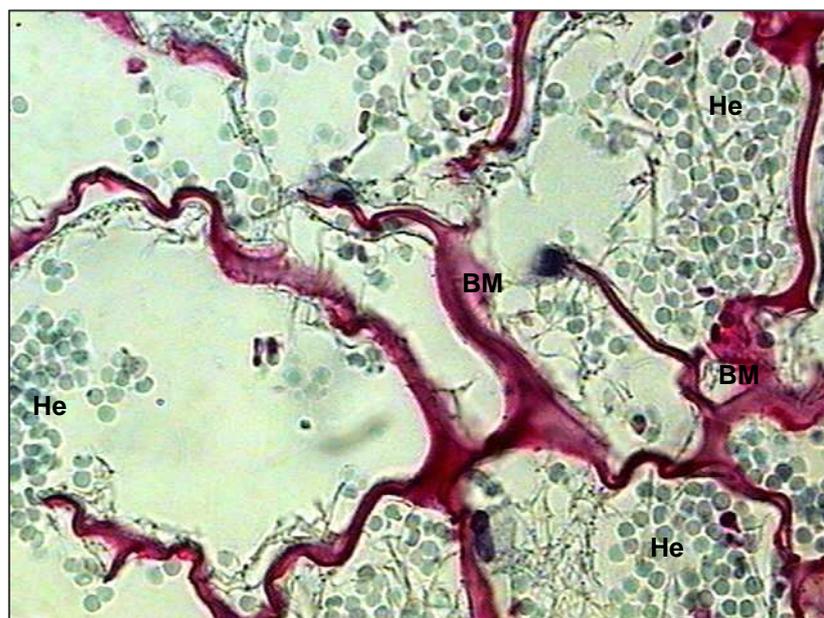


Figura 30. GII 7dias GOLD. Áreas hemorrágicas de permeio ao biomaterial (BM). Hemáceas (He)

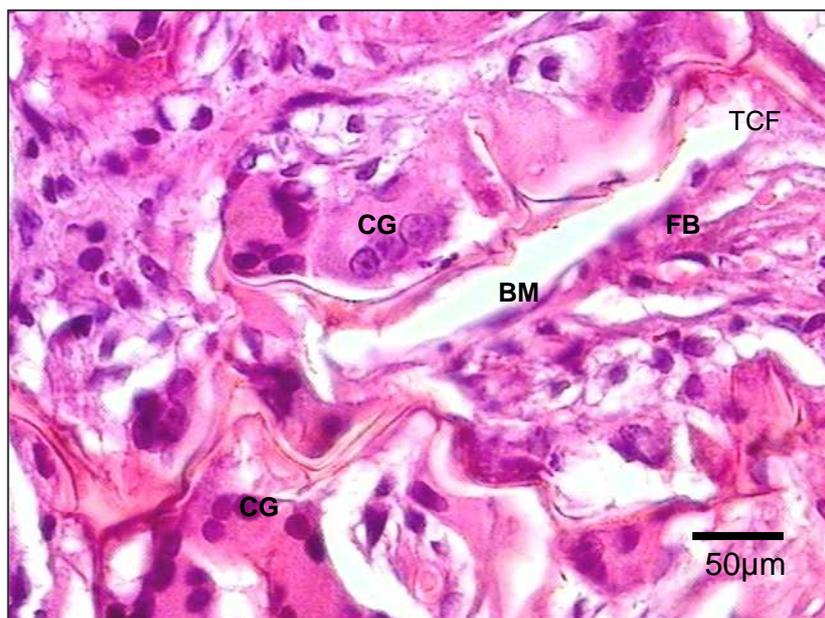


Figura 31. GII 7dias HE. Presença de células gigantes (**CG**) sobre o biomaterial (**BM**). Tecido conjuntivo fibroso (**TCF**); Fibroblastos (**FB**)

GRUPO II - 15 dias

Observou-se uma proliferação óssea reparativa muito discreta nas bordas ósseas do defeito. O biomaterial implantado apresentava uma reação granulomatosa que não se restringe mais à periferia, mas também começa a ser vista na área central do biomaterial.

A proliferação vascular acompanha a reação granulomatosa, a migração de fibroblastos e a deposição de matriz colagênica, de forma centrípeta (Figuras 32, 33, 34, 35).

Ausência de áreas de mineralização na região do biomaterial.

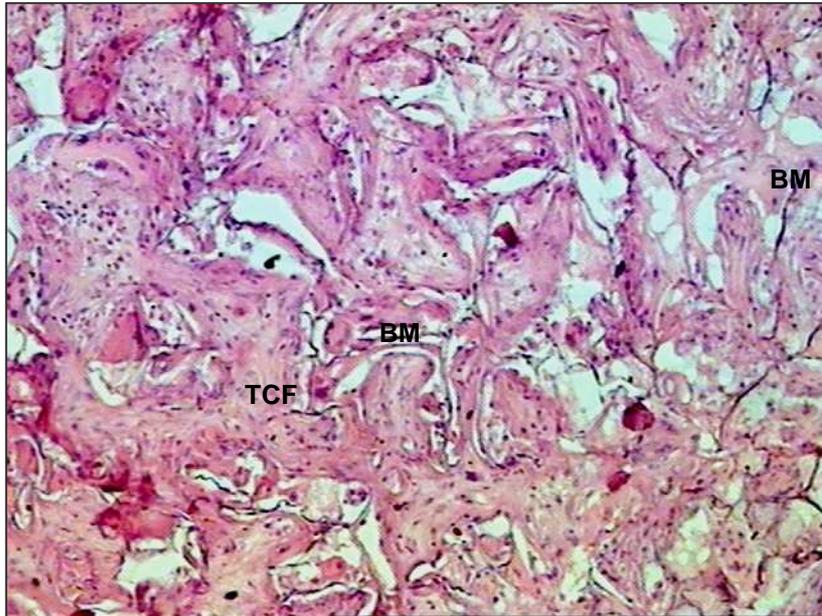


Figura 32. GII 15dias HE. Aspecto da área central do defeito caracterizado pela deposição de tecido conjuntivo fibroso (TCF) entre o biomaterial (BM)

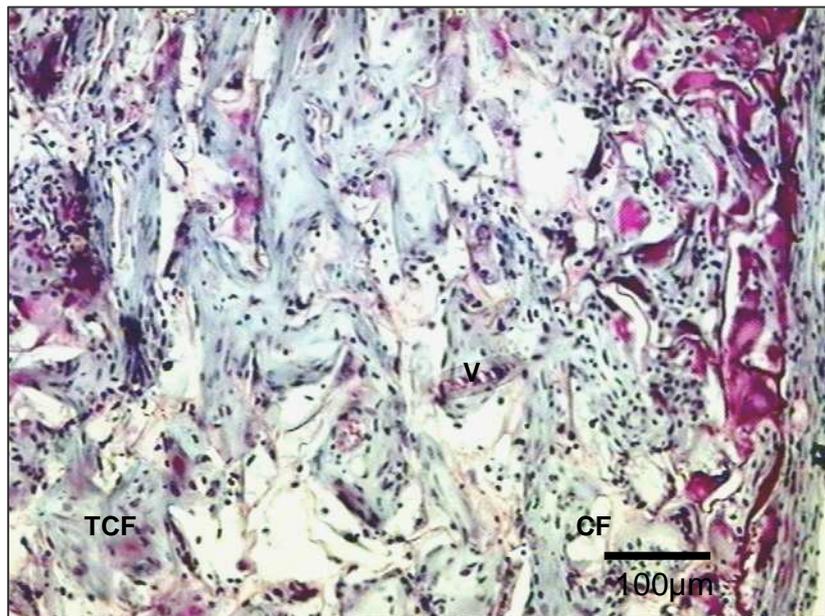


Figura 33. GII 15dias GOLD. Presença de tecido conjuntivo fibroso (TCF) e reação granulomatosa, células fusiformes (CF) e vasos sanguíneos (V)

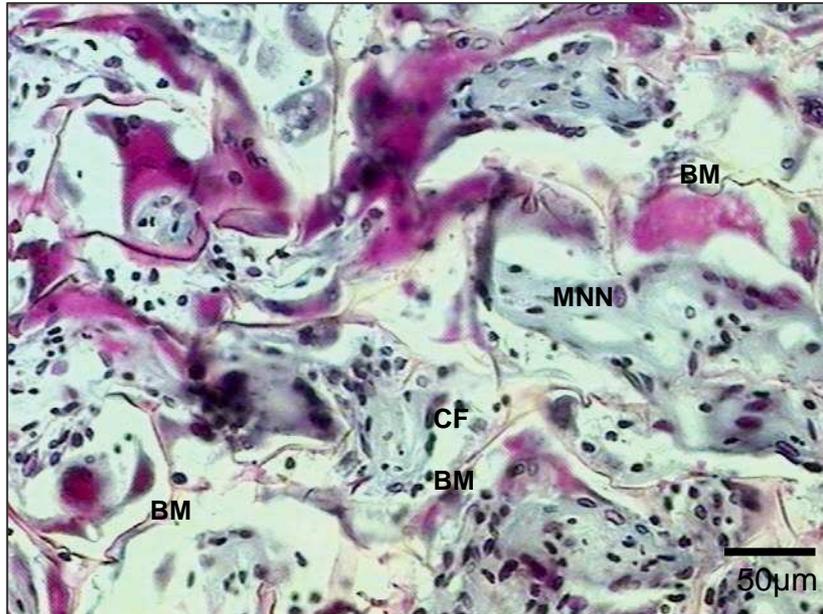


Figura 34. GII 15dias GOLD. Detalhe da figura anterior. Biomaterial (**BM**); Células fusiformes (**CF**); Tecido conjuntivo fibroso(**TCF**). Células Mononucleares, (**MNN**)

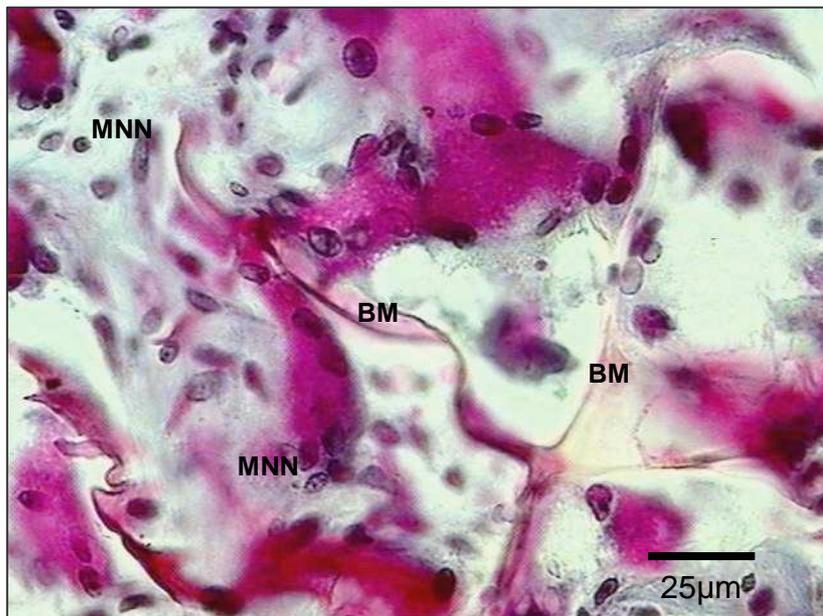


Figura 35. GII 15 dias GOLD. Ampliação da figura anterior. Em destaque a presença de células mononucleares (**MNN**); e biomaterial (**BM**)

GRUPO II – 45 dias

Neste ponto biológico, as bordas ósseas do defeito apresentaram-se sem proliferação óssea. Na interface entre biomaterial e tecido ósseo remanescente, observou-se a existência de tecido conjuntivo mais adensado.

Foi observada também reação granulomatosa mais acentuada, vista em toda extensão do biomaterial, que se apresenta mais fragmentado do que nos pontos biológicos anteriores (Figuras 36,37,38, 39, 40, 41, 42).

A região do biomaterial apresentou-se sem áreas de mineralização em toda a sua extensão.

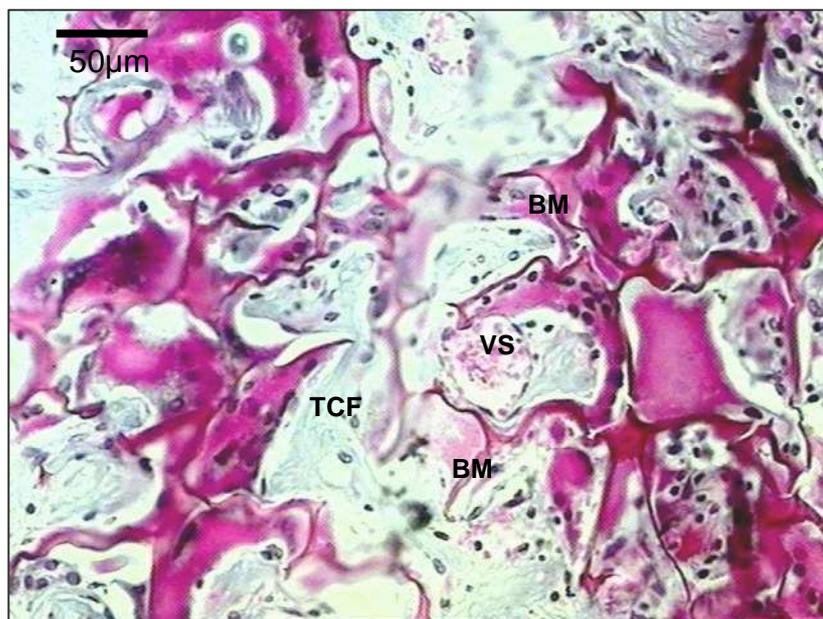


Figura 36. GII 45dias GOLD. Maior dissociação do biomaterial (**BM**), reação granulomatosa e deposição de tecido conjuntivo (**TCF**). Presença de vasos sanguíneos (**VS**) e células gigantes (**CG**)

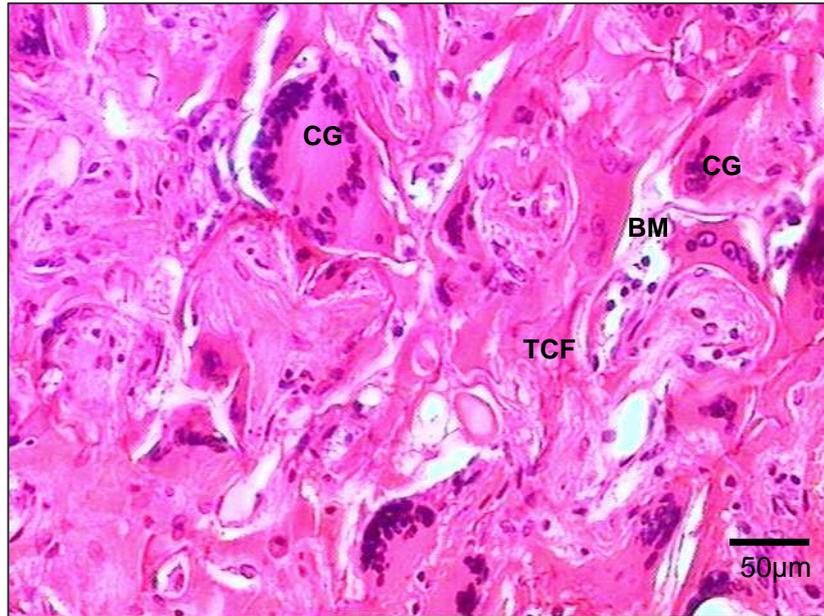


Figura 37. GII 45dias HE. Tecido conjuntivo fibroso (**TCF**), células gigantes (**CG**) sobre os fragmentos do biomaterial (**BM**)

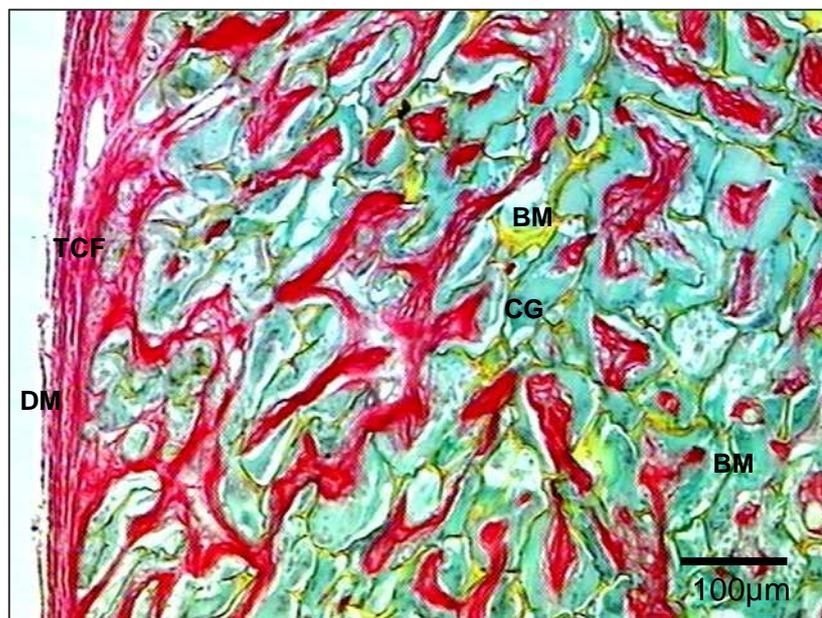


Figura 38. GII 45dias PIFG. Migração centrípeta de tecido conjuntivo (**TCF**) sobre o biomaterial (**BM**), com a mesma tendência de migração de células gigantes (**CG**). Biomaterial em dissociação. Dura máter (**DM**); Colágeno (**C**)

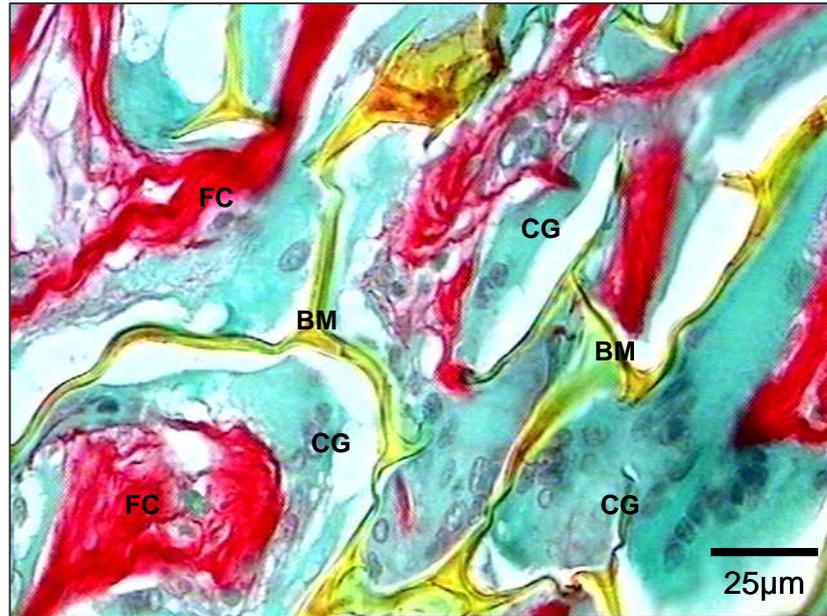


Figura 39. GII 45dias PIFG. Detalhe da figura anterior, com destaque para células gigantes (CG), e fibras colágenas (FC) entre o biomaterial (BM)

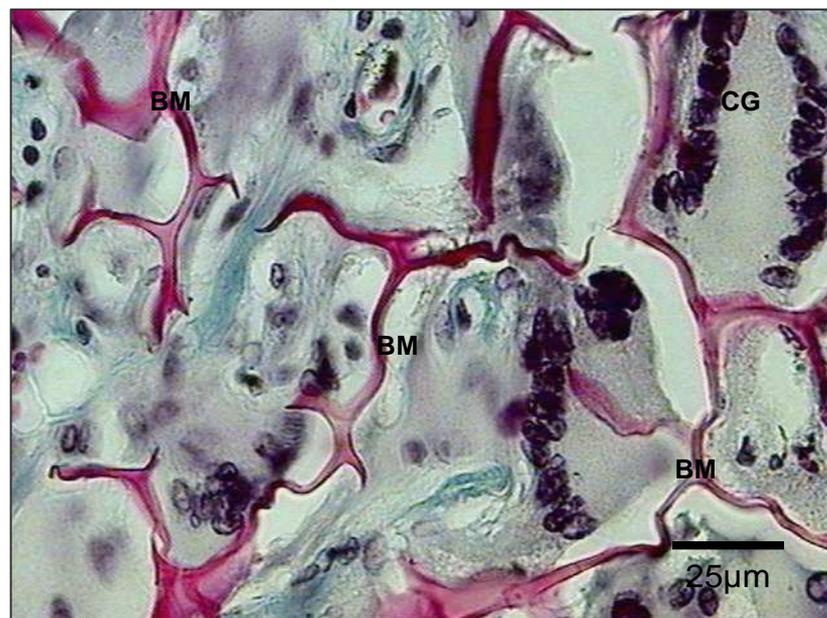


Figura 40. GII 45dias GOLD. Reação granulomatosa sobre o biomaterial (BM). Células gigantes (CG)



Figura 41. GII 45dias GOLD. Células gigantes (CG) e mononucleares (MNN) associadas ao biomaterial (BM), células fusiformes (CF), vasos sanguíneos (VS), fibras colágenas (FC)

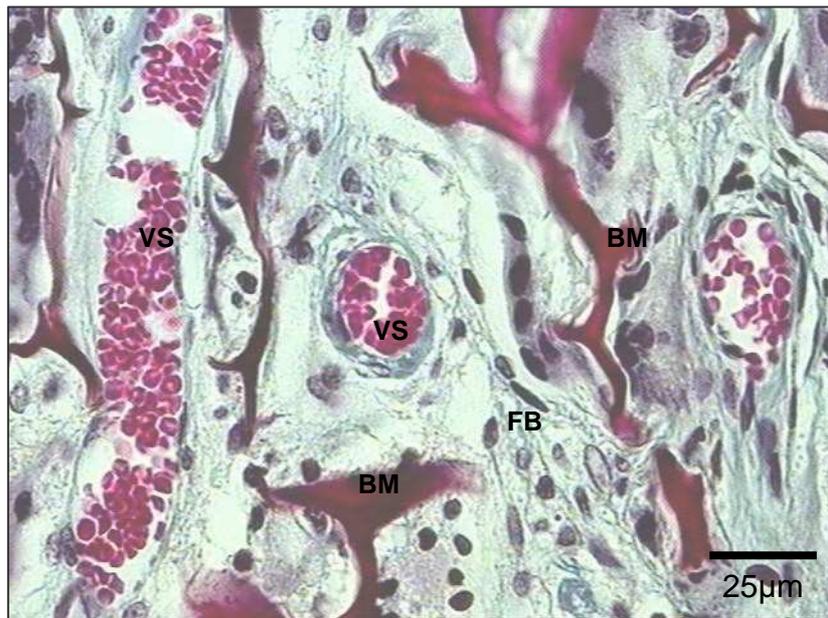


Figura 42. GII 45dias GOLD. Vasos sanguíneos (VS), células fusiformes (CF), células gigantes (CG) e tecido conjuntivo fibroso (TCF) de permeio ao biomaterial (BM) em fragmentação

GRUPO II - 120 dias

As bordas ósseas apresentaram-se sem proliferação óssea reparativa. Presença de reação granulomatosa mais acentuada. Na região do biomaterial, este apresentou-se bastante fragmentado, com maior deposição de fibroblastos e um tecido conjuntivo fibroso de maior densidade (Figura 43, 44, 45, 46, 47, 48).

Notou-se a presença de poucos capilares de permeio ao biomaterial.

Enfatiza-se a ausência de áreas de mineralização em toda a extensão do biomaterial.

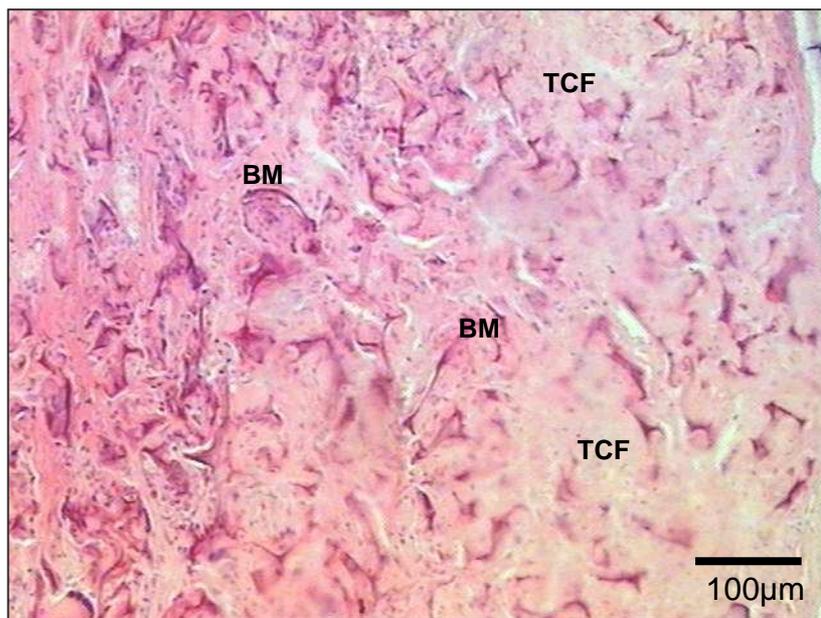


Figura 43. GII 120dias HE. Biomaterial (**BM**) mais fragmentado do que no período anterior, com maior deposição de tecido conjuntivo (**TCF**) de permeio

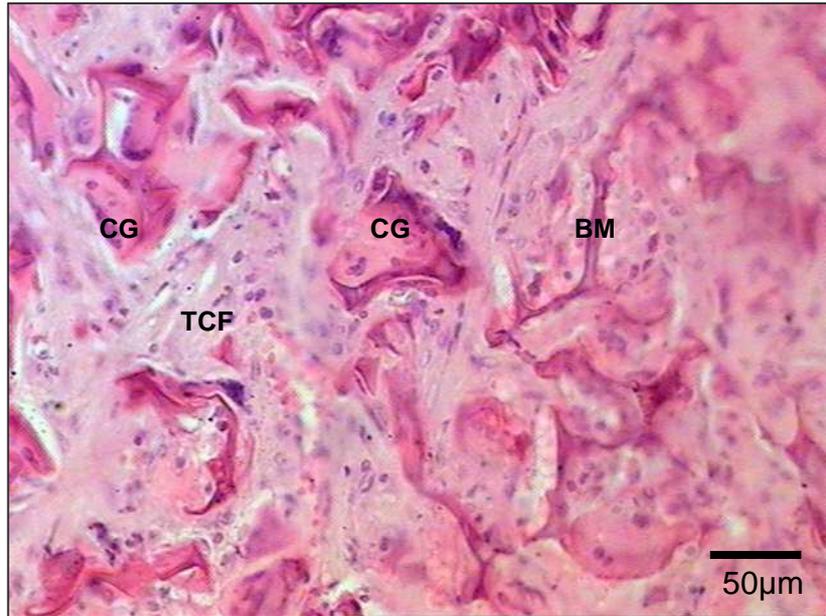


Figura 44. GII 120dias HE. Biomaterial (**BM**) fragmentado com presença de células gigantes (**CG**) sobre os fragmentos; Tecido conjuntivo fibroso (**TCF**)

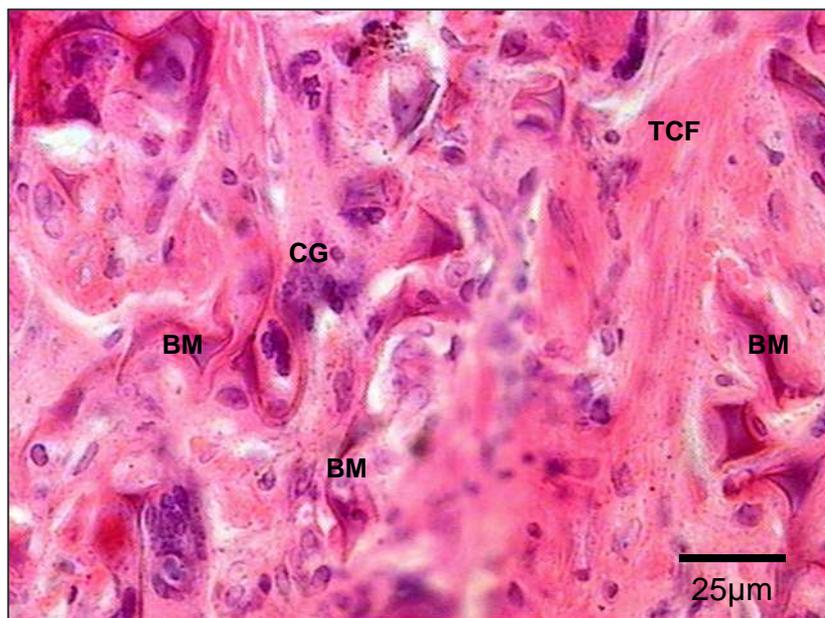


Figura 45. GII 120dias HE. Tecido conjuntivo fibroso (**TCF**) entre os fragmentos do biomaterial (**BM**), células gigantes (**CG**)

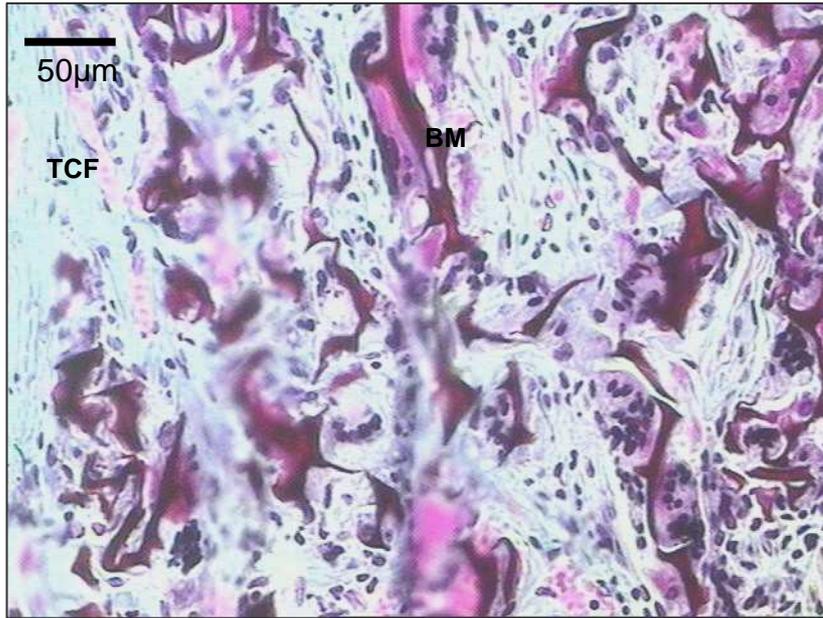


Figura 46. GII 120dias GOLD. Biomaterial (**BM**) bastante dissociado, com deposição de tecido conjuntivo fibroso (**TCF**), e reação granulomatosa associada

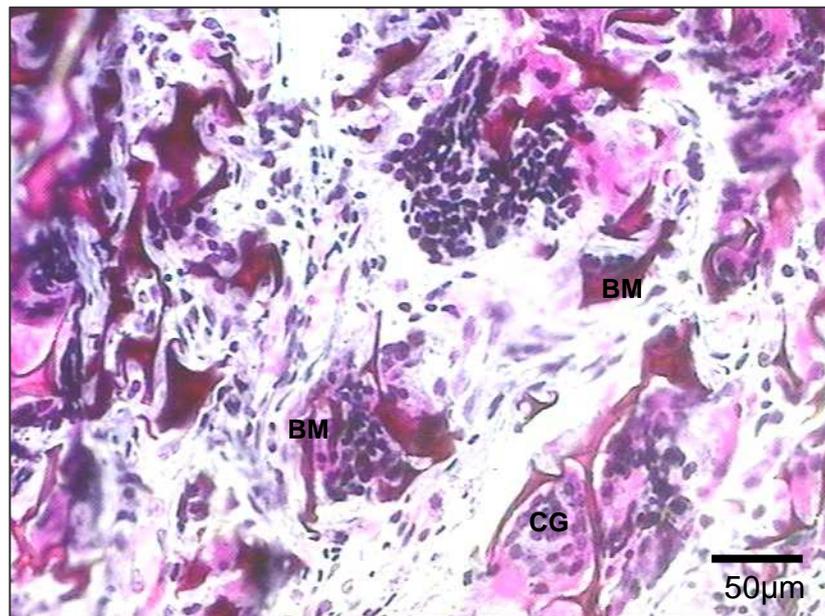


Figura 47. GII 120dias GOLD. Biomaterial (**BM**) bastante fragmentado com intensa atividade gigante-celular sobre os fragmentos residuais. Células gigantes (**CG**)

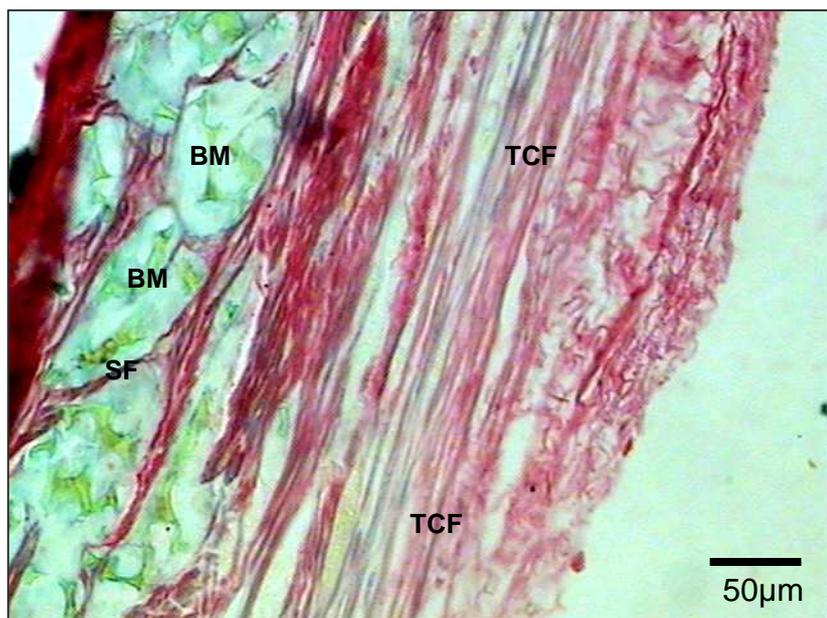


Figura 48. GII 120dias PIFG. Maior deposição de tecido conjuntivo fibroso (**TCF**) de forma delimitante ao biomaterial (**BM**), bem como de permeio a este. Septo fibroso (**SF**)

5.1.3 Grupo III

GRUPO III- 7 dias

Observou-se uma proliferação óssea reativa muito discreta nas bordas ósseas do defeito. Presença de tecido conjuntivo frouxo, com proliferação de células fusiformes, e proliferação vascular de capilares na interface entre biomaterial e bordas ósseas.

O biomaterial apresenta-se em início de dissociação (Figura 49). Havia acentuada reação inflamatória com presença de polimorfonucleares e mononucleares em torno do biomateria (Figura 50). Não foi observada a presença de áreas de mineralização, associadas à implantação do biomaterial.



Figura 49. GIII 7dias PIFG. Aspecto da área central da biomatriz, o biomaterial (**BM**) aparece em início de fragmentação. Tecido conjuntivo frouxo (**TCFx**); Região do retalho (**RRE**); Região da dura máter (**RDM**)

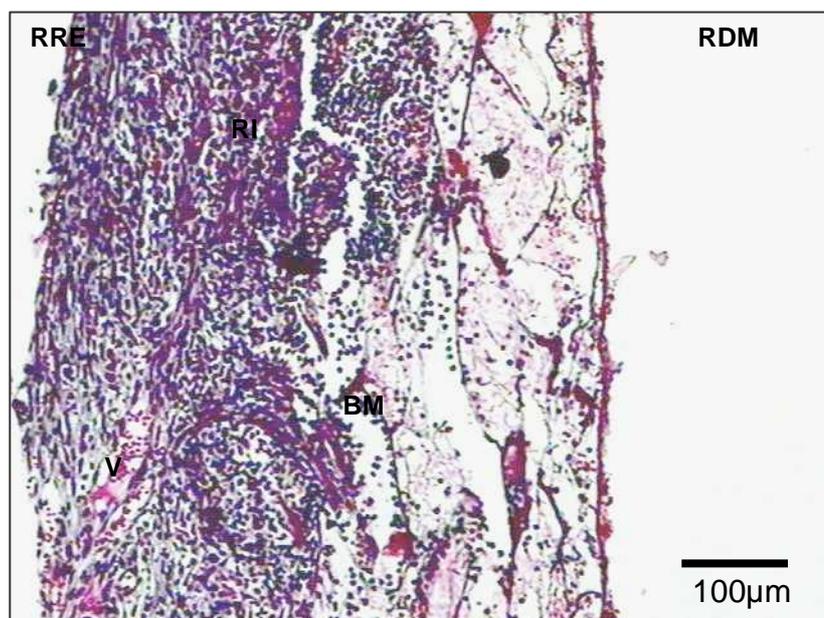


Figura 50. GIII 7dias GOLD. Intensa reação inflamatória (**RI**) com polimorfonucleares e mononucleares, associada ao biomaterial (**BM**). Região do retalho (**RRE**); Região da dura máter (**RDM**), Vaso sanguíneo (**V**)

GRUPO III- 15 DIAS

As bordas ósseas apresentavam-se com discreta proliferação óssea reativa. Na interface biomaterial-borda óssea observou-se a presença de tecido conjuntivo frouxo, com formação de edema, proliferação de capilares e moderado infiltrado mononuclear difuso (Figura 51).

Houve proliferação fibroblástica. O biomaterial apresentou-se parcialmente fragmentado, circundado e permeado por reação granulomatosa. Além disso, de permeio houve denso infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear, com conseqüente fragmentação do biomaterial (Figuras,52, 53, 54, 55, 56,57).

Não foram visualizadas áreas de mineralização.

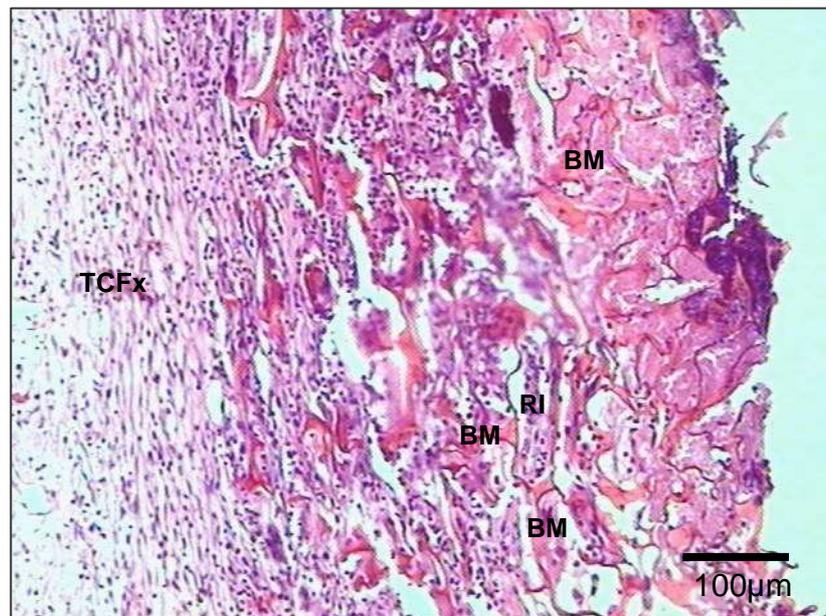


Figura 51. GIII 15dias HE. Biomaterial (BM) em fragmentação progressiva, com infiltrado inflamatório (RI) por polimorfonucleares e mononucleares e reação granulomatosa. Tecido conjuntivo frouxo(TCFx)

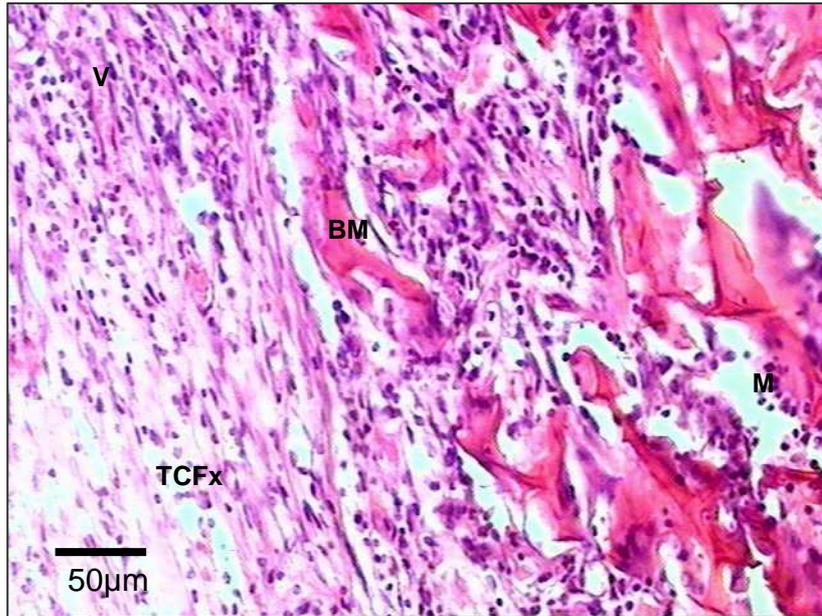


Figura 52. GIII 15dias HE. Deposição de tecido conjuntivo frouxo (TCFx), com vasos sangüíneos (V) na superfície do biomaterial (BM), sem permeá-lo; intensa atividade macrófágica (M) sobre o biomaterial

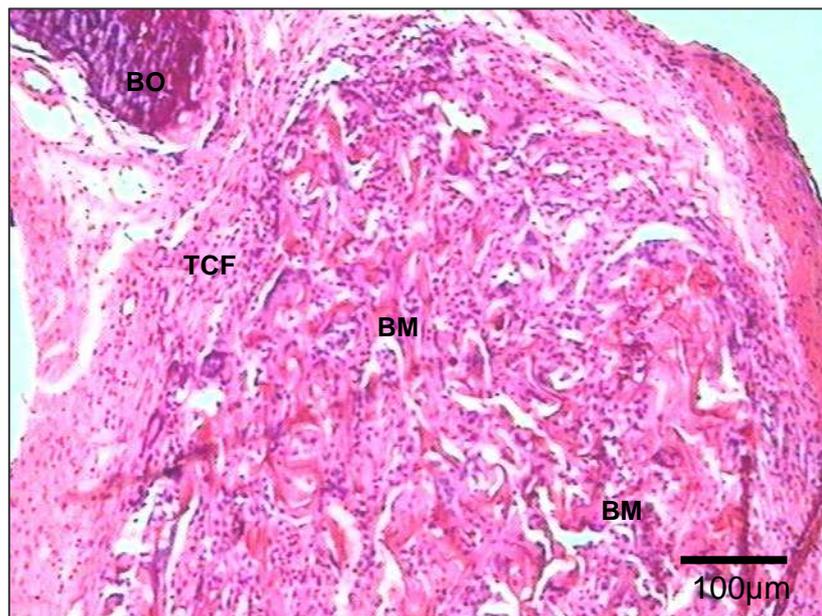


Figura 53. GIII 15dias HE. Deposição de tecido conjuntivo fibroso (TCF) na interface borda óssea reparativa (BO) e biomaterial (BM)

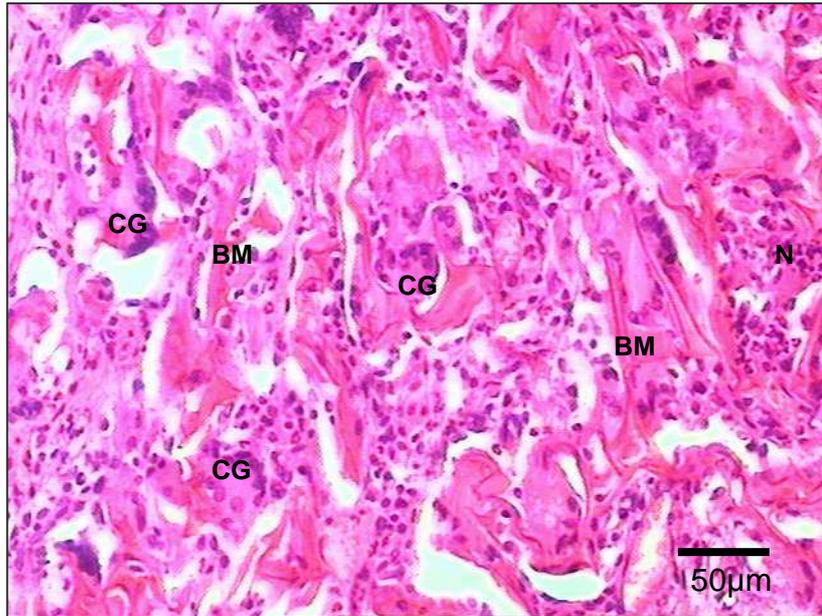


Figura 54. GIII 15dias HE. Intensa reação inflamatória associada aos fragmentos do biomaterial (BM), predominantemente granulomatosa. Neutrófilos (N); Células gigantes (CG)

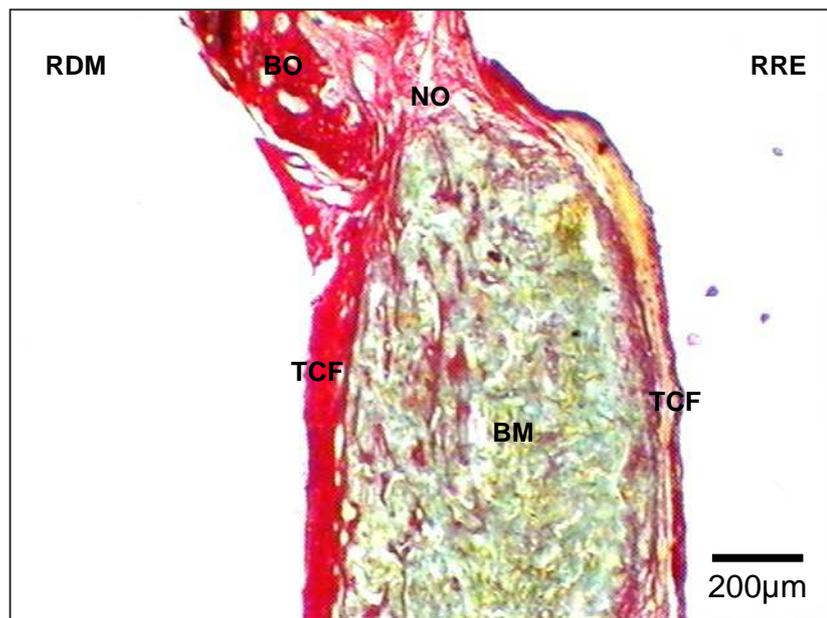


Figura 55. GIII 15dias PIFG. Deposição de tecido conjuntivo fibroso (TCF) em torno do biomaterial (BM), com raras regiões de permeio a este. Borda óssea (BO); Neoformação óssea (NO)

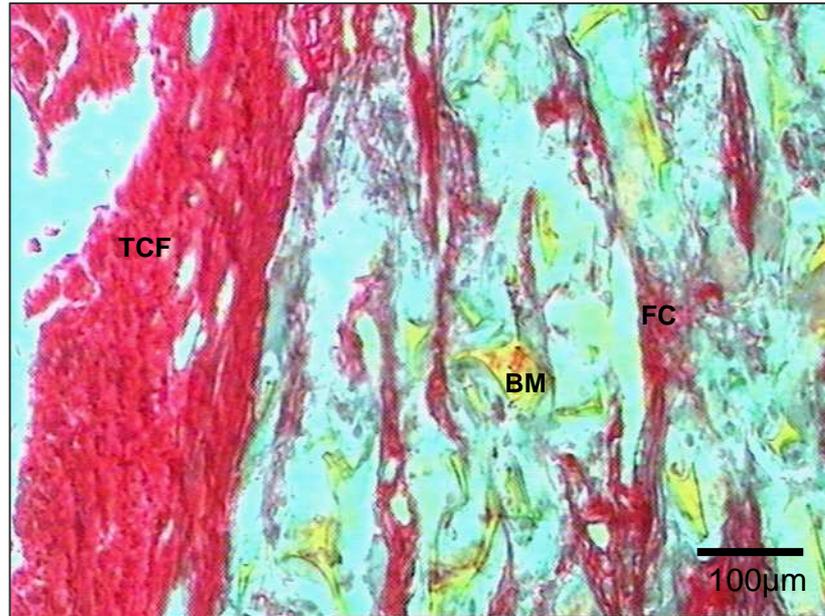


Figura 56. GIII 15dias PIFG. Biomaterial (**BM**) bastante fragmentado, delimitado por tecido conjuntivo fibroso (**TCF**) e com finos septos de deposição de fibras colágenas (**FC**) entre o biomaterial, mais localizadas na sua periferia

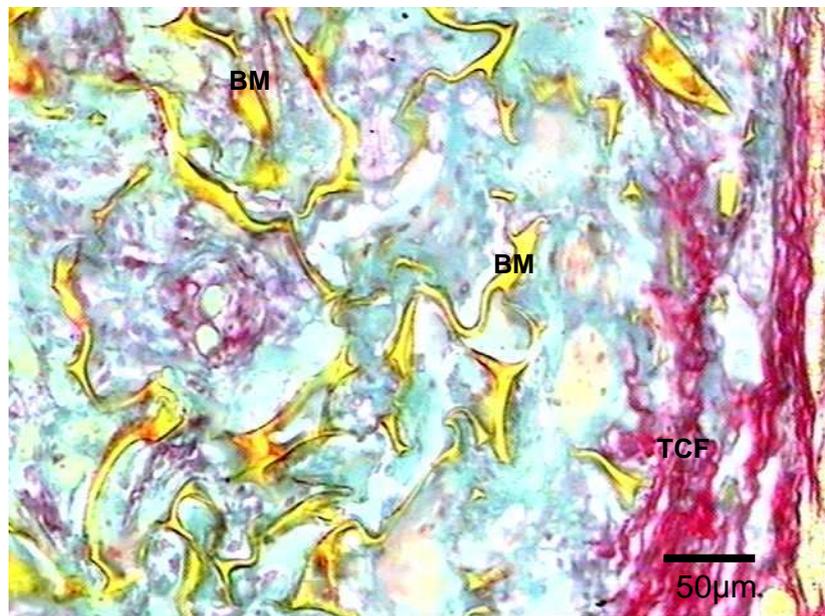


Figura 57. GIII 15dias PIFG. Detalhe da figura anterior, com biomaterial (**BM**) bastante fragmentado, circundado na periferia por tecido conjuntivo fibroso (**TCF**)

GRUPO III - 45 dias

O biomaterial apresenta-se fragmentado, circundado por fibrose, sem que fibras colágenas fossem vistas de permeio no biomaterial. A espessura e a extensão do biomaterial aparecem com dimensões reduzidas (Figura 58, 59, 60).

As bordas ósseas apresentavam-se com neoformação óssea estabilizadas, com conformação arredondada. Notou-se a presença de tecido conjuntivo fibroso e espessado entre as bordas do defeito ósseo e o biomaterial (Figura 61,62).

Observou-se ausência de áreas de mineralização.

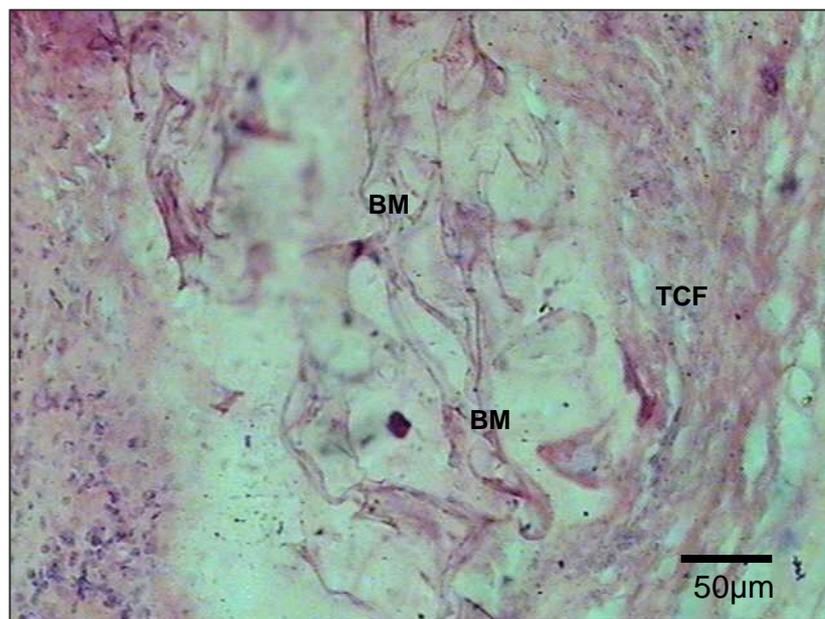


Figura 58. GIII 45dias HE. Grande fragmentação do biomaterial (BM), circundado por tecido conjuntivo fibroso (TCF)

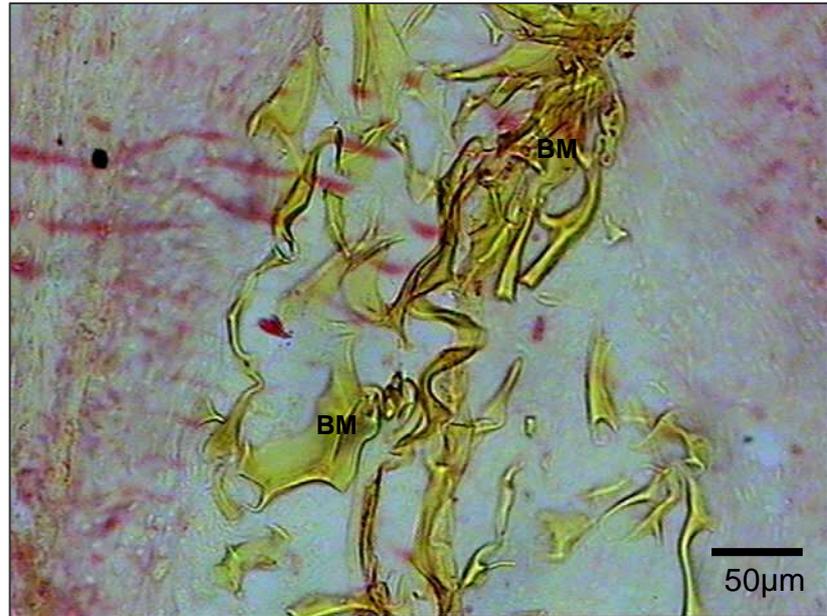


Figura 59. GIII 45dias PIFG. Detalhe da fragmentação do biomaterial (**BM**)

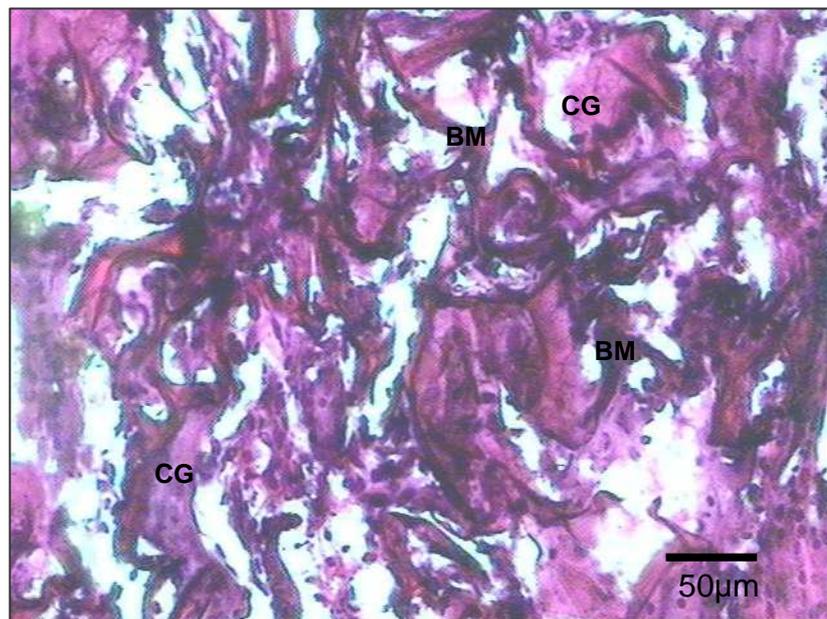


Figura 60. GIII 45dias GOLD. Biomaterial (**BM**) em grande fragmentação, com células inflamatórias associadas aos fragmentos. Células gigantes(**CG**)

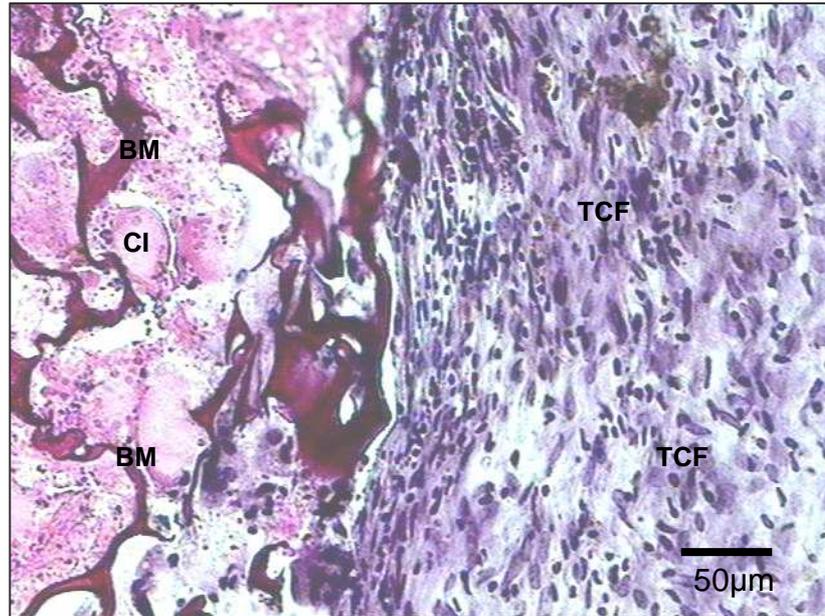


Figura 61. GIII 45dias GOLD. Restos de fragmentos do biomaterial(BM) com células inflamatórias(CI) sobre estes, circundados, na sua periferia, por tecido conjuntivo fibroso(TCF)

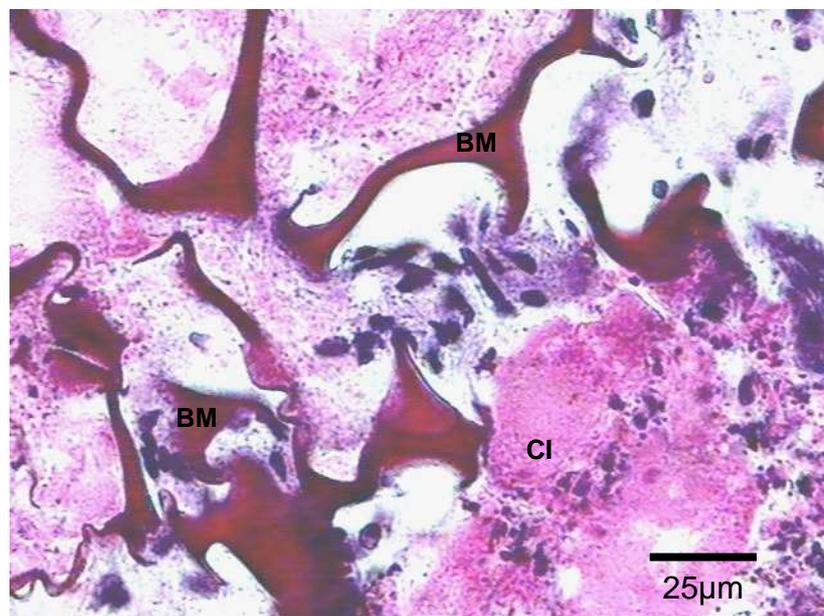


Figura 62. GIII 45dias GOLD. Detalhe da figura anterior, presença de biomaterial (BM), bastante fragmentado permeado por células inflamatórias (CI)

GRUPO III- 120 DIAS

As bordas ósseas apresentaram-se sem proliferação óssea, com aspecto similar visto aos 45 dias.

Foi observada a presença de tecido conjuntivo formado entre o biomaterial e as bordas do defeito, com discreto infiltrado mononuclear, sem proliferação de capilares (Figuras 63, 64, 65).

Restos de biomaterial são vistos esparsamente em meio ao tecido fibroso espesso que os circunscreve. Foi observada, ainda, uma reação granulomatosa moderada, com acúmulos focais de mononucleares (Figuras 66,67,68).

Não foram observadas áreas de mineralização.

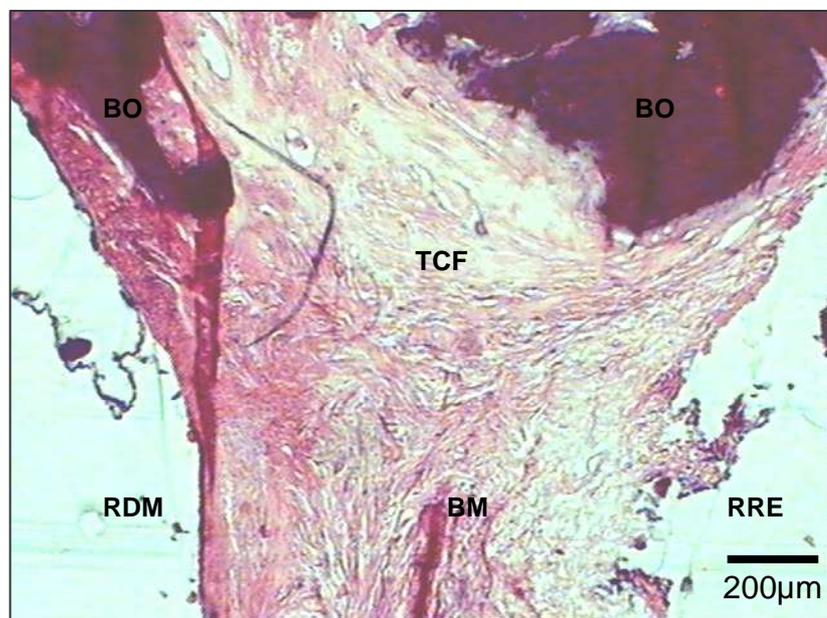


Figura 63. GIII 120dias HE. Borda óssea (BO) sem proliferação reparativa, com interposição de tecido conjuntivo fibroso (TCF) na interface biomaterial (BM) e poucos fragmentos do biomaterial

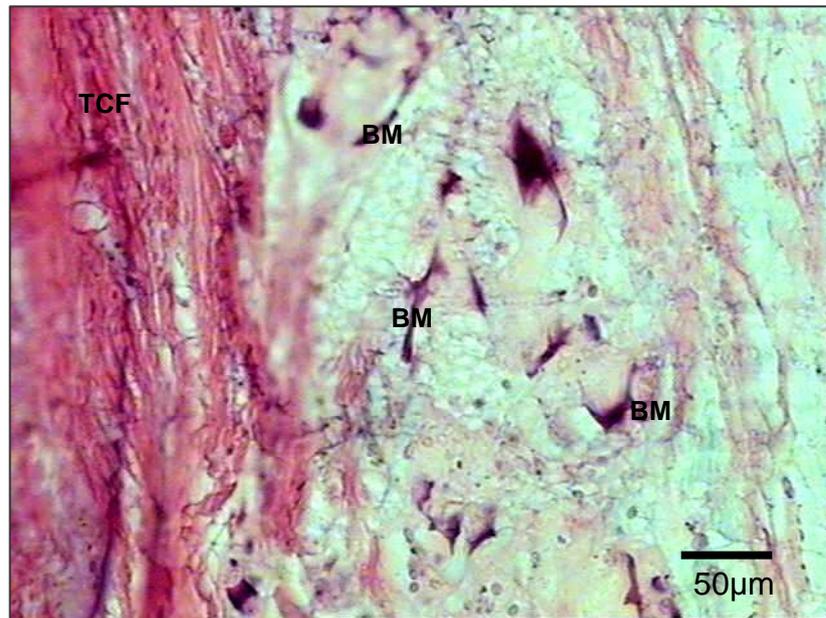


Figura 64. GIII 120dias HE. Restos de fragmentos do biomaterial (BM) circundados por tecido conjuntivo fibroso (TCF)

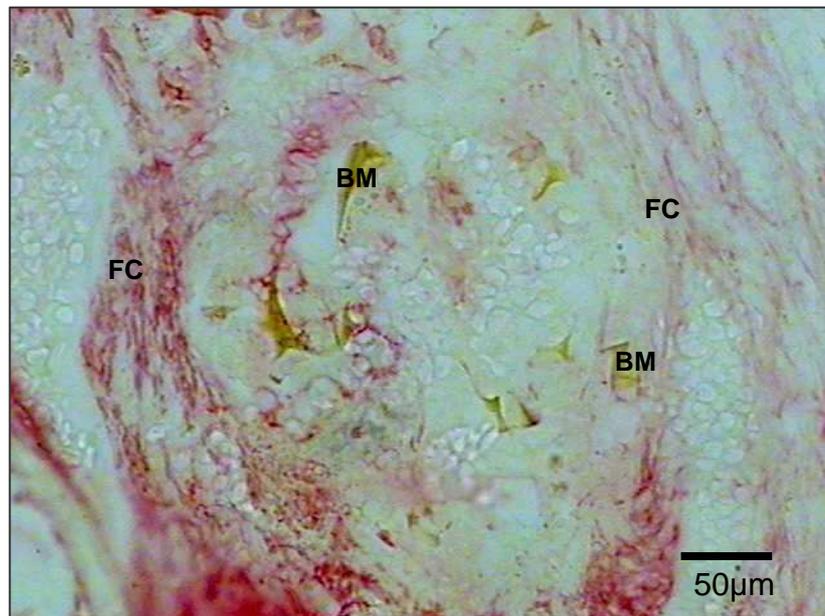


Figura 65. GIII 120dias PIFG. Poucos fragmentos do biomaterial (BM), com raras fibras colágenas (FC) de permeio

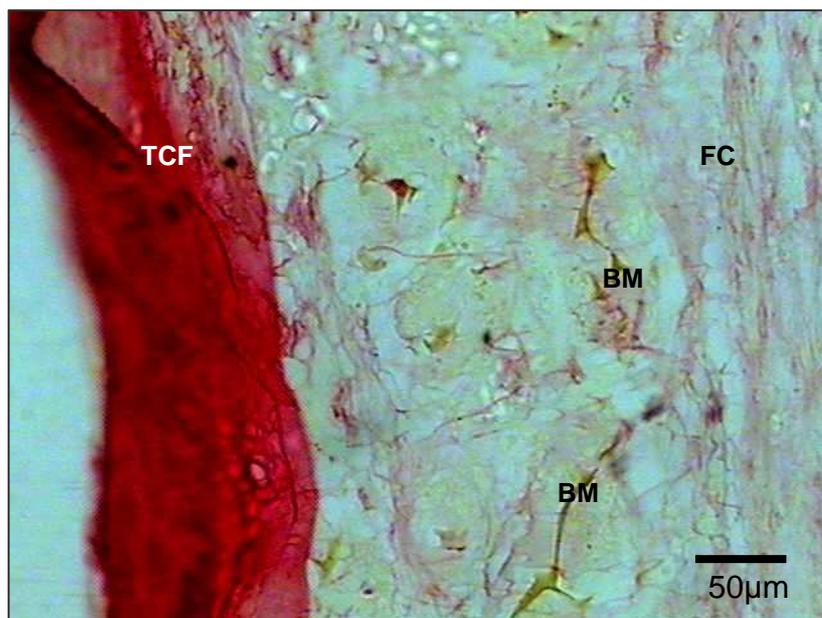


Figura 66. GIII 120dias PIFG. Tecido conjuntivo fibroso (TCF) mais adensado referente à porção do retalho forma uma delimitação para os poucos fragmentos do biomaterial (BM); raras fibras colágenas (FC) de permeio a estes fragmentos

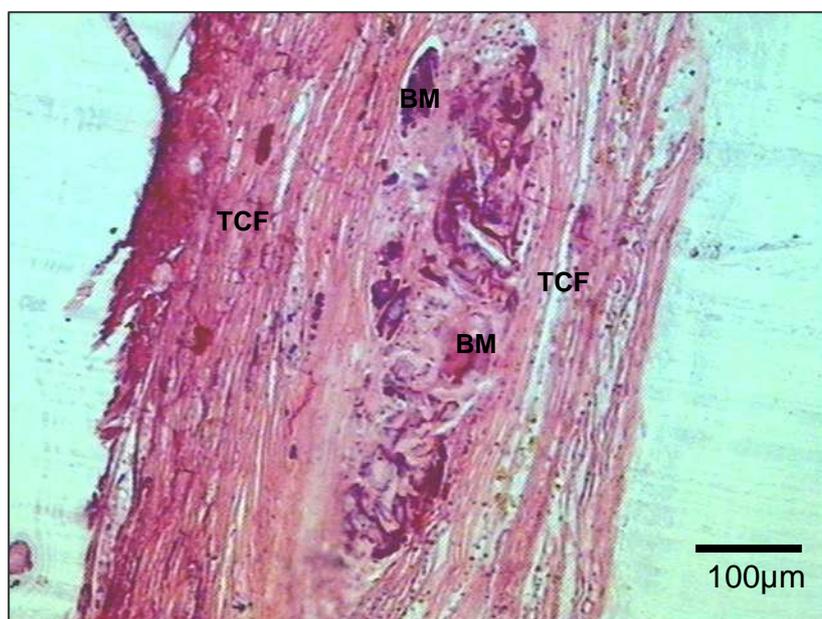


Figura 67. GIII 120dias HE. Poucos fragmentos do biomaterial (BM) na região central do defeito, circundados por tecido conjuntivo fibroso (TCF)

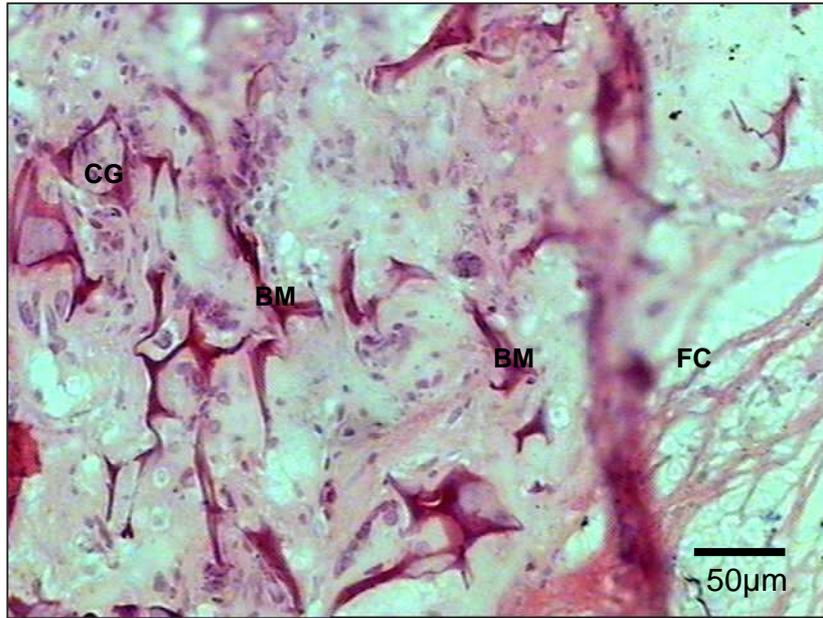


Figura 68. GIII 120dias HE. Reação inflamatória gigante-celular sobre os poucos fragmentos restantes do biomaterial (BM). Fibras colágenas (FC)

6. DISCUSSÃO

O principal papel da bioengenharia tecidual é a pesquisa e o desenvolvimento de substitutos teciduais que, ao serem implantados no organismo, devam apresentar um comportamento que favoreça a completa reabilitação funcional e estética da área lesionada. Para este fim, essa área das ciências biomédicas faz uso de princípios utilizados em Engenharia e Biologia (JIANG et al, 2006).

Essa complexa integração entre duas áreas tão distintas, mas ao mesmo tempo tão intrinsecamente interligadas, proporciona um verdadeiro jogo de interferências mútuas entre propriedades físicas tais como: a resistência, a rugosidade, a elasticidade, a porosidade; e propriedades químicas como: o peso molecular, o pH, a capacidade de hidratação, a degradação, e as propriedades biológicas entre elas a biocompatibilidade, a ação antifúngica, a ação antibacteriana, a ação antitrobogênica, a adesão, a proliferação e o crescimento celular, que precisam estar em equilíbrio para que ocorra o pleno funcionamento da estratégia utilizada pela Bioengenharia.

Em Bioengenharia Tecidual Óssea, o tecido ósseo e seus possíveis substitutos são o foco da atenção. O osso caracteriza-se por possuir uma multiplicidade funcional ímpar e por ter uma complexa estrutura organizacional. Na arquitetura óssea quatro tipos celulares destacam-se; os osteoblastos, os

osteoclastos, os osteócitos e as células osteoprogenitoras (SMIT; HUYGHE; COWIN, 2002; JIANG et al., 2006; KONG et al., 2007; TUZLAKOKOGLU e REIS, 2007; ROSCHGER et al., 2008).

Os osteócitos são derivados de osteoblastos e percentualmente representam maioria entre todas as células ósseas do esqueleto adulto (90 a 95%); os osteoblastos compõem aproximadamente 5% e os osteoclastos, menos de 1% (BONEWALD, 2007). Embora osteoblastos e osteoclastos sejam minoria, existe unanimidade entre os autores pesquisados, ao afirmarem o papel estratégico que esses dois tipos celulares desempenham na dinâmica da estrutura tecidual óssea (ANSELME, 2000; YOUNG e HEATH, 2000; STEVENS e LOWE, 2001; COMARK, 2003; AMARAL, 2005; BLAIR; SUN, KOHANSKI, 2007).

Os osteoblastos são responsáveis pela síntese da matriz osteóide, e de sua mineralização. Já o papel dos osteoclastos é mais controverso, além do seu importante papel remodelador expressado durante os processos de crescimento e reparos ósseos (BLAIR; SUN, KOHANSKI, 2007, WANG et al, 2007), há autores que sugerem também sua participação na angiogênese (CACKOWSKI e ROODMAN, 2007).

Sabe-se que o tecido ósseo é continuamente remodelado; essa contínua seqüência de formação e destruição é controlada por diversos fatores de crescimento pró-angiogênico liberados pelos osteoclastos, osteoblastos e células estromais da medula, e físicos (a incidência de forças mecânicas). Nos bebês, crianças e adultos jovens essa renovação é alta para atender às demandas naturais do processo de crescimento e desenvolvimento esquelético do indivíduo, entretanto, no adulto ela acontece normalmente de forma branda, mas pode aumentar para

suprir qualquer necessidade de reparo provocada por fatores externos ou sistêmicos (GONÇALVES; GUIMARÃES; GARCIA, 1998; WANG et al, 2007).

Contudo, nem sempre essa capacidade de regeneração óssea é possível; isso pode ocorrer quando o tecido ósseo é afetado por lesões, infecções, anomalias de desenvolvimento, traumas e seqüelas resultantes de neoplasias ou desordens, o que resulta, como seqüela, na destruição de extensas áreas ósseas. Os resultados de Cardoso (2003), Miguel (2003) e Barreto (2006) confirmam as afirmações de Schimitz e Hollinger (1998) sobre defeito ósseo crítico, segundo os quais é inviável a regeneração espontânea do tecido ósseo em áreas com dimensões largas e extensas. Nestes casos o reparo pode resultar apenas na formação de um tecido conjuntivo fibroso cicatricial (SAADEH et al, 2001).

Para a calvária de rato o defeito de 8mm é considerado crítico, ou seja, não ocorre reparo por neofomação óssea, conforme os conceitos estabelecidos por Schimitz e Hollinger (1998), fato este comprovado, neste estudo, em que os resultados do Grupo I (controle), referentes aos tempos biológicos de 45 e 120 dias, demonstraram a presença de uma discreta ossificação reparativa, restrita à região das bordas do reparo, enquanto a área central do defeito foi caracterizada pela ausência de núcleos de mineralização, com deposição apenas de um tecido conjuntivo fibroso, em toda a extensão do defeito, sem área de neofomação óssea, embora mais próximo a bordas ósseas tenha ocorrido a presença de proliferação vascular, caracterizando um discreto processo de angiogênese, que se apresentava tênue à proporção que se distanciava das bordas em direção ao centro do defeito.

É nessa perspectiva que a Engenharia Tecidual Óssea encontra justificativa: buscar através da implantação de biomateriais, em formato de biomatrizes, a integração com o tecido ósseo, com o objetivo de facilitar a sua reorganização

estrutural. Essas biomatrizes atuam como um arcabouço, cujo objetivo é possibilitar a diferenciação, a proliferação e o crescimento de células de linhagem óssea na área afetada (BURG; PORTER; KELLAM, 2000; DI MARTINO; SITTINGER; RISBUD, 2005; SHI et al., 2005; WAN et al., 2005; WU et al., 2006, ZHANG et al.; POUND et al., 2007).

Entretanto, para que este processo ocorra naturalmente, segundo a literatura pesquisada, faz-se necessário que essa biomatriz apresente uma série de pré-requisitos. Entre eles destacam-se: resistência mecânica favorável, condições de superfície que facilitem a adesão e a proliferação celular, hidrofília, elasticidade suficiente para suportar o crescimento celular sem deformar-se, porosidade, interconectividade e diâmetro dos poros favoráveis para permitirem o crescimento celular e a formação de vasos no seu interior, biodegradação, peso molecular e pH adequados (BURGUER; PORTER; KELLAM, 2000; HUTMACHER, 2000; CHARULATHA e RAJARAM, 2003; CARVALHO; BASSI; VIOLIN, 2004; MAUNEY et al., 2005; LIU et al., 2007; REIS et al., 2007; TIGH; KARAKEÇILI, GUMUSDERELIOGLU, 2007).

As biomatrizes testadas neste estudo apresentam um desenho tridimensional, derivam da quitosana extraída da pena de lula (France – Chitine), e foram preparadas e caracterizadas na divisão de biomateriais do INEB, Porto – Portugal. Suas características e propriedades obedeceram ao protocolo experimental de Amaral, Sampaio e Barbosa (2006), onde ficam claras a influência e a inter-relação existente entre diversas propriedades, como peso molecular, acetilação, porosidade, e características de superfície sobre o desempenho biológico da biomatriz.

Um outro aspecto recentemente bastante avaliado em Bioengenharia Tecidual Óssea é o desenho estrutural dos arcabouços. A tendência atual converge

para a utilização do modelo 3D de biomatriz (HUTMACHER, 2000; CHATELET; DAMOUR; DOMARD, 2001). Neste formato, o processo de crescimento tecidual é facilitado pelo crescimento tecidual no interior da estrutura, o que proporciona também a formação de vasos e o conseqüente suprimento de oxigênio para área enxertada (BURG; PORTER; KELLAM, 2000; HU et al., 2004; HO et al., 2005; LI et al., 2005; MAUNEY et al., 2005, ZHANG et al, 2007a; ZHANG et al, 2007b; REIS et al., 2007; TIGH; KARAKEÇILI, GUMUSDERELIOGLU, 2007).

Há uma preocupação veemente entre os autores, no que se refere à escolha do biomaterial adequado para implantação no sítio ósseo. Atualmente, no mercado, encontra-se uma pluralidade quanto a sua composição e formas de apresentação (BURGUER; PORTER; KELLAM, 2000; JIANG et al., 2006; RICHARDSON et al., 2008).

Neste trabalho, a escolha da quitosana, encontra justificativa em vários fatores aqui relacionados. Primeiro, na evidência atual que este biopolímero ocupa no cenário científico; por ser ele um biomaterial que apresenta um número bastante heterogêneo de aplicações (KIMURA et al., 1999; SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006; CHEN et al., 2006). Mais recentemente, na área da saúde, esse biomaterial aparece como uma alternativa para a reconstrução de estruturas orgânicas danificadas por doenças ou lesões (CHUPA et al., 2000; KHOR; LIM, 2003; MA et al., 2003; GREHA et al., 2007; TAN et al., 2007; XU et al., 2007; RICHARDSON et al., 2008); e finalmente justificamos sua escolha, pelo favorável conjunto de propriedades físico-químicas e biológicas que esse material apresenta.

O estudo dessas propriedades revelou ser a quitosana um polímero reativo não digerível (NELSON e COX, 2002) de alta biocompatibilidade, que apresenta também propriedades antitumorogênicas, antifúngicas e antibacterianas. (SUH e

MATTHEW, 2000; CHARTELET; DAMOUR; DOMARD, 2001; PRASHANT; KITTUR; THARANATHAN, 2002; KHOR; LIN, 2003; ASSIS e SILVA, 2003; MA et al., 2004; HU et al., 2004; SHI et al., 2006; HSIEH; CHANG; LIN, 2007).

Além desses aspectos favoráveis citados anteriormente, soma-se também a capacidade de degradação da biomatriz de quitosana, pois é necessário que, à proporção que o crescimento celular aconteça, a matriz sofra degradação, para que o tecido ósseo neoformado ocupe o espaço delimitado por ela (LI et al., 2005; HUANG et al., 2005). A degradação da biomatriz tem relação direta com o grau de desacetilação da quitosana. Estudos mostram que quanto mais altos são esses graus, mais facilmente e rapidamente a matriz é degradada pelo organismo (THIGI; KARAKEÇELLI; GUMUSDERELELIOGLU, 2007). Tal fundamento encontra assim base para nortear a escolha de biomatrizes tridimensionais de quitosana com 4 e 15% de graus de acetilação, empregadas neste estudo.

Biomatrizes de quitosanas com altos graus de desacetilação são mais hidrofílicas e mais solúveis, em consequência da alta afinidade por ácidos orgânicos, que o biomaterial apresenta, resultantes da característica de protonação atribuída aos grupos aminos resultantes de tal processo (VANDE VORD et al., 2002). Os resultados encontrados neste estudo ratificam essas afirmações citadas pelos autores anteriormente, baseados nas características apresentadas pela biomatriz aqui avaliada no grupo GIII, que para o tempo biológico de 45 dias, a espessura e a extensão do biomaterial aparecem reduzidas. Esses achados podem ser comprovados mais especificamente no tempo de 120 dias do mesmo grupo (GIII), em que restos de biomaterial são vistos esparsamente, supondo-se assim que ocorreu a degradação da biomatriz avaliada. Embora no GII tenha havido também uma fragmentação da biomatriz, esta foi sensivelmente menor, quando comparada

ao GIII, nos mesmos pontos biológicos de observação. Portanto, pudemos observar, quanto maior o seu grau de acetilação, uma degradação da matriz em maior proporção.

A biomatriz de quitosana aqui utilizada reuniu características de porosidade, densidade e diâmetro de poros com aproximadamente 96,16µm para a biomatriz de quitosana de 4% de grau de acetilação, e 114,08 µm para a biomatriz de 15% de grau de acetilação. Segundo Kong et al. (2007), são propriedades que caracterizam uma matriz altamente porosa.

O equilíbrio entre porosidade e propriedades mecânicas é uma preocupação veementemente relatada na literatura (REIS et al., 2007). Embora a porosidade e a interconectividade dos poros no interior da biomatriz sejam propriedades adequadas em virtude do favorecimento à proliferação e ao crescimento celular, bem como a angiogênese no interior do arcabouço matricial, quando em excesso essas condições comprometem o desempenho da biomatriz no sítio do enxerto, pois degradam-se com muita facilidade (DI MARTINO; SITTINGER; RISBUD, 2005).

Há de se constatar também, durante a análise da literatura, que quanto menor o grau de acetilação maior é a adesão, a proliferação e o crescimento de células de linhagem ósseas, principalmente osteoblastos na superfície da biomatriz (PRASITSILP et al., 2000; JIANG et al., 2006; TUZLAKOGLU e REIS, 2007; KONG et al., 2007). Essa adesividade explica-se pela facilidade química com que o biopolímero apresenta em relação a proteínas relacionadas com a adesão celular, como a fibronectina (AMARAL et al., 2005; COUTINHO et al., 2008). Entretanto, neste nosso estudo não foi observada a migração de células da linhagem osteogênica de permeio às biomatrizes. Foram vistas apenas células inflamatórias e fibroblastóides.

O relato de trabalhos que demonstram o desempenho histomorfológico deste biomaterial *in vivo* é escasso, quando comparado com a grande predominância de estudos *in vitro*. Fato este que dificulta sobremaneira a comparação dos resultados discutidos aqui neste trabalho. A biocompatibilidade de um material é avaliada pela resposta tecidual do hospedeiro, no momento em que este entra em contato com os fluídos tissulares, de forma a desencadear uma mínima resposta inflamatória ou imunitária (Wataha, 2002). Os resultados por nós obtidos, com as duas configurações de biomatrizes de quitosana (4% e 15% de graus de acetilação) avaliadas apresentaram um relativo grau de irritabilidade, demonstrado pela presença de células inflamatórias, predominantemente do tipo granulomatosas, tanto para o GII quanto para o GIII, em todos os pontos biológicos de observação. Ressalta-se ainda que, para o GII, este infiltrado gigante-celular foi muitas vezes observado em toda extensão do biomaterial, diferentemente do GIII, no qual estas células concentravam mais na periferia do biomaterial.

Estes resultados realçam a presença de uma reação inflamatória acentuada até os primeiros quinze dias do experimento, caracterizada pela formação de um tecido de granulação, com proliferação vascular e denso infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear, tanto no grupo GII (sete e quinze dias), como no grupo GIII (sete e quinze dias), conclusão também encontrada por Vand Vord (2002). Segundo este pesquisador, a migração neutrofílica parece ser uma propriedade inerente à quitosana, que pode ser motivada pelas específicas interações existentes entre os oligossacarídeos da composição da molécula de quitosana com receptores neutrofílicos entre os quais a selectina. Entretanto, em nosso estudo, para ambos os grupos não houve expulsão do biomaterial, o que pode caracterizar a biocompatibilidade das biomatrizes.

A análise pertinente ao grupo GII no tempo de 120 dias desse estudo, para a quitosana de 4% de acetilação, mostrou uma maior migração de fibroblastos associados à presença de um tecido fibroso de maior densidade, o que ratifica os resultados de Tighi; Karakeçelli; e Gumusderelelioglu (2007), quando avaliaram *in vitro* a influência da composição e do grau de desacetilação de matrizes tridimensionais de quitosana. Seus resultados evidenciaram que na cultura de células estudadas a adesão e a proliferação de fibroblastos foram afetadas pelo grau de desacetilação da biomatriz. Para esses autores biomatrizes com alto grau de desacetilação mostraram-se mais favoráveis à adesão e à proliferação celular do que as biomatrizes com baixo grau de desacetilação.

Resultado também ratificado por Amaral Sampaio e Barbosa (2006), em estudo *in vitro*, baseados na perspectiva de avaliar a interferência de diferentes graus de acetilação de filmes de quitosana frente à adesão e proliferação celular. Os resultados demonstraram que menores graus de acetilação promoveram uma maior intensidade de adesão celular. Ao longo do tempo, o arranjo celular, assim como a organização do citoesqueleto, estavam, ambos, unicamente presentes no grau de acetilação de 13%. As biomatrizes por nós testadas, em função de suas características tridimensionais, de porosidade interconectantes, e de graus de acetilação, possibilitaram a migração vascular e de células fibroblastóides. Entretanto, esta migração vascular e de fibroblastos, com conseqüente deposição de fibras colágenas de permeio ao biomaterial, foi uma característica evidente para o GII, com grau de acetilação de 4%. Para o GIII, que por sua vez apresentava um grau de acetilação maior, de 15%, a vascularização estava reduzida, e não havia deposição de fibras colágenas de permeio ao biomaterial, somente formação de um tecido conjuntivo fibroso em torno da biomatriz.

No que tange ao processo de neoformação óssea associada à implantação das biomatrizes, esta não ocorreu em nenhum ponto biológico dos grupos analisados neste estudo. Houve apenas neoformação óssea reparativa, associadas às bordas ósseas, que se apresentaram estabilizadas, caracterizadas pela presença de um tecido conjuntivo na interface tecido ósseo – biomaterial. Esta mesma neoformação óssea reparativa foi vista para o grupo controle, no qual não foi implantado nenhum biomaterial, e mantido apenas preenchido pelo coágulo sanguíneo e fluídos tissulares.

Pode-se perceber, portanto, que defeitos ósseos de dimensões e morfologia consideráveis consistem em um problema de complexa resolução. Tal afirmativa expressa-se na dificuldade dos seus processos de reparo ósseo, que compreendem necessariamente uma resposta celular estimulada por fatores locais, bem como o restabelecimento de um suporte vascular que possibilite a afluência de metabólitos e oxigênio para a área lesionada. As biomatrizes avaliadas neste estudo, com suas características físico-químicas distintas, mostraram ser incapazes de promover essa neoformação óssea reparativa, e fatores como a acetilação, a biodegradação e a resposta biológica precisam ser melhores aprimorados para que possibilitem um desempenho mais favorável, com um comportamento osteogênico mais promissor.

7. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nas condições experimentais deste estudo conclui-se que:

- O reparo ósseo manteve-se restrito às bordas ósseas do defeito, de forma reacional, para todos os grupos GI, GII e GIII;
- Não houve neoformação óssea associada à implantação das biomatrizes;
- As biomatrizes com 4 e 15% de acetilação foram biocompatíveis. A biomatriz de 4% de acetilação apresentou uma reação inflamatória mais acentuada do que a biomatriz com 15% de acetilação;
- Houve uma menor degradação das biomatrizes com grau de acetilação menor (4%), quando comparadas com a biomatrizes de 15% de grau de acetilação;
- Estudos complementares precisam ser realizados em Bioengenharia Tecidual Óssea com objetivo de possibilitar um melhor comportamento osteogênico para o biomaterial avaliado.

REFERÊNCIAS

AMARAL, I.M.S.R.F. **Chitosan matrices for cell-based bone regenerative therapies**. 2005. 118f. Dissertação (Doutorado em Ciências da Engenharia), Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto. Porto, Portugal.

AMARAL, I.F.; SAMPAIO, P.; BARBOSA, M.A. Three-dimensional culture of human osteoblastic cells in chitosan sponges: the effect of the degree of acetylation. **Journal B Mater Res**, v. 76 A (9) p. 335-346. 2006.

AMARAL, I.F. et al. Rat bone marrow stromal cells osteogenic differentiation and fibronectin adsorption on chitosan membranes: the effect of the degree of acetylation. **Journal B Mater Res. Part A**. v. 75 A (2) p. 387-397.2005.

ANSELME ,K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**. v. 21, p. 667-681, 2000.

ASSIS, O.B.G.; SILVA, V.L. Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. v.13. n.14. p. 223-228. 2003.

BARRETO, C.B. **Avaliação *in vivo* do reparo de defeito ósseo com biomaterial do tipo microesferas cerâmicas**. 2006. 100f. Dissertação (Mestrado em Odontologia), Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

BLAIR, H.C.; SUN, L.; KOHANSKI, R.A. Balanced regulation of proliferation, growth, differentiation, and degradation in skeletal cells. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** v. 1116. p. 165-173. 2007.

BONEWALD, L.F. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** v. 1116. p. 281-290. 2007.

BURG. J.J.K.; PORTER, S.; KELLAM. J.F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v.21. p. 2347-2359. 2000.

CAKOWKI, F.C.; ROODMAN, G.D. Perspective on the osteoclast an angiogenic cell? **Ann. N.Y. Acad. Sci.** v. 1117. p.12-25. 2007.

- CARDOSO, A.K. M.V. Análise histomorfológica da implantação de biovidros em defeito crítico criado em calvária de rato. 2003. 130 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia), Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- CARVALHO, P.S.P.; BASSI, A.P.F; PEREIRA, L.A.V.D. Revisão e proposta de nomenclatura para os biomateriais. **Implant News**. v.1, p. 255-259. 2004.
- CHARULATHA, V.; RAJARAM A. Influence of different crosslink treatment on the physical. **Biomaterials**. v. 24. p. 759-767. 2003.
- CHATELET, C.; DAMOUR, O.; DOMARD, A. Influence of degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. **Biomaterials**. v. 22. p. 261 – 268. 2001.
- CHEN, Y.L. et al. Rational development of GAG - argumented chitosan membranes by fractional factorial design methodology. **Biomaterials**. v.27. p. 2222-2232. 2006.
- CHUPA, JM. et al. Vascular cell responses to polysaccharide materials: *in vitro* and *in vivo* evaluations. **Biomaterials**. v. 21. p. 2315-2322. 2000.
- CORMACK, D.H. **Fundamentos de Histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
- COUTINHO, D. F. et al. The effect of chitosan on the *In vitro* Biological performance of chitosan-poly (butylenes succinate) blends. **Biomacromolecules**. p. A-G. 2008.
- DI MARTINO, A.; SITTINGER, M.; RISBUD, M.V. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. **Biomaterials**. v.26. p. 5983-5990. 2005.
- GONÇALVES, E.A.L.; GUIMARAES, S.A.C.; GARCIA, R.B. Proteínas morfogenéticas ósseas: terapêutica molecular no processo de reparo tecidual. **Rev de Odontol da Univ de São Paulo**. Vol 12. n.3. p. 1-8. 1998.
- GRENHA, A. et al. Chitosan nanoparticle-loaded mannitol microspheres: structure and surface characterization. **Biomacromolecules**. v. 8. p. 2072-2079. 2007.
- HARRY, C.B.; SUN, L.; KOHANSKI, R.A. Balanced regulation of proliferation, growth, differentiation, and degradation in skeletal cells. **Ann. N.Y. Acad.Sci**. 1116 p. 165-173. 2007.
- HSIEH, W.C.; CHANG, C.P.; LIN, S.M. Morphology and characterization of 3D micro-porous structured chitosan scaffolds for tissue engineering. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 57. p. 250-255. 2007.
- HO, M. H. et al. Preparation and characterization of RGD-immobilized chitosan scaffolds. **Biomaterials**. v. 26. p. 3179 – 3206. 2005.
- HU, Q. et al. Preparation and characterization of biodegradable chitosan hydroxyapatite nanocomposite rods via in situ hybridization: a potential material as internal fixation of bone fracture. **Biomaterials**. v. 25. p. 779–785. 2004.

HUANG, Y. et al. In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. **Biomaterials**. v. 26. p. 7616-7627. 2005.

HUANG, Y.; SIEWE M.; MADHALLY S. V. Effect of spatial architecture on cellular colonization. **Biotechnol Bioeng**. 93(1): 64-75, 2006.

HUTMACHER, D.W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. **Biomaterials**. v.21. p.2529-2543. 2000.

JIANG, T. et al. In vitro evaluation of chitosan/poly (lactic acid-glycolic acid) sintered microsphere scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**. v.27, p. 4894-4903, 2006.

JIAO Y; LIU, Z; ZHOU, C. Fabrication and characterization of PLLA-chitosan hybrid scaffolds with improved cell compatibility. **J Biomed Mater Res. A**;80(4): 820-5, 2007. Mar 15.

JUNG, U.W. et al. Effects of chitosan membrane coated with polylactic and polyglycolic acid on bone regeneration in rat calvarial defect. **Biomed. Mater**. v.2. p. S101-S105. 2007.

KHOR, E.; LIM, L.Y. Implantable applications of chitin and chitosan. **Biomaterials**, v.24, p.2339-2349. 2003.

KIMURA, I.Y. et al. Efeito do pH e do tempo de contato na adsorção de corantes reativos por microesferas de quitosana. **Polímeros. Ciência e Tecnologia**. p. 51-57. jul/set 1999.

KONG, L. et al. Preparation and characterization of a multilayer biomimetic scaffold for bone tissue engineering. **J Biomaterials Applications**. v.22, p. 223-239, 2007.

LEE, C.H.; SINGLU, A.; LEE Y. Biomedical applications of collagen. **Inter J. Pharmaceutics**. v. 221. p. 1-22. 2001.

LI, Z. et al. Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**. v.26, p. 3919 – 3928. 2005.

LIU, H. et al. Effects of the controlled-released basic fibroblast growth factor from chitosan-gelatin microspheres on human fibroblast cultured on a chitosan-gelatin scaffolds. **Biomacromolecules**. v.8. p. 1446-1455. 2007.

MA, L. et al. Collagen/ chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. **Biomaterials**. v. 24. p. 4833-4841. 2003.

MAUNEY, J.R. et al. In vitro and in vivo evaluation of differentially demineralized cancellous bone scaffolds combined with human bone marrow stromal cells for tissue engineering. **Biomaterials**. v. 26. p.3173-3185. 2005.

MELLO, K.G.P.C.M. et al. Synthesis and physiochemical characterization of chemically modified chitosan by succinic anhydride. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 49, n.4. p. 665-668. 2006.

MESSORA, M.R. et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in rat calvaria. **J Periodont Res**, v. 43. p. 217-223. 2008.

MI, F.L. et al. Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. **Biomaterials**. v.22. p.165-173. 2001.

MIGUEL, F.B. **Avaliação morfológica do comportamento de matrizes tridimensionais de colágeno aniônico na regeneração óssea em rato**. 2003 151f. Dissertação (Mestrado em Odontologia), Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia. Salvador.

MIGUEL, F.B., et al. Morphological assessment of the behavior of three-dimensional anionic collagen matrices in bone regeneration in rats. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**. Published online 7 february 2006 in interScience (www.interscience.wiley.com).

MUZZARELLI, R.A.A., et al. Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan. **Biomaterials**. v. 15. n.13. p. 1075-1081. october. 1994.

NELSON, DL.; COX, M. M. **Lehninger. Princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

POUND, J,C. et al. An *ex vivo* model for chondrogenesis and osteogenesis. **Biomaterials**. v.28. p. 2839-2849. 2007.

PRASHANTH, K. V.H.; KITTUR, F.S.; THARANATHAN, R.N. Solid state structure of chitosan prepared under different N-deacetylating conditions. **Carbohydrate Polymers**. v. 50. p. 27 – 33. 2002.

PRASITSILP, M. et al. Cellular responses to chitosan in vitro: the importance of deacetylation. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. V. 11, p. 773-778. 2000.

REIS, C.C.R. et al. Influence of porosity and fibre diameter on the degradation of chitosan fibre-mesh scaffolds and cell adhesion. **J. Mater Sci: Mater Med**. v.18. p. 195-200. 2007.

REN, D. et al. The enzymatic degradation and swelling properties of chitosan matrices with different degrees of N-acetylation. **Carbohydrate Research**. v.340. p. 2403-2410. 2005.

RICHARDSON, S. M et al. Human mesenchymal stem cell differentiation to NP-like cells in chitosan-glycerophosphate hydrogels. **Biomaterials**. v. 29. p. 85-93. 2008.

ROSCHGER, P. et al. Bone mineralization density distribution in health and disease. **Bone**. v.42. p.456-466. 2008.

SAADEH, P.B. et al. Repair of critical size defect in the rat mandible using allogenic type I collagen. **Journal of Craniofacial Surgery** v. 12(6). p. 573-579. 2001.

SCHMITZ, J.P.; HOLLINGER, J.O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulobacial nonunions. **Clin Orthop**. v. 225, p. 299-308, 1986.

SEOL, Y. J. et al. Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation. **Biotechnology Letters**. v. 26. p. 1037-1041. 2004.

SHI, C. et al. Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine. **J. Surg Res**. v.133. p.185-192. 2006.

SILVA, H.S.R.C.; SANTOS, K.S.C.R.; FERREIRA, E.I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Quim Nova**. v. 29. n. 4. p. 776-785. 2006.

SMIT, T.H.; HUYGHE, J.M.; COWIN, S.C. Estimation of the poroelastic parameters of cortical bone. **Journal of Biomechanics**. v. 35. p. 829-835. 2002.

STEVENS, A.; LOWE J. **Histologia Humana**. São Paulo: Manole., 2001.

SUH, J.K.F.; MATTHEW, H.W.T. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. **Biomaterials**. v. 21. p. 2589-2598. 2000

TAN, H. et al. Gelatin/chitosan/hyaluronan ternary complex scaffold containing basic fibroblast grow factor for cartilage tissue engineering. **J. Mater Sci: Mater Med.** v.18. p. 1961-1968. 2007.

THULL, R. Physicochemical principles of tissue material interactions. **Biomol Engine**. v.19. n. 2-6. p. 43-50. 2002.

TIGH, R.S.; KARAKEÇILI, A.; GUMUSDERELIOGLU, M. In vitro characterization of chitosan scaffolds: influence of composition and deacetylation degree. **J Mater Sci: Mater Med**. v.18. p.1665-1674. 2007.

TORRES, M.A. et al. Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. Cidade. vol.15 n. 4. p.306-312. mês abrev . 2005.

TUZLAKOGLU T.; REIS R. L. Formation of bone-like apatite layer on chitosan fiber mesh scaffolds by biomimetic spraying process. **J Mater Sci: Mater Med**. v.18, p. 1279-1286, 2007.

VANDE VORD, P.J. et al. Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. **Journal of Biomedical Material Research**. v. 59. n.3. p. 585- 590. 2002.

WAN, Y. et al. Porous-conductive chitosan scaffolds for tissue engineering II. *In vitro* and *in vivo* degradation. **J Mater Sci: Mater Med.** v.16. p.1017-1028. 2005.

WAN Y, et al. Porous polylactide/chitosan scaffolds for tissue engineering. **J Biomed Mater Res A.** 80(4):776-89, 2007. Mar 15.

WANG, Y. et al. Oxygen sensing and osteogenesis. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 1117. p.1-11. 2007.

WATAHA J.C. Principles of biocompatibility for dental practitioners. **J. Prosthetic Dent,** v. 86. n.2.p. 203-209. 2001.

WU, Y.C. et al. Bone tissue engineering evaluation based on rat calvaria stromal cell cultured on modified PLGA scaffolds. **Biomaterials.** v. 27. p. 896-904. 2006.

XU,S. et al. Direct force measurements between siRNA and chitosan molecules using force spectroscopy. **Biophysical J.** v. 93 August. p. 952-959. 2007.

YOUNG B.; HEATH J.W. **Histologia Funcional.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

ZHANG, Y.F. et al. Three-dimensional nanohydroxyapatite/ chitosan scaffolds as potential tissue-engineered periodontal tissue. **J Biomaterials Applications.** v. 21. p. 333-349. 2007a.

ZHANG, Y. F. et al. Combination of scaffold and adenovirus vectors expressing bone morphogenetic protein-7 for alveolar bone regeneration at dental implants defects. **Biomaterials.** v. 28. p.4635-4642. 2007b.

ZHANG Y.; ZHANG M. Cell growth and function on calcium phosphate reinforced chitosan scaffolds. **J Mater Sci Mater Med.** 15(3): 255-60, 2004 Mar.

ZHAO, L.; CHANG, J. Preparation and characterization of macroporous chitosan/wollastonite composite scaffolds for tissue engineering. **J Mater Sci Mater Med.** 15(5): 625-629, 2004. May.

ANEXOS