



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



RUBENS SPIN NETO

***DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE
BIOMATERIAIS À BASE DE QUITOSANA PARA
RECONSTRUÇÃO ÓSSEA: AVALIAÇÃO
RADIOGRÁFICA E HISTOLÓGICA***

ARARAQUARA
2008



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



RUBENS SPIN NETO

*DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE
BIOMATERIAIS À BASE DE QUITOSANA PARA
RECONSTRUÇÃO ÓSSEA: AVALIAÇÃO
RADIOGRÁFICA E HISTOLÓGICA*

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM PERIODONTIA DA FACULDADE
DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA, DA
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO” PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRE EM PERIODONTIA.

Orientador: *Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior*

ARARAQUARA
2008

Spin Neto, Rubens

Desenvolvimento e aplicação de biomateriais à base de quitosana para reconstrução óssea: avaliação radiográfica e histológica / Rubens Spin Neto. – Araraquara : [s.n.], 2008.
130 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior

1. Materiais biocompatíveis 2. Regeneração óssea
3. Quitosana I. Título.

RUBENS SPIN NETO

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE BIOMATERIAIS À BASE DE
QUITOSANA PARA RECONSTRUÇÃO ÓSSEA: AVALIAÇÃO
RADIOGRÁFICA E HISTOLÓGICA**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior

2º Examinador: Profª Drª Lizeti Toledo de Oliveira Ramalho

3º Examinador: Prof. Dr. Luís Antônio Violin Dias Pereira

Araraquara, 17 de março de 2008.

DADOS CURRICULARES

Rubens Spin Neto

NASCIMENTO 16 de Junho de 1981 – Bauru / SP

FILIAÇÃO Rubens Spin Filho
Sueli Francisca de Castro Spin

Curso técnico em Processamento de Dados
1996-1998 Colégio Técnico Industrial “Isaac Portal Roldán” - Bauru
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Graduação em Odontologia
2001-2004 Faculdade de Odontologia de Araraquara
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Pós-graduação em Periodontia – Nível de Mestrado
2006-2008 Faculdade de Odontologia de Araraquara
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Dedicatória

À **Deus**, por ter me garantido serenidade, paciência e perseverança, guiando-me por caminhos desafiadores, porém seguros, abrindo-me as portas em todos os momentos em que precisava de luz, e colocando ao meu lado pessoas que sempre ajudaram a me levantar nos momentos onde a queda fez parte do aprendizado em minha jornada.

Aos meus pais **Rubens e Sueli**, por terem me gerado, pela criação baseada no exemplo, pelos elogios moderados, ensinando-me a ser humilde e pelas broncas dadas na hora certa, ensinando-me a ser responsável. Pelo incentivo, pela dedicação e pelo amor com que me transformaram em uma pessoa que conhece o valor das palavras respeito e humildade. Meu amor, gratidão e admiração por vocês são inacabáveis.

Ao meu irmão **José Rodolfo**, por entender sem cobranças que a minha distância teve um motivo nobre, e por saber que nossa ligação e amizade têm laços inquebráveis.

À **Carol**, por ter desde o primeiro momento entendido e respeitado minha dedicação à profissão, me apoiando e incentivando sempre, mesmo que para isso soubesse que eu trocava sua companhia por livros e artigos por mais algumas horas. Não consigo imaginar como teriam sido esses dois anos e meio sem sua presença, nem como seria minha vida sem o seu amor, que será eternamente correspondido.

Agradecimentos Especiais

Ao **Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior**, pela confiança em mim depositada desde o primeiro momento de trabalho em conjunto, por guiar meu trabalho de maneira generosa e paciente, oferecendo-me novos desafios e ajudando-me a vencê-los. Seus conselhos, profissionais e pessoais, farão sempre parte de minha índole. Minha eterna admiração e gratidão.

À **Prof^a. Dr^a. Lizeti Toledo de Oliveira Ramalho**, por ter feito do “aluno” Rubens um apaixonado pela pesquisa, ensinando lições que não estão publicadas em páginas de livros e que fazem parte da experiência que só uma grande mestra poderia passar, e por ter tratado o “ser humano” Rubens como se fosse uma segunda mãe (ou “mãe científica”), desde o meu primeiro ano em Araraquara. A sua companhia, seja nos dias de trabalho árduo, seja nas tardes de ócio produtivo, colaborou muito em minha formação profissional e pessoal. Minha gratidão e admiração são intermináveis.

À **Prof^a. Dr^a. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio**, por ter me apresentado à Periodontia, abrindo as portas para que eu chegasse até o curso de Mestrado, pelo apoio, carinho e atenção dispensada em todos os momentos onde sua ajuda foi imprescindível.

Ao **Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana Filho** e à doutoranda **Márcia Barreto Cardoso**, do Departamento de Físico-Química Orgânica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, Campus de São Carlos, pelo apoio imensurável oferecido neste trabalho, desde o seu plano piloto. Essa dissertação só foi possível devido à confiança que vocês depositaram em mim ao permitir que freqüentasse sua Instituição para confeccionar os biomateriais. Serei eternamente grato.

À mestranda **Chaíne Pavone** e ao graduando **Rubens Moreno de Freitas**, pela amizade e colaboração em todos os momentos deste trabalho. Espero ter sido capaz de representar de maneira justa os esforços por vocês depositados na realização desta pesquisa, impossível sem a participação de vocês. Muito obrigado!

À **Regina Lúcia**, pela paciência inacabável, cooperação imensurável e carinho irrefutável, durante todos os momentos aonde sua ajuda foi essencial, desde a Graduação.

Ao **S. Sidnei**, à **D. Izilda** e à **Cássia**, pela amizade, carinho, pelos conselhos e pelo respeito. Espero ser capaz de demonstrar sempre a reciprocidade de todos esses sentimentos.

Aos amigos do famoso BV, **Frank Ykeda (Japão)**, **Juliana Rico Pires (Juju)**, **Matheus Lucas (Gordo)**, **Hermes Pretel (Tio Hércio)** e **Hewerson Tavares (Véio)**, pelo companheirismo pessoal e profissional e

pela presença agradável em todos os momentos, fossem eles de concentração ou de descontração. A amizade de vocês é imprescindível.

Ao amigo **Rafael Faeda**, pelo companheirismo e amizade sincera. Pessoas como você são raras. Obrigado pela força!

Aos **animais** utilizados nesta pesquisa. Espero que o respeito e ética por mim dispensados em cada uma das linhas aqui escritas reflitam a doação imensurável feita por vocês à Ciência.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, na pessoa de sua Diretora, Prof^a. Dr^a. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio, e Vice-Diretor, Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla.

À coordenadora do Curso de Pós-Graduação - Área de Periodontia, Prof^a. Dr^a. Silvana Regina Perez Orrico, e a todos os docentes do Curso de Pós-Graduação, pela formação e exemplo.

Aos amigos e Docentes da Disciplina de Periodontia, Prof. Dr. Benedicto Egbert Corrêa de Toledo, Prof. Dr. Ricardo Samih Georges Abi Rached, Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior, Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio, Prof^a-Dr^a Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio, Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli, Prof. Dr. Carlos Rossa Junior, Prof^a-Dr^a Silvana Regina Perez Orrico, pela formação e orientação.

Ao Pedrinho, ao Luís e à Claudinha, pela ajuda preciosa na confecção dos cortes histológicos apresentados neste trabalho. Muito obrigado pela dedicação!

À todos os funcionários da Disciplina de Periodontia, Cláudia, D. Maria do Rosário, D. Teresa, Maria José (Zezé), Regina Lúcia, Thelma, Sueli e Toninho, cujo trabalho, dedicação e compreensão possibilitou a realização desse trabalho.

Aos demais funcionários e colegas do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia.

Aos amigos do curso de Pós-graduação em Periodontia, Aline, Ana Lúcia (Naná), Andrés, Marina, Roberta, Rodrigo, Romeu, Sabrina, Wagner e Yeon, pela amizade sincera e inesquecíveis momentos de convivência.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação pela paciência e admirável interesse em nos ajudar.

Às meninas e menino da biblioteca, Maria Helena, Maria José, Vera, Cris, Cidinha, Marlei, Ceres, Eliane, Inês e Adriano, pela colaboração e amizade todos esses anos.

À CAPES, pelo apoio financeiro concedido, indispensável para a realização deste trabalho, por permitir e subsidiar minha vida em Araraquara.

À todos aqueles que de uma forma ou de outra colaboraram para a execução deste trabalho.

“A Educação é, portanto, a arte que se propõe este fim, a conversão da alma, e que procura os meios mais fáceis e mais eficazes de operá-la; ela não consiste em dar a vista ao órgão da alma, pois que este já o possui; mas como ele está mal disposto e não olha para onde deveria, a Educação se esforça para levá-lo à boa direção.”

Platão

SUMÁRIO

1 RESUMO _____	14
2 ABSTRACT _____	16
3 INTRODUÇÃO _____	18
4 REVISÃO DE LITERATURA _____	23
<i>4.1 Biologia da reparação óssea</i> _____	24
<i>4.2 Biomateriais</i> _____	31
<i>4.3 Características e utilização da quitosana</i> _____	36
5 PROPOSIÇÃO _____	49
<i>5.1 Geral</i> _____	50
<i>5.2 Específica</i> _____	50
6 MATERIAL E MÉTODO _____	51
<i>6.1 Desenvolvimento dos biomateriais</i> _____	52
<i>6.2 Aplicação dos géis</i> _____	54
6.2.1 Amostra _____	54
6.2.2 Procedimento cirúrgico _____	56
6.2.3 Implantação dos biomateriais _____	57

6.3 Avaliação radiográfica	58
6.4 Obtenção das biópsias a processamento laboratorial	59
6.5 Obtenção dos resultados e análise estatística	61
7 RESULTADO	67
7.1 Resultados radiográficos	68
7.2 Resultados histológicos	72
7.2.1 Grupo controle negativo	72
7.2.2 Grupo Quitosana de baixo peso molecular	77
7.2.3 Grupo Quitosana de alto peso molecular	82
7.2.4 Grupo Cloridrato de Quitosana de baixo peso molecular	87
7.2.5 Grupo Cloridrato de Quitosana de alto peso molecular	92
8 DISCUSSÃO	97
9 CONCLUSÃO	111
10 REFERÊNCIAS	113
ANEXOS	127

Spin Neto R. Desenvolvimento e aplicação de biomateriais à base de quitosana para reconstrução óssea: avaliação radiográfica e histológica [dissertação mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.

Resumo

O objetivo desta pesquisa foi desenvolver biomateriais à base de quitosana e de cloridrato de quitosana (géis), e avaliar radiográfica e histologicamente seu uso na correção de defeitos ósseos críticos na calvária de ratos. Para tal, defeitos de 8mm de diâmetro foram criados cirurgicamente na calvária de 50 ratos Holtzman (*Rattus norvegicus*) e preenchidos com coágulo sanguíneo (controle), quitosana com baixo peso molecular, quitosana com alto peso molecular, cloridrato de quitosana com baixo peso molecular e cloridrato de quitosana com alto peso molecular, totalizando 10 animais, divididos em dois períodos experimentais (15 e 60 dias), para cada biomaterial. Na avaliação radiográfica foram utilizadas duas radiografias digitais dos crânios dos animais, feitas logo após a criação do defeito ósseo e no momento do sacrifício, que forneceram a densidade óssea radiográfica na área do defeito. A avaliação histológica pautou-se na descrição da morfologia dos tecidos neoformados na região do defeito. Os resultados radiográficos e histológicos indicaram que, em todos os grupos, a neoformação óssea

ocorreu apenas nas bordas do defeito, e que, exceto no grupo controle, graus variados de inflamação foram observados. Conclui-se que, dentro das condições experimentais deste estudo, os biomateriais de quitosana e de cloridrato de quitosana não foram capazes de promover neoformação óssea nos defeitos ósseos críticos criados em calvária de ratos.

Palavras-chave: Materiais biocompatíveis; regeneração óssea; quitosana.

Spin Neto R. Development and application of chitosan-based biomaterials in bone reconstruction: radiographic and histological analysis [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.

Abstract

The purpose of this study was to develop chitosan and chitosan chloride biomaterials (gels), and to make a histological and radiographic evaluation of their use in the correction of critical size bone defects made in rat's calvaria. Bone defects of 8mm in diameter were surgically created in the calvaria of 50 Holtzman (*Rattus norvegicus*) rats and filled with blood clot (control), low molecular weight chitosan, high molecular weight chitosan, low molecular weight chitosan chloride and high molecular weight chitosan chloride, numbering 10 animals, divide into two experimental periods (15 and 60 days), for each biomaterial. For the radiographic evaluation, it were made two digital radiographs of animal's skulls, right after the creation of the bone defect and at the moment of the sacrifice, providing the radiographic bone density in defect's area. Histological evaluation was made based on the morphology of the new-formed tissues in defect's region. Radiographic and histological results indicated that, in all groups, new bone formation occurred only near to the defect's border, and, except in control groups, assorted degrees of inflammation could be seen. We conclude that chitosan and chitosan

chloride biomaterials were not able to promote new bone formation in critical size defects made in rat's calvaria.

Keywords: Biocompatible materials; bone regeneration; chitosan.

3 INTRODUÇÃO

Diversas técnicas têm sido usadas na tentativa de corrigir defeitos ósseos na região crânio-facial,⁹² e dentre elas o enxerto ósseo autólogo transformou-se no método mais previsível e melhor documentado, sendo, portanto, considerado o método padrão para correção desse tipo de defeito.⁷ O grande problema, porém, é que tal técnica, além de associada com morbidade, dor e perda de função temporária, também fica limitada à quantidade de material doador disponível, bem como a necessidade da criação de uma área cirúrgica adicional.⁸²

Para minimizar esses problemas há o desenvolvimento de novos biomateriais, sejam eles homólogos, xenógenos ou aloplásticos, capazes de substituir o tecido ósseo sem a necessidade da criação de um sítio doador.²⁸ Porém, tais materiais também apresentam limitações quando comparados ao osso autólogo, tais como maior susceptibilidade à infecção, não integração, e ausência de estudos longitudinais de longo prazo que comprovem sua completa interação com o hospedeiro.⁹²

Novas tecnologias e biomateriais para auxiliar nos complexos processos de reparo ósseo dependem do conhecimento das vias moleculares que cercam a formação óssea, e, em particular, da relação existente entre as células progenitoras e o ambiente específico na qual irão diferenciar-se em suas células de destino, bem como a interação com biomateriais que sejam usados no preenchimento de tais defeitos.

Recentemente, pesquisadores têm mostrado interesse em novos materiais que favoreçam a formação óssea, especialmente os

biopolímeros naturais, em particular a quitosana, um biopolímero hidrofílico obtido a partir da quitina, que parece apresentar potencial na reparação de defeitos ósseos.⁶⁷

Este material é proveniente principalmente de carapaças de crustáceos, sendo também encontrado em insetos, moluscos e na parede celular de fungos. No entanto, toda a quitina comercialmente produzida é obtida dos resíduos das indústrias de processamento de crustáceos enquanto alimento. A quitosana é um polissacarídeo originado a partir da reação de desacetilação parcial de quitina, geralmente por tratamento alcalino.¹²

Características como biocompatibilidade e biodegradabilidade são suas propriedades fundamentais. Devido a estas características biológicas, foram encontradas diversas aplicações para esta substância, dentre elas na agricultura, na indústria de alimentos e recentemente, na área médica.^{76,81} Este material pode ser apresentado na forma de gel, pasta, membranas e em diferentes granulações do pó da quitosana, e passou-se a avaliar a possibilidade de sua utilização em sítios cirúrgicos ou em terapia periodontal não cirúrgica.²⁷

Em estudos baseados em cultura celular, mostrou-se que a quitosana atua como aceleradora da reparação tecidual, capaz de aumentar a produção de matriz extracelular através do aumento de produção de fatores de crescimento.⁸⁹

Essas características fazem com que este polímero seja candidato para atuar como substituto ósseo, que ao longo do tempo seria substituído por osso natural. Polímeros de quitina são constituídos por arranjos paralelos de pontes de hidrogênio que conferem melhores propriedades mecânicas, com alta resistência a cargas, bem como estabilidade ao enxerto, características extremamente importantes especialmente nos estágios iniciais de formação óssea.⁵⁸

Os polímeros de quitosana vêm sendo testados no tratamento de lesões ósseas periodontais e defeitos ósseos^{59,67} e uma grande variedade de testes clínicos realizados para promover os materiais a base de quitosana não reportaram nenhuma reação alérgica ou inflamatória, após sua implantação, injeção, aplicação tópica ou ingestão pelo corpo humano.¹¹ A própria estrutura química da quitosana, similar à estrutura do ácido hialurônico, reforça a indicação do uso deste biopolímero como agente cicatrizador e reparador, pois a quitosana é capaz de aumentar as funções de células inflamatórias como os leucócitos polimorfonucleares e macrófagos, promovendo organização celular e atuando no reparo de feridas amplas.⁸⁹

Embora a literatura, conforme relatado acima, apresente pesquisas que utilizem a quitosana como biomaterial, as pesquisas realizadas até o momento falham ao não caracterizar a quitosana utilizada, deixando de citar fatores importantes, como o seu peso molecular ou concentração utilizada, prejudicando não só a reprodutibilidade de tais pesquisas, como

também impedindo que seja avaliada a influência destes parâmetros nos resultados obtidos com o biomaterial, o que abre ainda mais campo para pesquisas sobre as propriedades desse tipo de biopolímero.

4 REVISÃO DA LITERATURA

Com finalidade didática e organizacional, este capítulo de revisão de literatura será apresentado na forma de tópicos: Biologia da reparação óssea, histórico e descrição dos biomateriais e, finalmente, características e utilização da quitosana.

4.1 Biologia da reparação óssea

O tecido ósseo é uma forma altamente especializada de tecido conjuntivo, onde a matriz extracelular é mineralizada, composta por 67% de componentes inorgânicos, principalmente cristais de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), conferindo-lhe rigidez, mas mantendo algum grau de elasticidade, devido aos seus 33% de matriz orgânica, dentre os quais 28% referem-se ao colágeno do tipo I e 5% de proteínas não colagênicas, como a osteocalcina, osteonectina, sialoproteínas, proteoglicanas e proteínas morfogenéticas ósseas (BMP's).⁸⁵

Além de sua função mais aparente, a de suporte, sustentação e proteção aos órgãos do corpo, o osso é a maior reserva primária de cálcio do organismo, sendo o cálcio um íon essencial para a manutenção da homeostase do organismo, já que participa da manutenção do pH interno do corpo, assim como na transmissão e condução do impulso elétrico em nervos e músculos. Deste modo, o tecido ósseo apresenta alta capacidade de remodelação (também chamada de “*turn over*”), renovando-se constantemente para responder às necessidades

metabólicas do corpo e para a manutenção da estabilidade da calcemia.^{18,38,51}

A formação do tecido ósseo pode ocorrer de duas maneiras, denominadas de intramembranosa e endocondral. Embora histologicamente um osso não seja diferente do outro, a ossificação intramembranosa faz-se diretamente dentro de um tecido mesenquimatoso, ou seja, células progenitoras diferenciam-se em osteoblastos, que secretam matriz óssea formando uma malha de espículas e trabéculas ósseas. De outra maneira, na ossificação endocondral ocorre um adensamento de células mesenquimais, que se diferenciam em células cartilaginosas formando um molde de cartilagem hialina. Por fim, o molde de cartilagem cresce servindo de esqueleto estrutural para o desenvolvimento do osso, e posteriormente é reabsorvido.^{38,85}

Macroscopicamente há duas formas de osso: cortical (compacto) e esponjoso (medular). No osso compacto, a matriz de colágeno está organizada em forma de lamelas concêntricas, geralmente ao redor de um canal vascular central, constituindo o sistema de Havers. Os canais centrais contendo nervos e vasos sanguíneos se comunicam entre si e com a cavidade medular óssea através dos canais de Volkmann. Já o osso esponjoso apresenta uma matriz organizada em trabéculas, formando ângulos retos. As diferenças entre osso cortical e esponjoso não são apenas estruturais, mas também funcionais. Assim, o osso

cortical dá resistência e proteção, enquanto que o esponjoso atua nas funções metabólicas. O osso cortical ou compacto é encontrado nas diáfises de ossos longos e na superfície externa de ossos chatos. O osso esponjoso ou medular delimita espaços inter-trabeculares que são preenchidos por medula óssea vermelha, onde há a produção ativa de células sanguíneas a partir de células mesenquimais, ou, com o envelhecimento, por medula óssea amarela, um sítio de reserva de gordura.⁵¹

Protegendo externamente o osso existe uma fina camada de tecido conjuntivo com grande potencial osteogênico, denominado periósteo, e um tecido equivalente, o endósteo, que recobre as superfícies internas dos ossos.^{38,85}

Seja qual for o processo de ossificação pelo qual um osso é formado, o tecido resultante é sempre o mesmo. Porém histologicamente existem dois tipos de tecido ósseo: osso primário, embrionário, imaturo, isotrópico, ou osteóide; e osso secundário, maduro, anisotrópico, ou lamelar. Os dois tipos possuem as mesmas células, porém, apresentam diferentes orientações das fibrilas de colágeno quando analisados sob microscopia de luz polarizada.⁶ O osso primário é o primeiro tecido ósseo a se formar durante o desenvolvimento fetal, e durante a reparação óssea. Possui, proporcionalmente, grande número de osteócitos, dispostos irregularmente nas trabéculas ósseas neoformadas. As fibras

colágenas apresentam-se sem organização definida e o teor mineral é menor do que no osso secundário.

O tecido ósseo secundário substitui gradativamente o tecido ósseo primário pela deposição gradual de fibras colágenas modelando a forma trabecular do osso primário em lamelas dispostas paralelamente umas as outras, formando ângulos retos que definem pequenos espaços medulares, o chamado osso esponjoso. Quando as fibras colágenas encontram-se dispostas em camadas concêntricas em torno de capilares sanguíneos e nervos, são denominadas de canal de Havers, constituindo o chamado osso compacto.²⁶

Essa dinâmica de modelação óssea é explicada pela incidência de forças externas sobre o tecido, alterando assim a arquitetura das fibras colágenas, e por fim promovendo resistência ao tecido. Assim pode-se explicar porque o osso é um tecido adaptável, ou seja, o tipo de modelamento ósseo está diretamente ligado à carga que ele recebe, determinando assim o osso esponjoso e compacto.

Pode-se encontrar basicamente quatro tipos de células no tecido ósseo: células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos.

As células osteoprogenitoras estão localizadas no periósteo e no endósteo. Essas células são derivadas do mesênquima e apresentam potencial em se diferenciar nos osteoblastos, e quando privadas de oxigênio e nutrientes, diferenciam em células condrogênicas.²⁶

Os osteoblastos são células cubóides advindas das células osteoprogenitoras, e estão organizadas em uma camada contínua sobre a superfície da matriz osteóide, ou seja, a camada não mineralizada de matriz, que recobre a superfície óssea mineralizada. Estas células são responsáveis pela osteogênese, isto é, pela síntese e secreção da matriz orgânica, sua maturação e mineralização. O osteoblasto além de sintetizar e secretar o colágeno tipo I, que corresponde a 90% da matriz orgânica, também produz as outras proteínas não colagênicas encontradas na matriz, como: sialoproteína óssea, osteopontina, osteonectina, osteocalcina, BMP's, proteoglicanas e outras. É também a célula responsável pela produção da enzima fosfatase alcalina óssea, essencial e indispensável para o processo de mineralização da matriz.⁵¹ Quando inativos, os osteoblastos passam a ser denominados células de revestimento.²¹ Vários fatores sistêmicos e locais regulam o seu número, a sua diferenciação e a sua atividade, incluindo fatores autócrinos. Assim, estas células possuem receptores para hormônios (paratormônio, estrógenos, glicocorticóides, insulina, hormônios tireoideanos), vitamina D3 e fatores locais como prostanóides (PGE, PGF2 α), citocinas (TGF- β s, BMPs, FGFs, IGF-1, PDGF) e interleucinas.⁷²

Os osteócitos são células ósseas maduras, derivadas dos osteoblastos. Estão aprisionadas em lacunas dentro da matriz óssea calcificada, pois foram a ela incorporados durante seu processo de secreção e mineralização. Têm a função principal de manutenção do

tecido ósseo, pois apresentam prolongamentos citoplasmáticos unidos por junções comunicantes (canalículos) formando um complexo necessário à manutenção e vitalidade da matriz, já que interligam as células e o perióstio.³⁸

Os osteoclastos são células grandes multinucleadas, formadas pela fusão de células mononucleares, sendo derivadas dos monócitos do sangue. Quando ativo é polarizado, com parte da membrana envolvida na reabsorção fortemente aderida à superfície óssea e que delimita a zona reabsorvente da célula, denominada “borda em escova” ou “borda franjada”. Com o início da reabsorção aparece uma depressão na superfície óssea junto à borda em escova que é conhecida como lacuna de Howship.^{26,38,51,85}

A interação da atividade de osteoblasto-osteoclasto é responsável pela remodelação óssea, ou seja, a reabsorção e a neoformação óssea contínua que ocorre em todos os ossos.⁷⁵ Deste modo, os osteoblastos produzem fatores que vão influenciar a diferenciação e função dos osteoclastos, alguns destes são depositados e armazenados na matriz e outros secretados localmente em resposta a hormônios ou fatores locais. Os receptores para a maioria dos fatores osteolíticos são encontrados nos osteoblastos e não nos osteoclastos. Em cultura, os osteoclastos reabsorvem osso em resposta a fatores liberados por osteoblastos estimulados⁵², e componentes da matriz óssea é que atraem e ativam os

osteoclastos. Por outro lado, a reabsorção óssea libera fatores que recrutam e ativam os osteoblastos.⁸⁶

Um destes fatores que controlam o comportamento osteoclástico, é a osteoprotegerina (OPG), descoberta em 1997.⁸⁰ A super-expressão dessa substância em camundongos transgênicos resultava em osteopetrose devido ao bloqueio da diferenciação de osteoclastos. A identificação e o estudo funcional da OPG mostraram que, além de esteróides e outros hormônios, novas moléculas secretadas podem atuar sistemicamente no controle da diferenciação de osteoclastos. Obviamente a identificação de um receptor solúvel que controla a osteoclastogênese sugeriu que deveria existir um fator associado a este receptor, o qual foi chamado de RANKL, ou fator de diferenciação de osteoclastos (ODF).

Sabe-se, portanto, que a regeneração óssea não é somente um processo biológico, mas, fatores elétricos, bioquímicos e mecânicos são também de fundamental importância na regeneração e manutenção do osso vivo.⁷⁰

A remodelação óssea não ocorre apenas no desenvolvimento do tecido, ou após uma injúria, seja esta patológica ou traumática. É um processo dinâmico, que ocorre no decorrer de toda vida, porém com menor intensidade quando comparado ao processo de reparação tecidual geral. A remodelação óssea se caracteriza por ser um processo cíclico e de longa duração que ocorre principalmente por intermédio dos osteoblastos realizando aposição óssea, e com os osteoclastos,

responsáveis pela reabsorção óssea. O resultado da atividade dos osteoclastos é uma verdadeira escavação óssea acompanhada da liberação de produtos da degradação do tecido, que são incorporados pelos capilares sanguíneos, promovendo uma perfeita homeostase tecidual. Essa seqüência de eventos, na verdade, constitui um mecanismo de autoreparação da estrutura óssea, preservando a massa e a arquitetura óssea dos organismos.^{70,74}

4.2 Biomateriais

O organismo está sujeito a inúmeras adversidades que podem levar à perda de um órgão (perda dental, por exemplo), de massa corpórea (perdas ósseas), ou à substituição de um tecido por outro, podendo ser este novo tecido indesejado ou ineficiente. Isto é especialmente verdadeiro no que se refere ao tecido ósseo. Como observado anteriormente, este é um tecido altamente dinâmico e versátil, com funções diversas, como proteção de órgãos, reservatório de cálcio, sustentação do corpo. Em determinadas situações, como em casos de acidentes ou doenças osteodestrutivas, nem sempre toda a dinâmica orgânica pode ser capaz de regenerar o tecido perdido e, assim, devolver forma e função adequadas.⁶

Em Odontologia, inúmeras são as situações onde as perdas ósseas prejudicam a função dental, como nas periodontites, ou até

mesmo impedem a reabilitação bucal, como é o caso de pacientes desdentados que necessitam de reabilitação com implantes osseointegráveis, mas não possuem quantidade ou qualidade óssea adequadas. A busca por novos materiais sintéticos para o tratamento dessas alterações do volume ósseo incentiva o estudo de técnicas apoiadas no desenvolvimento tecnológico dos biomateriais.⁷⁴

Os biomateriais são definidos como aqueles materiais utilizados na área médica ou biomédica, objetivando a interação com o sistema biológico.⁹¹ Muitos deles são uma alternativa efetiva para a substituição de tecidos perdidos, incluindo o tecido ósseo, pois não apresentam riscos de transmissão de doenças ou rejeição imunológica além de apresentarem suprimento teoricamente ilimitado.²⁹ Em suma, pode-se dizer que biomateriais são materiais artificiais desenvolvidos para uso em áreas da saúde com finalidade de substituir a matéria viva (órgãos ou tecidos) cuja função foi perdida, englobando qualquer substância sintética ou natural que pode ser utilizada para este fim. Excluem-se aqui os fármacos ou combinações de substâncias.⁹¹

Para que o biomaterial execute sua função biológica com sucesso, o mesmo deve ser utilizado em íntimo contato com os tecidos do indivíduo e, para tanto, deve possuir características como: biocompatibilidade, previsibilidade, aplicabilidade clínica, ausência de riscos trans-operatórios e seqüelas pós-operatórias mínimas, além de aceitação pelo paciente.⁷⁸ Espera-se ainda que o biomaterial não seja carcinogênico ou pirogênico,

apresente estabilidade química e biológica, resistência mecânica e elástica adequadas, e tenha baixo custo.⁵

Apesar de haver uma grande variedade de biomateriais substitutos ósseos, associada a um avanço crescente no seu desenvolvimento e aperfeiçoamento, ainda não existe um biomaterial que preencha todos esses requisitos.⁹¹

Artigos científicos sobre defeitos ósseos criados experimentalmente e preenchidos com biomateriais são bastante comuns na literatura. Ponto pacífico nesses artigos seria o fato de que um biomaterial ideal para implante ósseo, de origem não autógena, deve ser esterilizável, não tóxico, não induzir resposta imunológica e que possa estar disponível em quantidades suficientes. Este deve ainda ser capaz de induzir a diferenciação de células em osteoblastos, sendo ao mesmo tempo gradualmente absorvível, fornecendo um suporte condutivo para formação de um novo osso. Adicionalmente, o material deve funcionar como uma barreira mecânica para o crescimento de tecido fibroso ou invaginação de tecido muscular para dentro do defeito.¹

Os biomateriais para implante e enxertia podem ser classificados de acordo com sua origem em quatro grandes famílias: Autólogos, Homólogos, Aloplásticos e Xenogênicos.^{54,53}

O biomaterial autólogo é obtido de áreas doadoras do próprio indivíduo. O homólogo é obtido de indivíduos da mesma espécie do receptor; os xenogênicos são obtidos de indivíduos de espécies diferentes

do receptor, sendo mais comumente obtidos de bovinos e os aloplásticos podem ser de natureza metálica, cerâmica ou polimérica.^{54,53,91}

Biomateriais metálicos são aqueles que apresentam, quando na forma sólida, ligações metálicas em sua composição. Já os cerâmicos são aqueles obtidos pelo cozimento ou queima de minerais não metálicos, enquanto que os poliméricos seriam compostos formados pela combinação de unidades menores, unidas por ligações covalentes, formando macromoléculas, tais como a quitosana.⁹¹

Os biomateriais podem também ser classificados de acordo com seu mecanismo de ação em osteogênicos (capacidade de levar consigo células viáveis), osteoindutores (induzem células mesenquimais indiferenciadas a se diferenciarem em osteoblastos, iniciando o processo de remodelação óssea) e osteocondutores (servem de arcabouço para a neoformação óssea, permitindo a migração celular, para o interior do defeito, e a proliferação de vasos sanguíneos, formando uma nova matriz óssea). Mudanças tecnológicas na produção dos biomateriais e na obtenção dos substitutos ósseos são responsáveis por conferir a estes materiais características de osteoindução, osteocondução ou osteogênese, e estes fatores são o grande foco atual da bioengenharia.^{10,16,90}

Os biomateriais podem ainda ser classificados como bioestáveis (permanentes, utilizados na substituição por tempo indeterminado, de um tecido lesado, devendo possuir características mecânicas e físico-

químicas compatíveis com tal função) e bioabsorvíveis (temporários, substituindo tecidos que necessitam de um suporte que preencha apenas temporariamente a região lesada, até que a recomposição tecidual se concretize, ou ainda que direcione o processo regenerativo).⁸⁷

Há ainda outra classificação que pode ser utilizada para os biomateriais, em função das características físico-químicas resultantes do seu processamento, aonde são classificados em biomateriais orgânicos e inorgânicos. Por exemplo, o osso, geralmente bovino, é desmineralizado em condições controladas de pH e temperatura removendo os componentes inorgânicos e celulares, restando predominantemente colágeno tipo I e, em algumas vezes, resíduos de fatores de crescimento. O material inorgânico é obtido através da desproteinização do osso através de processos termo-químicos que removem sua porção orgânica, restando fundamentalmente hidroxiapatita (HA).¹⁰

O enxerto autólogo é considerado o padrão ouro atualmente, e é largamente empregado quando da necessidade de aumento do volume ósseo, visto que é o biomaterial que mais se aproxima de apresentar propriedades desejáveis como osteogênese, osteocondução e osteoindução, simultaneamente. Além disso, por ter origem no mesmo indivíduo que irá receber o enxerto, a aceitação do procedimento pelo organismo torna-se facilitada, sem risco de rejeição. Contudo, inconvenientes desta técnica podem ser descritos, como a necessidade de internação em alguns casos, necessidade de criação de uma segunda

área cirúrgica, maior período de convalescença, susceptibilidade a infecções nos sítios doadores e, ainda, reabsorção progressiva e constante. Nem sempre a obtenção de quantidade e qualidade adequadas de osso autógeno é simples, e os inconvenientes citados anteriormente podem desencorajar o paciente à realização do procedimento.¹⁰

São esses os principais fatores que movimentam a busca pelos biomateriais não autólogos, capazes de contornar essas dificuldades e ao mesmo tempo trazendo o máximo das vantagens desse biomaterial quanto for possível.⁷⁸

4.3 Características e utilização da Quitosana

A quitosana é um biopolímero hidrofílico obtido a partir da quitina, termo derivado da palavra grega *Khitón* (que significa carapaça, casca ou caixa de revestimento), e que designa um polissacarídeo abundante na natureza, perdendo apenas para a celulose em quantidade produzida anualmente.⁷⁷

A quitina, segundo polímero mais abundante na natureza, é um polissacarídeo constituído por uma seqüência linear de açúcares monoméricos do tipo β -(1-4)2-acetamido-2-deoxi-D-glicose(N-acetilglicosamina) possuindo, assim, estrutura semelhante à das fibras de celulose. A diferença estrutural entre estas duas fibras se deve aos

grupos hidroxila, localizados na posição dois, que são substituídos na quitina por grupos acetamino. Sua principal fonte natural de obtenção é a carapaça de crustáceos (caranguejos, camarões, lagostas e siris), podendo também ser encontrada em insetos, moluscos e na parede celular de fungos. A quitina apresenta grande variedade de aplicabilidade, principalmente na indústria têxtil, alimentícia e de cosméticos. Entretanto, sua maior aplicação encontra-se na produção de quitosana, que pode ser utilizada em diversas aplicações.⁷⁹

Toda a quitina comercialmente produzida é obtida dos resíduos das indústrias de processamento de crustáceos enquanto alimento. A quitosana é um polissacarídeo originado a partir da reação de desacetilação parcial de quitina, geralmente por tratamento alcalino, podendo ocorrer também naturalmente em alguns fungos.^{12,13}

A quitosana foi descoberta em 1859 por Rouget, quando do contato da quitina com uma solução de hidróxido de potássio em ebulição. Durante o curso da desacetilação alcalina, ligações N-acetil do polímero quitina são rompidas, formando-se a D-glicosamina, que contém um grupo amino livre. Entretanto, a quitosana não pode ser considerada uma molécula uniforme e sim um grupo de polímeros parcialmente desacetilados, dos quais os que apresentam grau de desacetilação acima de 50% podem ser considerados como quitosana. As aplicações e características da quitosana dependem fundamentalmente do grau de desacetilação e do tamanho da cadeia polimérica. Assim sendo, um rígido

controle das condições reacionais é essencial em um processo em escala industrial para que se obtenha um polímero de cadeia longa e com grau de desacetilação na faixa desejada. Outra opção de produção industrial de quitosana se faz através da desacetilação microbiológica, utilizando-se enzimas específicas ou microrganismos.¹⁵

A quitosana é uma das poucas fibras naturais solúveis em meio ácido, como por exemplo, suco de limão, vinagre ou suco gástrico. As estruturas químicas da quitina e da quitosana podem ser comparadas na Figura 1.

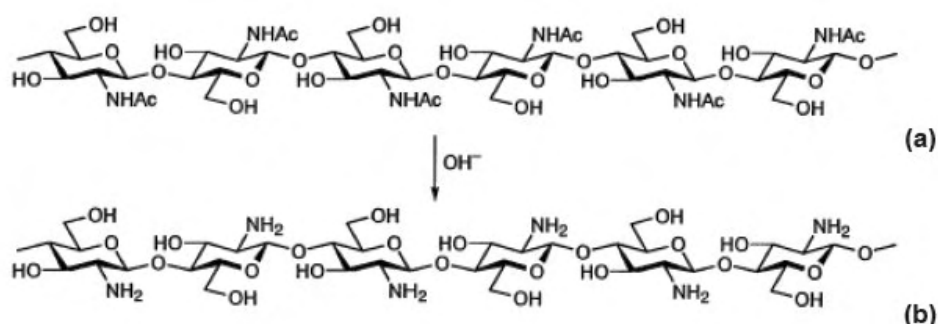


FIGURA 1 – Estruturas químicas dos polissacarídeos quitina (a) e quitosana (b).

A quitina e a quitosana são biologicamente sintetizadas em um total de aproximadamente um bilhão de toneladas anualmente, sendo biodegradadas sem acúmulo excessivo na natureza, através do ciclo da quitina. As enzimas hidrolíticas envolvidas neste processo (lisozima, quitinase, quitina deacetilase e quitosanase) estão largamente

distribuídas nos tecidos e fluidos corpóreos dos animais, nas plantas, além de também se encontrarem presentes em microrganismos do solo.¹⁵

A quitosana é insolúvel em água, ácidos concentrados, álcalis, álcool e acetona, sendo completamente solúvel em soluções de ácidos orgânicos quando o pH da solução é próximo de seis. Alguns ácidos inorgânicos e diluídos tais como o ácido nítrico, perclórico ou fosfórico, podem ser utilizados no preparo de soluções de quitosana, entretanto, a solução deve ser mantida sob agitação e aquecimento durante um longo período para que ocorra a completa dissolução do polissacarídeo.⁷⁹

Outro importante parâmetro a ser ressaltado refere-se à carga da quitosana em meio ácido. Este polímero se comporta como um polieletrólito, ou seja, apresenta uma alta densidade de carga (uma carga positiva por unidade de glicosamina). Uma vez que biomoléculas como proteínas, polissacarídeos aniônicos, ácidos nucléicos e ácidos graxos, dentre outras, podem apresentar cargas negativas em suas superfícies, freqüentemente verifica-se apreciável interação destas com a quitosana, o que justifica sua atividade sobre elas.

A quitosana é um excelente floculante devido à presença do grande número de grupos amino (NH^{3+}) em sua estrutura, os quais podem interagir com colóides carregados negativamente. Como exemplo, tem-se a facilidade de aderência da quitosana em polímeros naturais como o cabelo, pele, e sangue, constituídos por proteínas e mucopolissacarídeos com cargas negativas. Outra importante propriedade da quitosana refere-

se à sua capacidade de complexação com diversos íons metálicos, sendo, deste modo, útil na quelação do ferro, cobre e magnésio. Tal fato possibilita sua utilização em processos de remoção de íons de metais pesados tóxicos, tais como prata, cádmio, mercúrio, chumbo, níquel e cromo que se encontrem em níveis acima dos limites de tolerância e/ou permitidos.¹⁵

Foram encontradas diversas aplicações para este biomaterial, aonde vem sendo empregada como bioadesivo e osseindutor^{42,44}, além de excipiente para indústria farmacêutica²³, agente cicatrizador, agente antimicrobiano, material de bandagem, molde para enxerto de pele e agente hemostático⁷⁷. Apresenta outras características interessantes como por exemplo não toxicidade, podendo ainda ser utilizada de acordo com sua apresentação na forma de filmes, gel ou solução⁶⁶⁻⁶⁹, na dependência de sua concentração.

As aplicações e a produção industrial da quitosana experimentaram um elevado crescimento a partir da década de 70. No Japão, a produção de quitosana cresceu 37% ao ano entre 1978 e 1983. Atualmente, as maiores aplicações da quitosana estão centralizadas na purificação da água, no processamento de alimentos e na quelação de íons metálicos. A tendência atual para aplicações industriais concentra-se em produtos de alto valor agregado, como cosméticos, agentes de liberação de fármacos no organismo, aditivos alimentares, membranas semipermeáveis e produtos farmacêuticos. Recentemente, foi relatado o grande potencial da

quitosana na área de biotecnologia, podendo ser utilizada na forma de flocos, gel ou membrana na imobilização de células em meios de cultura.¹⁵

Os produtos da degradação enzimática da quitosana são oligômeros de N-acetil-D-glicosamina, os quais, além de apresentarem propriedades cicatrizantes e antimicrobianas, são totalmente absorvíveis pelo organismo.¹⁵

Em razão da capacidade da quitosana em formar géis, filmes e membranas em soluções ácidas diluídas, diversas aplicações que exploram esta propriedade vêm sendo estudadas. A simples evaporação do solvente de uma solução de quitosana espalhada sobre uma placa de vidro é considerada como sendo a técnica mais simples para o preparo de filmes de quitosana, produzindo, geralmente, filmes flexíveis e resistentes. Um exemplo específico desta aplicação reside na obtenção de membranas para uso como rins artificiais, as quais apresentaram alta resistência mecânica aliada à alta permeabilidade à uréia e à creatina. Sendo impermeáveis às proteínas séricas, apresentam a vantagem única de evitar a liberação de metais tóxicos na corrente sanguínea, ao contrário do que ocorre normalmente com outras membranas.¹⁵

Desde 1950, já se conhece a aptidão dos policátions em geral de se ligarem às células vermelhas do sangue. Muitos estudos têm mostrado sua eficácia como agentes aglutinantes de células. A quitosana, sendo classificada como policátion, apresenta propriedades ligantes e

aglutinantes. Em meados dos anos 60, estudos mostraram a capacidade da quitosana, em baixas concentrações, de promover a aglutinação das células vermelhas do sangue, sendo tal capacidade dependente da estrutura e da massa molar do polímero.⁵⁰

O mecanismo pelo qual a quitosana se liga às células tem sido alvo de diversas pesquisas. É bem conhecido que a força repulsiva existente entre as células vermelhas do sangue deve-se à rede de cargas negativas das membranas celulares. Esta alta carga negativa na superfície das células deve-se principalmente à presença de resíduos de ácido neuramínico na membrana celular. A formação do gel sobre as células vermelhas do sangue é decorrente da interação entre o polímero positivamente carregado (quitosana) e os receptores contendo resíduos do ácido neuramínico presentes na superfície da célula. Recentemente, na Guerra no Iraque (2003), o exército americano utilizou gazes recobertas com quitosana como agente hemostático visando, desta forma, estancar o sangramento dos soldados atingidos.⁵⁰

A quitosana tem sido também utilizada no tratamento da acne, inibindo o crescimento de determinados tipos de bactérias responsáveis pelo processo inflamatório associado a esta doença.¹⁵ Mediante esta propriedade, a quitosana tem sido indicada por especialistas em formulações de cremes e loções de tratamento de pele. Além disso, a quitosana também apresenta propriedade fungicida e, quando utilizada

como conservante de alimentos, apresenta atividade bactericida superior à do ácido láctico.⁷⁹

Experimentos utilizando aplicações tópicas de quitosana através de pomadas e bandagens mostraram que este biopolímero promove uma rápida cicatrização de ferimentos e abscesso infectados por *Staphylococcus*. Tais aplicações diminuíram o tempo de coagulação, que é de fundamental importância na cicatrização de ferimentos.¹⁵

Todas essas aplicações da quitosana só tem sido possíveis pois características como biocompatibilidade e biodegradabilidade estão presentes. Além disso, este polímero pode atuar como material substituto ósseo que ao longo do tempo vai sendo substituído por osso natural. Polímeros de quitina são constituídos por arranjos paralelos de pontes de hidrogênio que conferem melhores propriedades mecânicas, com alta resistência a cargas, bem como estabilidade ao enxerto, características extremamente importantes especialmente nos estágios iniciais de formação óssea.⁵⁸

A quitosana mostra também capacidade para se degradar quando utilizado in vivo, e isso ocorre principalmente por meio de hidrólise enzimática.⁴⁰ A capacidade de degradação de um biomaterial é um fator extremamente importante na performance a longo prazo dentro da engenharia tecidual, pois isso pode afetar muitos processos celulares, incluindo o crescimento celular, regeneração tecidual e reposta do hospedeiro ao biomaterial. Se um biomaterial é utilizado em engenharia

tecidual do sistema músculo-esquelético, sua degradação deve ser relativamente lenta, de maneira a permitir que aquele espaço seja mantido até que a regeneração esteja quase que totalmente concluída. A lisozima é a principal enzima responsável pela degradação in vivo da quitosana, pois ataca resíduos acetilados, encontrados em abundância nesse biomaterial.³²

Os produtos finais da degradação da quitosana são alguns oligossacarídeos de tamanhos diversos. A taxa de degradação é inversamente proporcional ao grau de cristalinidade do biomaterial, fator esse controlado pelo grau de desacetilação da quitosana. Formas muito desacetiladas (DA > 85%) exibem taxas de degradação relativamente baixas e podem durar meses antes de serem reabsorvidas in vivo, enquanto formas com graus de desacetilação menores sofrem degradação mais rapidamente. A taxa de degradação também afeta as propriedades mecânicas e a solubilidade da quitosana.^{39,43,65}

Outra propriedade desse biomaterial é que ele possui considerável atividade antibacteriana, contra um amplo espectro de bactérias. Alguns estudos mostram que o gel de quitosana pode diminuir a taxa de infecção em osteomielite causada por *Staphylococcus aureus* induzida em coelhos.³ A natureza catiônica da quitosana faz com ela possa interagir com os ânions da parede celular bacteriana. Essa interação entre a quitosana carregada positivamente e a parede celular bacteriana carregada negativamente leva ao vazamento de todo o conteúdo

intracelular bacteriano. A ligação da quitosana ao DNA e a inibição da síntese de RNA mensageiro ocorre através da penetração da quitosana no núcleo dos microorganismos, o que altera sua síntese de RNA e proteínas.

A área da cicatrização de feridas também tem recebido muita ênfase nas pesquisas com quitosana. Um grande número de pesquisadores vem examinando a resposta do receptor aos vários tipos diferentes de implantes de quitosana. No geral, esses materiais induzem uma reação de corpo estranho reduzida, com pequeno grau de encapsulamento. Durante o curso da cicatrização, há a formação de um tecido de granulação normal, normalmente associado a uma angiogênese acentuada. Este biomaterial é capaz de aumentar as funções de células inflamatórias como os leucócitos polimorfonucleares e macrófagos, promovendo organização celular. Sendo assim, poderia contribuir beneficentemente para o reparo tecidual.⁸⁹ Porém, alguns estudos demonstram que a quitosana e seus fragmentos podem estimular células do sistema imune a se proliferar, interferindo negativamente na integração do biomaterial ao organismo receptor.⁴⁰

A quitosana é tida como acelerador da reparação tecidual, capaz de aumentar a produção de matriz extracelular através do aumento de produção de fatores de crescimento. Em cultura de células, acelera a infiltração de leucócitos polimorfonucleares nas fases iniciais de cicatrização tecidual, aumentando, consideravelmente, a osteopontina,

uma fosfoproteína capaz de aumentar a ligação celular na ferida em cicatrização.⁸⁹

A quitosana também tem sido usada dentro da regeneração óssea. Nos casos de sítios fechados, bolsas periodontais, defeitos infra-ósseos, o gel de quitosana puro ou misturado a algum outro biomaterial pode ser levado com uma seringa sem a necessidade de anestesia e pode ser adicionada solução hidro-alcoólica para diminuir sua viscosidade. Já para o preenchimento de defeitos ósseos, essa fluidez deve ser ajustada para que haja um completo preenchimento da cavidade e, portanto, não deve ter um alto grau de escoamento. Os autores⁶⁷⁻⁶⁹ também descrevem que a apresentação do gel pode variar de acordo com a relação entre o polímero e o solvente, obtendo-se assim as diferentes consistências desejadas.

A combinação da quitosana com outros materiais parece ser tema comum em vários estudos, sendo que essas associações têm sido amplamente estudadas. O “mix” entre substâncias sintéticas e naturais, orgânicas e inorgânicas cria novos biomateriais com propriedades físico-químicas e biológicas mais amplas, favorecendo a aplicação clínica desses materiais.⁴⁰

Este tipo de material também vem sendo empregado como bioadesivo e agente permeável, o que permite seu uso para facilitar a entrega de drogas (“*drug delivery*”).^{62,60,61,83} Esta propriedade torna o gel derivado da quitosana um bom candidato como meio de liberação de

medicamentos na mucosa bucal, canais radiculares, dentinas cariadas e bolsas periodontais. Recentemente, foi proposto utilizá-lo como material para a entrega de antibióticos para redução bacteriana local em aplicações orais.^{17,49} Atualmente, polímeros de quitosana vêm sendo testados em odontologia no tratamento da redução bacteriana.^{37,73,84} Sistemas de entrega de droga foram desenvolvidos para aumentar a eficácia do efeito local e minimizar os efeitos colaterais indesejados.¹³ A aplicação do gel de quitosana, por exemplo, pode prover uma permanência longa nos tecidos designados, penetração de drogas associadas, eficácia alta e aceitabilidade.³³

Quando se pretende aplicar a quitosana em regiões com comprometimento sistêmico, sua esterilização se torna necessária, o que traz à tona problemas, pois este biopolímero, quando exposto a temperaturas maiores que 120°C, sofre alterações em seu grau de solubilidade, aparência e estrutura física, e quando exposto à radiação gama, sofre fissuras e um decréscimo de viscosidade dose-dependente, sendo que o meio de desinfecção que menos altera a quitosana é a radiação ultra-violeta⁴⁷, o que abre ainda mais campo para pesquisas sobre as propriedades biomecânicas desse tipo de biopolímero.

Pesquisas que caracterizam a quitosana utilizada na fabricação do biomaterial, citando fatores importantes, como o seu peso molecular ou concentração utilizada são raras, o que prejudica sua reprodutibilidade e

impede que seja avaliada a influência destes parâmetros nos resultados obtidos com o biomaterial.⁴⁰

5 PROPOSIÇÃO

5.1 Geral

O propósito geral deste trabalho foi desenvolver e avaliar o efeito de biomateriais à base de quitosana na reparação de defeitos ósseos.

5.2 Específica

Avaliar, radiográfica e histologicamente o efeito da variação do peso molecular dos géis de quitosana e de cloridrato de quitosana na reparação de defeitos ósseos críticos realizados em calvárias de rato.

6 MATERIAL E MÉTODO

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da FOAR-UNESP (CEEA), sob o número de protocolo 024/2006, que pode ser visualizado no Anexo 1.

6.1 Desenvolvimento dos biomateriais

Para a realização deste trabalho, o primeiro passo foi a obtenção da quitina que daria origem a quitosana e ao cloridrato de quitosana utilizados.

Visando este objetivo, cascas de camarão obtidas junto aos produtores do litoral sul do estado de São Paulo, armazenadas em freezers do Instituto de Química, da Universidade de São Paulo, Campus de São Carlos, foram lavadas em água corrente para remoção de impurezas, trituradas em um liquidificador, desproteinizadas em solução de Hidróxido de Sódio 1 M e desmineralizadas em solução de Ácido Clorídrico 0,25 M, fornecendo a quitina em pó.

Para a obtenção da quitosana, em dois balões volumétricos, 5 g de quitina foram suspensas em 220 ml de solução de Hidróxido de Sódio 40%, à temperatura de 115 °C, sob agitação constante durante 6 horas, promovendo sua desacetilação. Em um dos balões adicionou-se Borohidreto de Sódio para minimizar a despolimerização das cadeias, produzindo quitosana de peso molecular maior. No outro balão volumétrico a reação ocorreu normalmente, produzindo quitosana de peso

molecular menor. Esses materiais foram lavados com água destilada, filtrados, secos e suspensos em solução de Ácido Acético 1% sob agitação durante 24 h. Na seqüência as soluções resultantes foram filtradas e neutralizadas por adição de Hidróxido de Amônio para precipitação das quitosanas, que foram lavadas com água destilada, secas e depois suspensas em solução de Ácido Acético (0,1M), produzida com água estéril, a uma concentração de 20 mg/ml para obtenção dos géis de quitosana.

Já para o cloridrato de quitosana, as quitosanas foram suspensas em solução de Ácido Acético (0,1 M) a uma concentração de 20 mg/ml, e dialisadas contra uma solução de Cloreto de Sódio 0,2 M durante três dias. As amostras de cloridrato de quitosana obtidas foram congeladas em nitrogênio líquido, liofilizadas, e posteriormente dissolvidas em água destilada estéril para a obtenção do gel.

A obtenção dos biomateriais seguiu rigorosamente os passos descritos nesta metodologia, e como resultado obtiveram-se géis de quitosana e de cloridrato de quitosana de peso molecular 90.000 e 400.000 kDa, parâmetro esse avaliado de eletroforese, com pH ao redor de 6 e viscosidade estável à temperatura de 37 °C (Figuras 2 - 4).

Os pesos moleculares obtidos refletem os dois extremos que podemos encontrar ao trabalharmos com quitosana. As menores moléculas de quitosana apresentam peso molecular em torno de 90.000 kDa, enquanto que as moléculas maiores chegam a pesar em torno de

400.000 kDa. Dessa maneira, verificamos a influência dessa variável na atuação do gel desenvolvido. Já em relação à concentração de quitosana e de cloridrato de quitosana presente no gel, foi fixado o valor de 20 mg/ml, pois essa é a chamada concentração estequiométrica do gel, ou seja, todas as cadeias hidrolisáveis das moléculas de quitosana estão interagindo com o ácido, sem que haja falta ou excesso deste, evitando que o pH do gel se torne desnecessariamente muito baixo.

Durante a produção dos biomateriais, foi feito o uso de materiais esterilizados e de água estéril como solvente, aliado ao uso de radiação ultravioleta sobre os géis, durante o período de 12 horas, antes de sua utilização.

6.2 Aplicação dos géis

6.2.1 Amostra

Neste estudo foram utilizados 50 ratos *Rattus norvegicus*, variação *albinus*, *Holtzman*, machos, adultos, de aproximadamente 3 meses de idade, com massa corporal média de 350 gramas, mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araraquara (FOAr-UNESP), alimentados com ração sólida e com acesso a água *ad libitum*, antes e durante todo o período experimental, em ambiente com água, luz e temperatura controladas, sendo que suas gaiolas foram identificadas pelo

nome do pesquisador responsável, massa corporal do animal, data da cirurgia e do sacrifício, conforme o grupo e período, também apontados.

Os animais foram selecionados aleatoriamente e divididos em 5 grupos, que foram avaliados em dois períodos experimentais (15 e 60 dias), com 5 animais em cada grupo. No total, foram confeccionados cirurgicamente 50 defeitos ósseos, um em cada animal, distribuídos como segue, de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 - Número de defeitos ósseos segundo período (dias) e grupos

Período (Dias) Grupos	15	60	Total
G I	5	5	10
G II	5	5	10
G III	5	5	10
G IV	5	5	10
G V	5	5	10
Total	25	25	50

Grupo I (G I) – Defeito preenchido por coágulo sanguíneo - Grupo controle; **Grupo II (G II)** – Defeito preenchido por gel de quitosana de baixo peso molecular (90.000 kDa); **Grupo III (G III)** – Defeito preenchido por gel de quitosana de alto peso molecular (400.000 kDa); **Grupo IV (G IV)** – Defeito preenchido por gel de cloridrato de quitosana de baixo peso molecular (90.000 kDa); **Grupo V (G V)** – Defeito preenchido por gel de cloridrato de quitosana de alto peso molecular (400.000 kDa).

Os animais foram anestesiados por uma combinação de Quetamina com Xilazina, na proporção de 0,08 ml/100g de massa corporal (Cloridrato de Quetamina – Francotar – Virbac do Brasil Ind. Com. Ltda.) e 0,04 ml/100g massa corporal (Cloridrato de Xilazina -

Virbaxyl 2% - Virbac do Brasil Ind. E Com. Ltda.), respectivamente. Posteriormente, os animais foram submetidos à tricotomia na região da calvária e foi realizada anti-sepsia do campo cirúrgico com gaze estéril, embebida em solução de povidine, com o animal sendo então posicionado em decúbito ventral sobre a mesa cirúrgica.

6.2.2 Procedimento cirúrgico

Foi utilizada técnica cirúrgica descrita previamente¹⁴, com o acesso cirúrgico à porção posterior da calvária sendo obtido com uma incisão cutânea e muscular central no sentido ântero-posterior, com aproximadamente 3cm de extensão, permitindo a exposição do tecido ósseo, utilizando-se cabo para bisturi com lâmina intercambiável nº 15.

Em seguida, os tecidos foram divulsionados com o auxílio de uma tesoura pequena com a extremidade romba e uma pinça de dissecação, até a exposição do perióstio, sendo este incisado e removido com o mesmo tipo de lâmina até a exposição do tecido ósseo.

Foram confeccionados defeitos ósseos circulares, na porção mediana da calvária, imediatamente após o vértice da sutura posterior craniana do animal, com 8 mm de diâmetro e aproximadamente 1,5 mm de espessura, dada pela remoção total do tecido ósseo, utilizando uma fresa trefina (3i – 3i implantes do Brasil) com 8 mm de diâmetro externo, montada em contra-ângulo (Anthogyr – Injecta – Diadema, Brasil) com

redução de 16:1, acoplado em motor para implante (BML 600 Plus Driller - CK Driller – Brasil), com 1500 rpm, sob irrigação constante com solução salina. Todos os cuidados foram mantidos para evitar qualquer lesão à dura-máter.

6.2.3 Implantação dos biomateriais

Cada biomaterial foi implantado no defeito ósseo, sendo acomodado sobre a dura-máter, com espátula nº 7 e pinça, preenchendo completamente o defeito, sem extravasamento.

A distribuição da implantação dos biomateriais foi padronizada segundo grupos (GII, GIII, GIV e GV) e pontos biológicos (15 e 60 dias), com exceção do GI, onde após a confecção do defeito ósseo, houve apenas a permanência do coágulo sanguíneo.

Em seguida, todos os defeitos foram recobertos por membrana de colágeno (Genius-Baumer, Brasil), e suturados em planos com fio de sutura Vycril 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, Brasil). O animal foi então medicado com uma dose de 1ml de Pentabiótico (Fort-Dodge, Brasil) para cada 100 gramas de peso.

Aparentemente, as metodologias aplicadas, respeitando os preceitos de bioética e biossegurança, não foram traumáticas e não trouxeram incômodos ou dor aos animais utilizados durante a pesquisa,

sendo que nenhum animal foi perdido durante a realização desta metodologia (Figuras 5 – 9).

6.3 Avaliação radiográfica

Para a avaliação radiográfica, foram realizadas duas radiografias digitais da região do defeito ósseo preenchido com biomaterial, sendo que uma radiografia foi feita imediatamente após a cirurgia (radiografia inicial), e a outra no momento do sacrifício do animal (radiografia final), aos 15 e 60 dias, de acordo com o grupo. Para tal, um sensor radiográfico Schick CDR (Schick Technologies Inc, Island City, NY, EUA) foi posicionado paralelamente à superfície do defeito criado, de maneira padronizada para todos os animais, por meio de um posicionador que foi desenvolvido exclusivamente para essa aplicação, com uma distância foco-sensor de 40 cm. O aparelho de raio-X GE 100 (General Electrics, EUA) foi ajustado em 70 KvP e 10 mA, com um tempo de exposição ajustado a 0,15 segundos. As imagens radiográficas foram obtidas e salvas sob a extensão TIF, utilizando o próprio software fornecido pela Schick Technologies Inc., juntamente com o sistema radiográfico digital Schick CDR.

Nesse sistema, de acordo com suas especificações técnicas, a dose de radiação necessária para a sensibilização do sensor radiográfico é quantitativamente inferior ao método radiográfico tradicional, sem que

para isso a imagem gerada sofresse perdas significativas devido ao ruído. As imagens obtidas em 256 tons de cinza apresentam, em média, um ruído de 0,83% (1:120), de acordo com as especificações técnicas do próprio sistema radiográfico Schick CDR, que tem seu uso aprovado pela ADA (American Dental Association) sem restrições.

A densidade radiográfica óssea no local dos defeitos foi determinada pela análise dos tons de cinza no interior dos mesmos, em toda a área do defeito criado, ou seja, em uma área de aproximadamente 35.000 pixels, por meio do software de imagens Image Tool 2.03 (UTHSCA, San Antonio, Texas, EUA), que forneceu a média e o desvio padrão dos tons de cinza nessas regiões pré-determinadas, por meio da linha de histograma. Com o objetivo de eliminar possíveis vieses em relação à variabilidade de densidade entre uma radiografia e outra, realizou-se a relativização da densidade óssea, a partir da densidade radiográfica do padrão metálico utilizado, compensando assim pequenas variações matemáticas⁶³ (Figuras 10 e 11).

6.4 Obtenção das biópsias e processamento laboratorial

Após a realização das radiografias finais, houve o aprofundamento da anestesia geral, até a constatação da morte do animal. Foi então realizada uma incisão bicoronal no animal, removendo toda a porção superior da calvária (em bloco), incluindo tecidos moles e duros, utilizando

tesouras e alicate de corte. Esse tipo de retirada das biópsias foi escolhido por preservar totalmente as estruturas pesquisadas, desde a região preenchida pelo biomaterial, bem como a membrana de colágeno que recobre os defeitos.

As biópsias foram identificadas e fixadas em formol de Lillie (Formol tamponado a 10%)⁴⁶ por aproximadamente 72 horas, para manutenção das estruturas que se desejava avaliar. Na seqüência, as biópsias foram lavadas em água corrente, durante 24 horas, para remoção do formol e foi iniciado o processo de descalcificação das mesmas, com sua imersão em solução descalcificadora de Anna Morse (Citrato de Sódio a 20% + Ácido Fórmico a 50%)⁵⁷, trocada a cada 48 horas, durante 40 dias. Constatada a correta descalcificação das peças, as mesmas tiveram o excesso de ácido neutralizado por imersão em solução de Citrato de Sódio a 5% durante 3 dias, com trocas diárias da solução, e foram lavadas em água corrente durante 24 horas antes do início de sua desidratação, que foi feita em banhos crescentes de álcool (70º, 90º, álcool absoluto), permitindo que a peça fosse finalmente diafanizada em xilol durante 3 horas, e incluída em parafina.

Antes da inclusão em parafina, as peças foram divididas, tendo como base a região mediana do defeito criado, sendo que cada biópsia deu origem a dois blocos, um deles para ser utilizado nesta pesquisa e outro que foi guardado, no intuito de posteriormente realizarmos outras avaliações deste material. A identificação das metades foi feita

inicialmente na própria peça, e, após a inclusão, trabalhamos com aquelas peças referentes à região posterior da calvária do animal, obtendo as lâminas histológicas a partir do centro do defeito (Figuras 12 e 13).

Foram obtidos 150 cortes com 6 μm de espessura de cada peça, divididos em lâminas com 5 cortes cada, que foram coradas pela técnica da Hematoxilina-Eosina e do Tricrômico de Masson, permitindo a correta avaliação histológica das estruturas teciduais na região dos defeitos criados.

A avaliação histológica foi feita utilizando-se um microscópio de luz DIASTAR (Leica Reichert & Jung products, Alemanha), com objetivas para aumento de 4 até 100 vezes, e oculares com aumento de 10 vezes, através do qual as imagens foram observadas e avaliadas. As imagens representativas à avaliação feita foram enviadas para um microcomputador, através de uma câmera fotográfica digital Leica Microsystems DFC-300-FX (Leica Microsystems, Alemanha), com resolução de 1.3 megapíxels, acoplada ao microscópio óptico, para sua posterior utilização na descrição dos resultados obtidos.

6.5 Obtenção dos resultados e análise estatística

Os resultados radiográficos foram agrupados em Tabelas e submetidos a avaliação estatística, enquanto que todas as lâminas

histológicas foram avaliadas, e algumas fotografadas, em aumentos variados, no intuito de fornecer um laudo com as informações representativas de cada um dos grupos da pesquisa, agregado a imagens digitais que sustentem esse laudo e que sejam ilustrativas para a pesquisa.

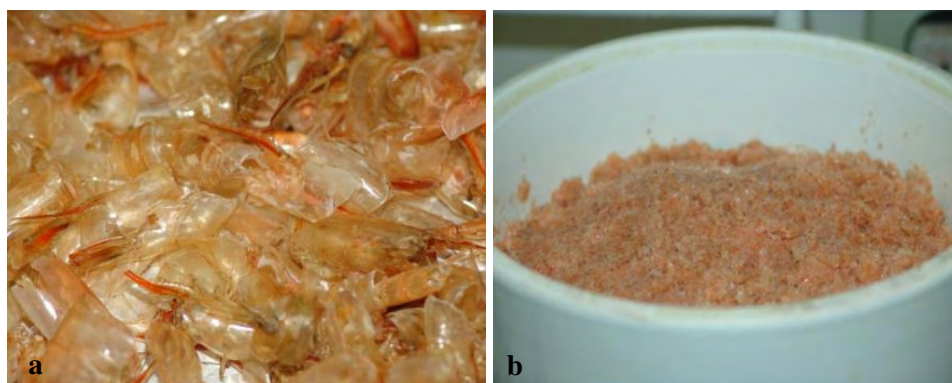


FIGURA 2 - (a) cascas de camarão higienizadas, a matéria prima para a obtenção da quitina e (b) as cascas já trituradas, prontas para ser desproteinizadas e desmineralizadas.



FIGURA 3 - (a) quitina em pó obtida durante a aplicação da metodologia e (b) quitosana em pó obtida a partir da quitina.

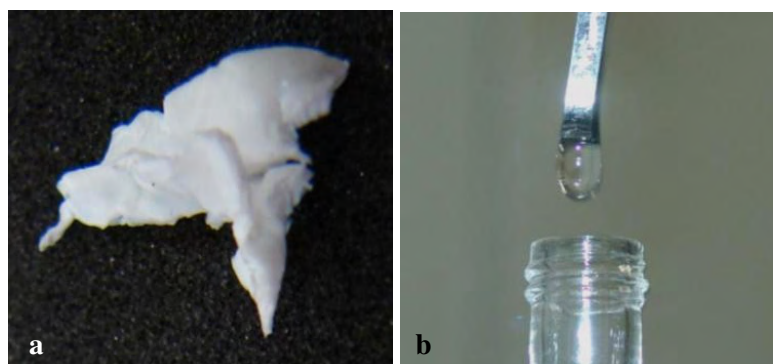


FIGURA 4 - (a) Cloridrato de quitosana, após a liofilização e (b) gel de quitosana obtido, macroscopicamente igual ao de cloridrato de quitosana.

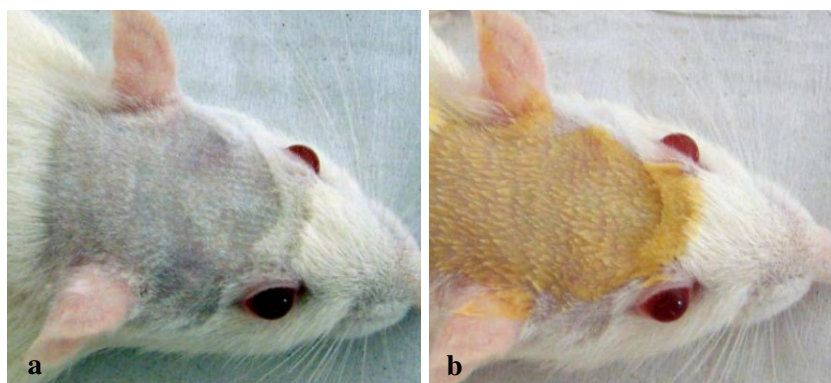


FIGURA 5 - Região do procedimento cirúrgico, após tricotomia, antes (a) e após anti-sepsia com Povidine.



FIGURA 6 - (a) instrumental utilizado para a cirurgia, montado em mesa cirúrgica e (b) detalhe da broca trefina utilizada para a criação dos defeitos ósseos.

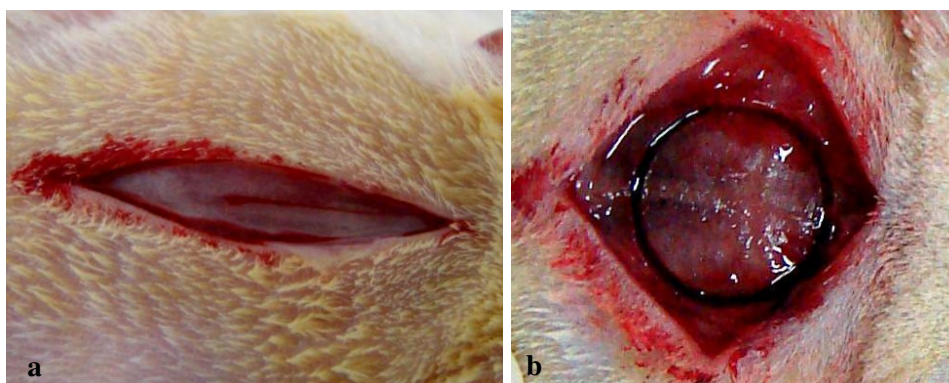


FIGURA 7 - (a) incisão feita, visando à exposição da região para criação do defeito ósseo e (b) criação do defeito ósseo, com 8 mm de diâmetro.

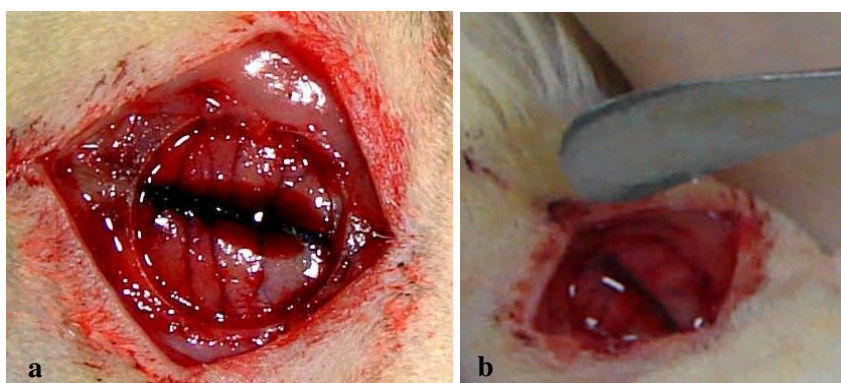


FIGURA 8 - (a) defeito criado, com a preservação da dura-máter e (b) gel sendo aplicado cuidadosamente sobre o defeito, preenchendo-o por completo, sem extravasamento.

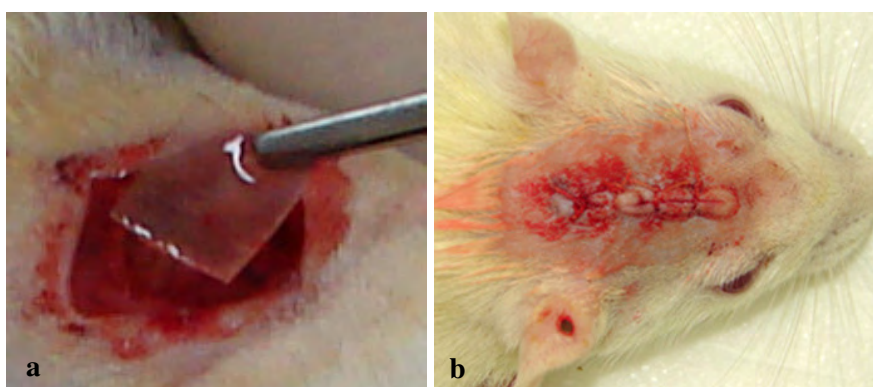


FIGURA 9 - (a) recobrimento do defeito com membrana de colágeno e (b) sutura em planos já realizada, com completa coaptação dos bordos.



FIGURA 10 - (a) sensor radiográfico digital utilizado e (b) sensor acoplado paralelamente ao plano horizontal, dentro de caixa especial. A perpendicularidade sensor/feixe de raios-X foi sempre mantida.

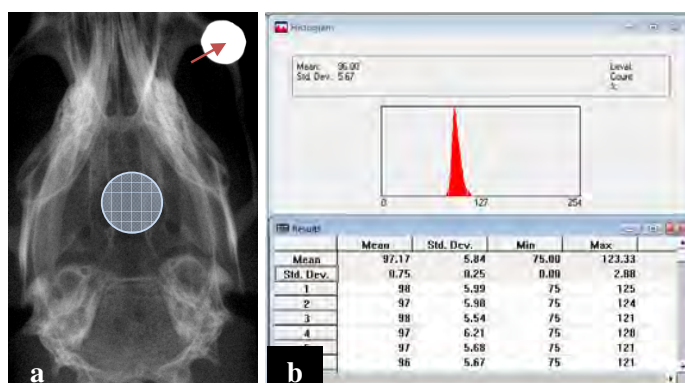


FIGURA 11 - (a) imagem radiográfica obtida, com defeito delimitado, a seta marca a região de padronização e (b) interface do software de cálculo da densidade radiográfica.

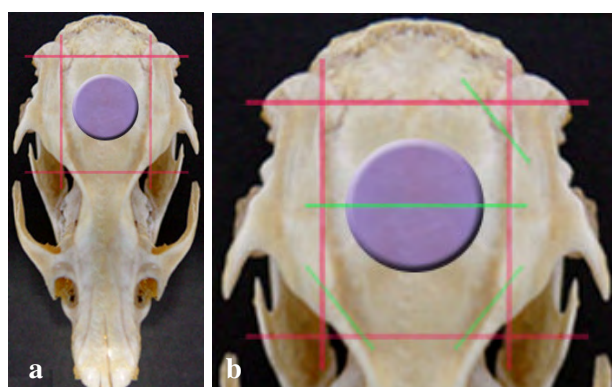


FIGURA 12 - (a) crânio seco de rato com área da biópsia delimitada e (b) marcações das regiões do corte da biópsia, para identificação.

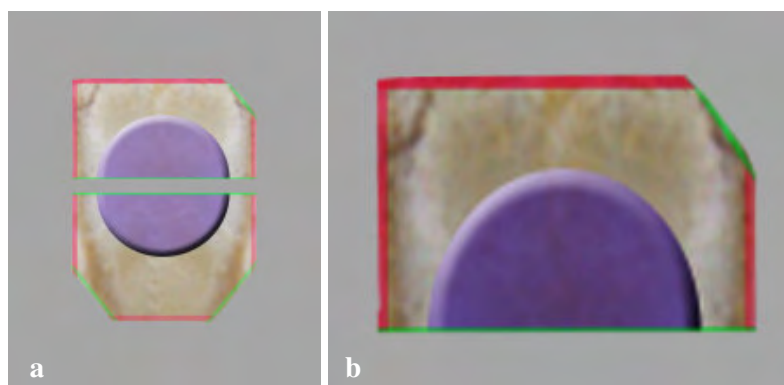


FIGURA 13 - (a) diagrama exemplificando a maneira como as biópsias foram reduzidas. Os blocos utilizados na pesquisa correspondem à região posterior da calvária dos animais (b).

7 RESULTADO

Os resultados deste trabalho estão expostos de maneira separada, com finalidade didática, da seguinte maneira: primeiramente os resultados da avaliação radiográfica, incluindo as comparações estatísticas entre os grupos do estudo, e na seqüência os resultados histológicos, subdivididos de acordo com os grupos e períodos estudados, obtidos pela análise seriada das lâminas com diferentes colorações histológicas: Hematoxilina-Eosina e Tricrômico de Masson, através do microscópio de luz convencional.

7.1 Resultados radiográficos

Em primeiro lugar é apresentada a Tabela 2, aonde é possível inferir as diferenças estatísticas entre cada um dos grupos estudados. Um quadro com os dados brutos obtidos na avaliação da densidade radiográfica em cada um dos animais encontra-se no Anexo 2.

Na seqüência apresentamos o Gráfico 1, representando os valores demonstrados na Tabela 2, e que permite a comparação visual entre a densidade radiográfica obtida nos diferentes grupos e períodos da pesquisa, nos momentos inicial e final.

Os resultados obtidos nesta parte do estudo indicam que, na avaliação feita no período de 15 dias, tanto o grupo controle como todos os grupos em que foram utilizados biomateriais no preenchimento do defeito, com exceção do gel de quitosana de baixo peso molecular,

apresentaram aumento estatisticamente significativo da densidade óssea radiográfica na região do defeito, ao compararmos as imagens radiográficas iniciais e finais. Levando-se em conta apenas os valores obtidos nas radiografias finais desse período, em comparação ao grupo controle, percebe-se que nos grupos nos quais foram utilizados biomateriais para o preenchimento do defeito os valores obtidos foram menores, com o resultado do grupo em que foi usado gel de cloridrato de quitosana de baixo peso molecular sendo o único aonde essa diferença foi estatisticamente significativa.

No período de 60 dias essa tendência de resultados modificou-se, já que, ao compararmos a imagem radiográfica final com a inicial, apenas nos grupos controle e gel de quitosana de baixo peso molecular houve aumento significativo da densidade óssea radiográfica na região do defeito. Nos demais grupos esse valor diminuiu, porém sem diferença significativa. Ao compararmos apenas os valores da imagem radiográfica final, percebe-se que o grupo controle apresentou os maiores resultados, e que essa diferença foi estatisticamente significativa quando comparada aos grupos aonde foi utilizado gel de quitosana de alto peso molecular e gel de cloridrato de quitosana de alto e de baixo peso molecular.

Tabela 2 - Valores relativizados e desvio padrão da densidade radiográfica na área dos defeitos criados, de acordo com os grupos e períodos, no momento inicial e final

Grupos	Períodos			
	15 dias - Inicial	15 dias - Final	60 dias - Inicial	60 dias - Final
Quit. BP	0.301 ± 0.055	0.341 ± 0.083	0.260 ± 0.015	0.340 ± 0.031 ^b
Quit. AP	0.251 ± 0.028	0.341 ± 0.082 ^b	0.296 ± 0.055	0.285 ± 0.048 ^c
Clor. BP	0.233 ± 0.023	0.302 ± 0.011 ^{bd}	0.260 ± 0.029	0.228 ± 0.048 ^d
Clor. AP	0.301 ± 0.046	0.377 ± 0.052 ^b	0.293 ± 0.032	0.276 ± 0.097 ^c
Controle	0.249 ± 0.019	0.400 ± 0.025 ^a	0.220 ± 0.022	0.353 ± 0.015 ^a

(a) Diferença entre a densidade radiográfica inicial e final, no mesmo grupo e período, $p < 0.001$ e (b) $p < 0.05$ – ANOVA – teste t. (c) Diferença para a densidade radiográfica final em relação ao grupo controle de mesmo período, $p < 0.001$ e (d) $p < 0.05$ – ANOVA – teste t. Quit. – Quitosana, Clor. – Cloridrato de Quitosana, BP – Baixo peso molecular, AP – Alto peso molecular.

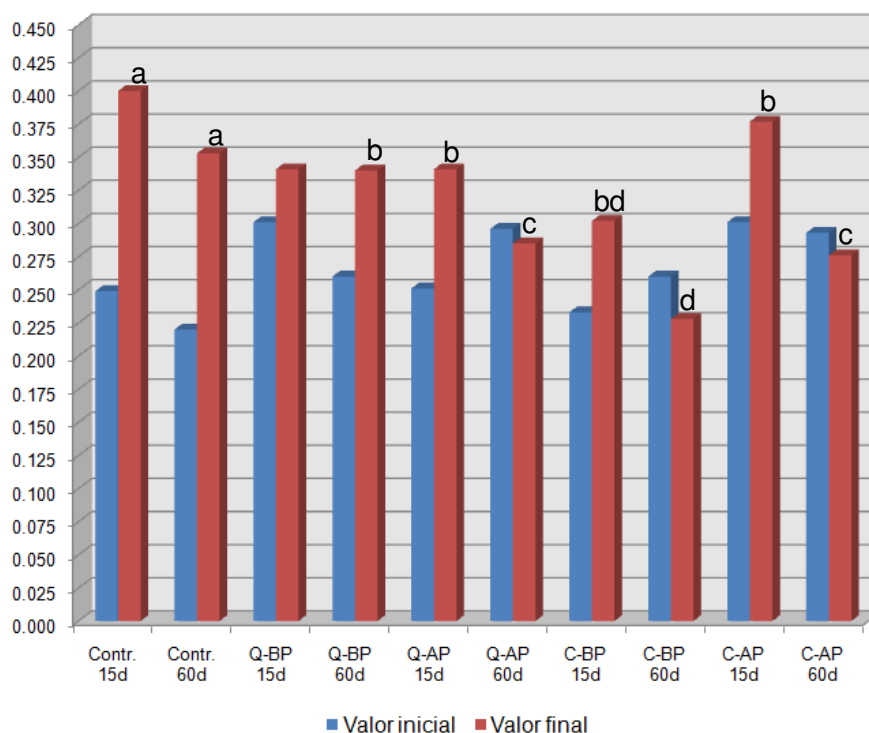


GRÁFICO 1 - Valores relativizados da densidade radiográfica na área dos defeitos criados, de acordo com os grupos e períodos, no momento inicial e final. AP – Alto peso molecular, BP – Baixo peso molecular, Contr. – Controle, Q – Quitosana, C – Cloridrato de quitosana. (a) Diferença entre a densidade radiográfica inicial e final, no mesmo grupo e período, $p < 0.001$ e (b) $p < 0.05$ – ANOVA – Teste t. (c) Diferença para a densidade radiográfica final em relação ao grupo controle de mesmo período, $p < 0.001$ e (d) $p < 0.05$ – ANOVA – Teste t.

7.2 Resultados histológicos

Os resultados histológicos serão apresentados de acordo com os grupos e períodos estudados na pesquisa.

7.2.1 Grupo controle negativo

Aos 15 dias, foi observa-se, na região correspondente ao defeito, extensa área ocupada por tecido conjuntivo fibroso desorganizado e de densidade variável, envolvendo tecido com predomínio de células inflamatórias (principalmente macrófagos) e vasos sanguíneos apresentando estase celular. A membrana de colágeno utilizada para recobrimento do defeito apresentava-se em fase inicial de reabsorção e a neoformação óssea se limitava às regiões próximas as bordas do defeito, destacando-se, próxima à linha de reversão, pequena área de formação de osso trabecular.

Para o período de 60 dias foi observada evolução do quadro anterior, com aumento da organização do tecido conjuntivo fibroso, agora denso, e diminuição do infiltrado inflamatório. Os vasos sanguíneos continuavam a apresentar estase celular. A membrana de colágeno apresentava-se em avançado estado de reabsorção. Neoformação óssea foi observada apenas nas regiões próximas as bordas do defeito.

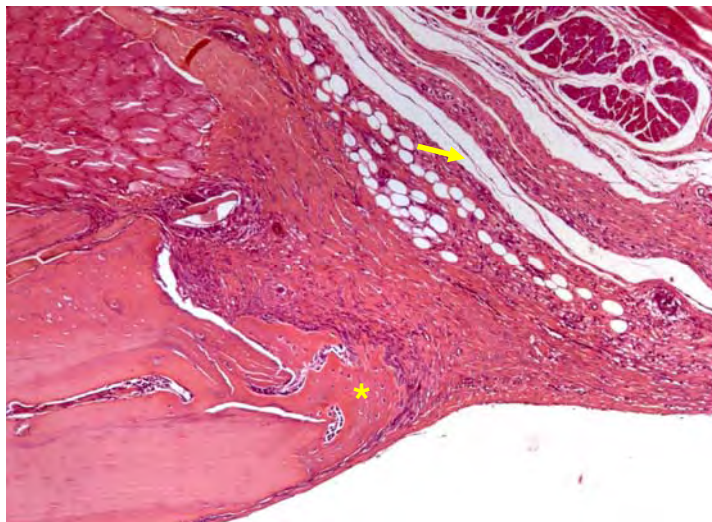


FIGURA 14 - Período de 15 dias evidenciando região da borda do defeito ósseo criado. (*) região de neoformação óssea, (→) membrana de colágeno em processo de reabsorção (100x, HE).

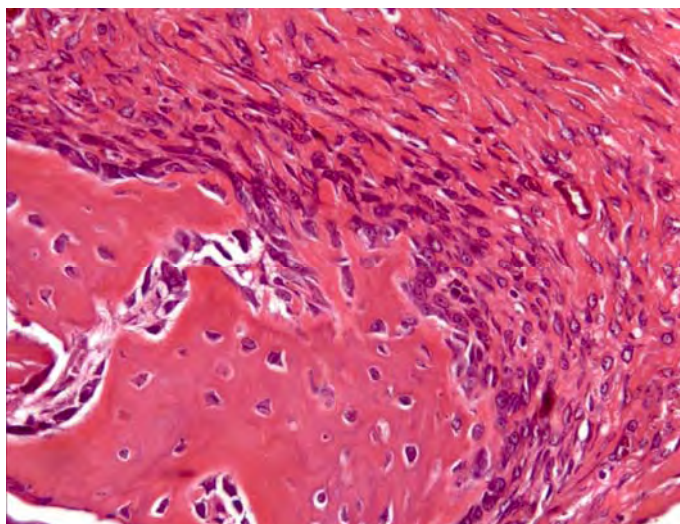


FIGURA 15 - Período de 15 dias evidenciando região da borda do defeito ósseo criado em maior aumento. Atentar para o tecido conjuntivo altamente celularizado e com densidade colágena variada (400x, HE).

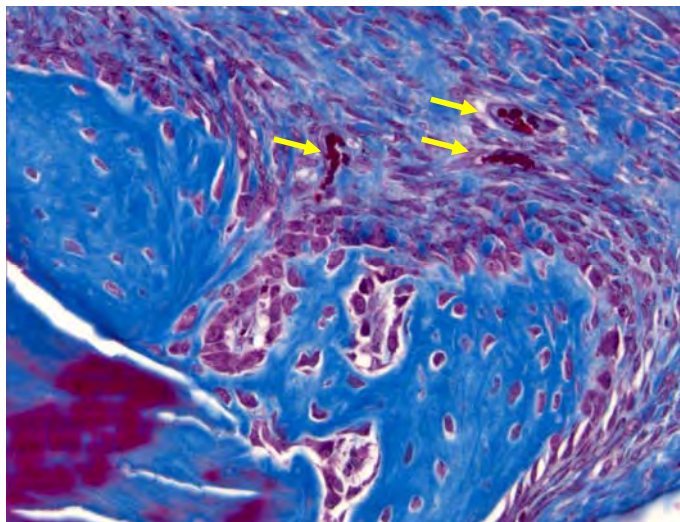


FIGURA 16 - Período de 15 dias evidenciando região da borda do defeito ósseo criado. Vasos sanguíneos com estase vascular (→) no tecido conjuntivo altamente celularizado (400x, Tricrômico de Masson).

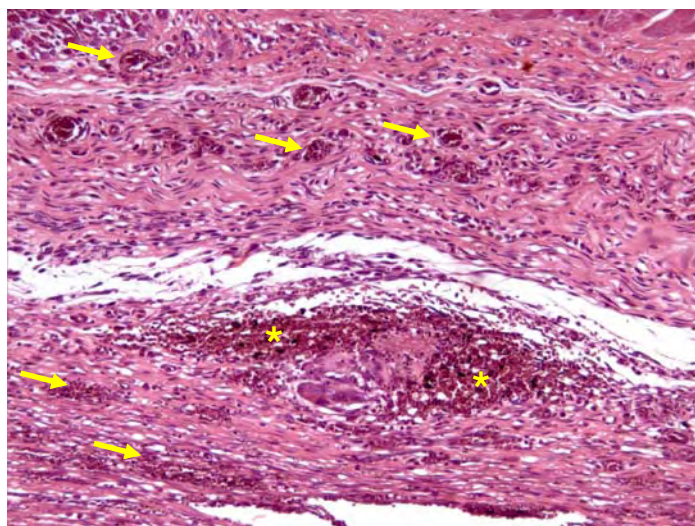


FIGURA 17 - Período de 15 dias evidenciando região central do defeito. Atentar para os vasos sanguíneos com estase vascular (→) e região com denso infiltrado inflamatório (*) (200x, HE).

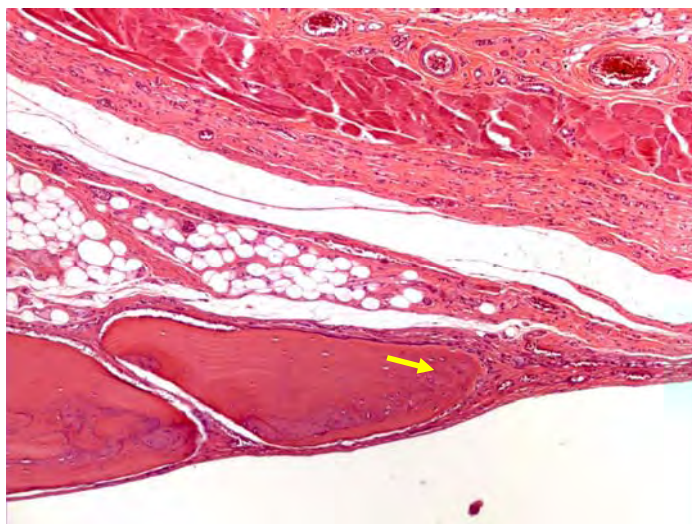


FIGURA 18 - Período de 60 dias demonstrando redução do infiltrado celular em relação ao período inicial. A seta (→) demarca a pequena quantidade de osso neoformado nas bordas do defeito (100x, HE).

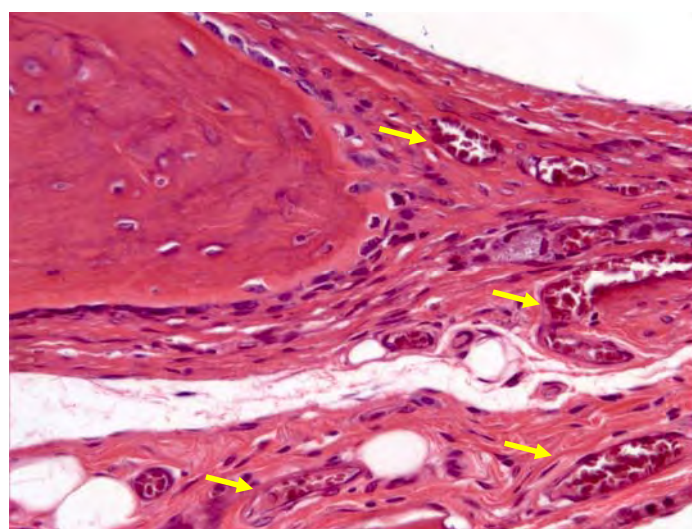


FIGURA 19 – Mesmo campo anterior em maior aumento. Atentar para o conteúdo inflamatório discreto, e grande número de vasos sanguíneos (→) ao redor do osso neoformado nas bordas do defeito (400x, HE).

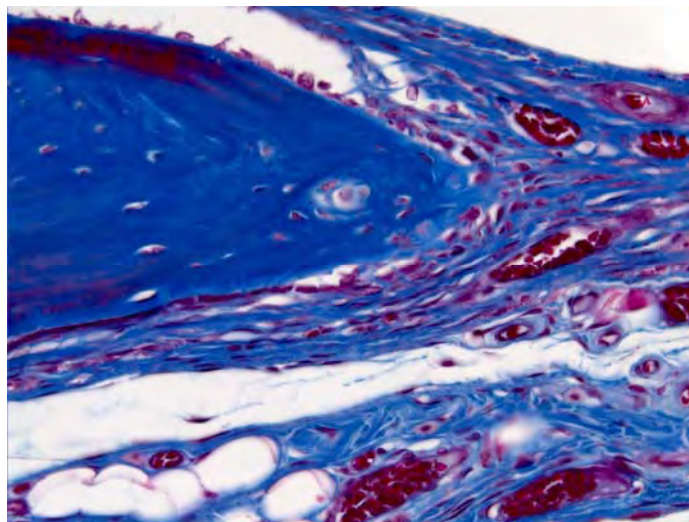


FIGURA 20 - Mesma região anterior, em outra coloração. Notar a densidade colágena aumentada e o reduzido número de células inflamatórias nas bordas do defeito (400x, Tricrômico de Masson).

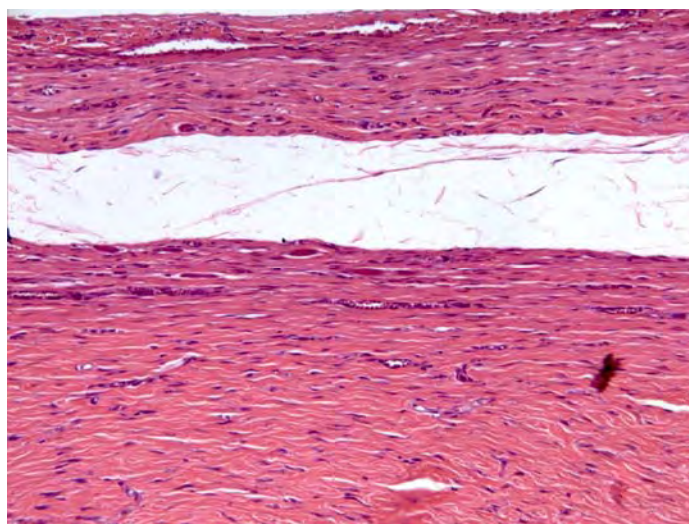


FIGURA 21 - Região central do defeito para o período de 60 dias O tecido conjuntivo é fibroso e denso, muito organizado e com reduzido conteúdo inflamatório (200x, HE).

7.2.2 Grupo Quitosana de baixo peso molecular

Para o grupo que teve o defeito ósseo preenchido com gel de quitosana de baixo peso molecular, no período de 15 dias foi observado um extenso infiltrado inflamatório agudo, constituído principalmente por células polimorfonucleares, entremeado a um tecido conjuntivo desorganizado e de densidade colágena variável.

Os vasos sanguíneos apresentam estase celular avançada. Além disso, algumas áreas necróticas de tecido conjuntivo puderam ser observadas, com a percepção de algumas células gigantes, e a formação óssea foi muito discreta e restrita às margens do defeito. Pequenos fragmentos da membrana de colágeno podem ser observados, mas sem continuidade.

Aos 60 dias o quadro anterior apresentava-se com maior maturação, sendo observado na área correspondente ao defeito um infiltrado inflamatório crônico, incluído em área de tecido conjuntivo fibroso denso, variavelmente organizado, envolvendo área com predomínio de macrófagos, e vasos sanguíneos estasiados. Áreas necróticas puderam ser observadas, com formação óssea diminuta, restrita às margens do defeito.

Em ambos os períodos não foram observados remanescentes do biomaterial utilizado para o preenchimento dos defeitos.

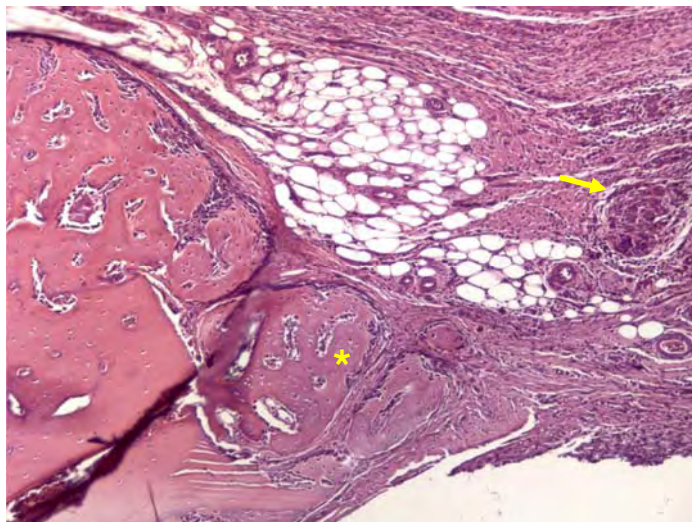


FIGURA 22 - Período de 15 dias, mostrando a região da borda do defeito ósseo. (*) região aonde houve neoformação óssea, (→) infiltrado inflamatório agudo (100x, HE).

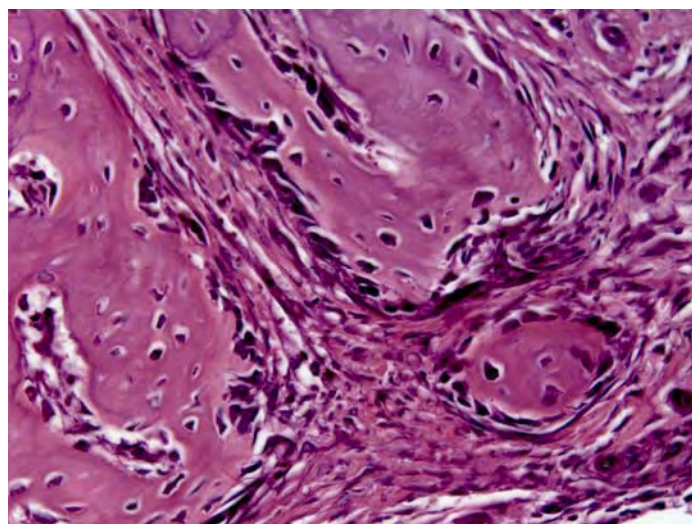


FIGURA 23 - Quadro anterior em maior aumento. Atentar para o moderado conteúdo de células inflamatórias próximas a borda do defeito, no tecido conjuntivo (400x, HE).

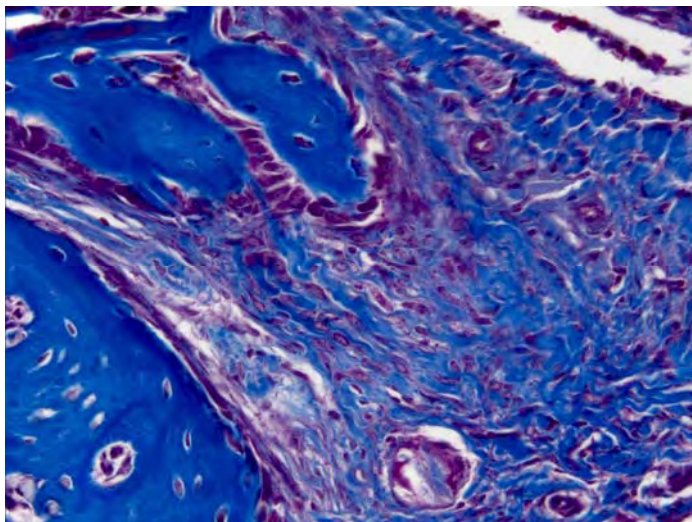


FIGURA 24 - Em outra coloração, o mesmo quadro da foto anterior. Atentar para a organização colágena variável e pequena formação óssea (400x, Tricrômico de Masson).

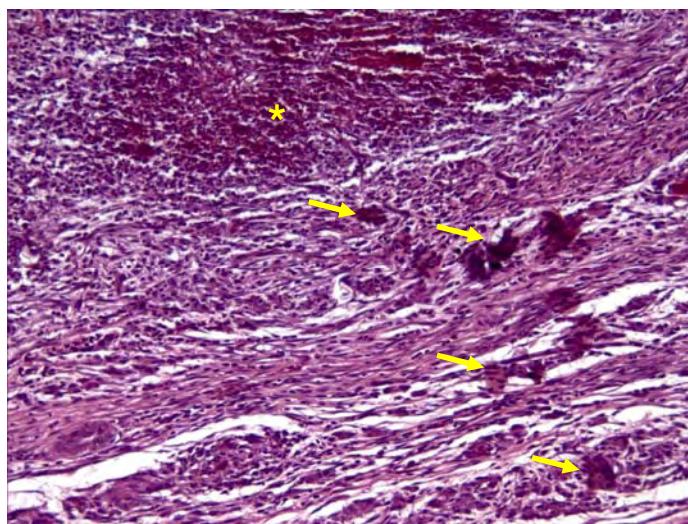


FIGURA 25 - No período de 15 dias, na região central do defeito, podemos ver região com intenso infiltrado inflamatório (*) e algumas células gigantes (→) (200x, HE).

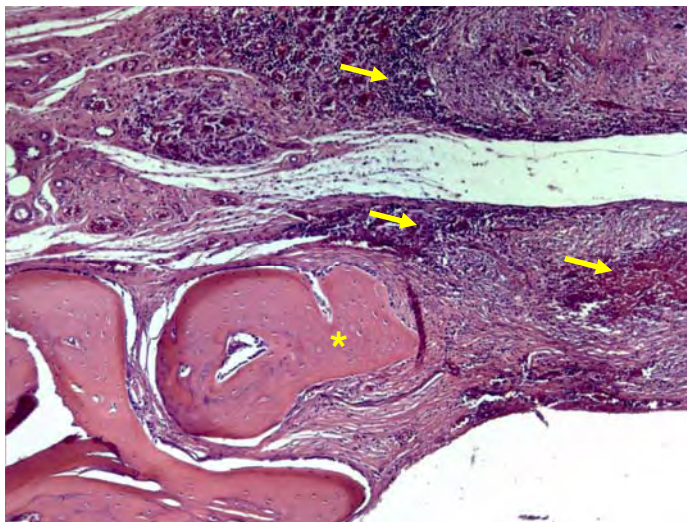


FIGURA 26 – Nas biópsias do período de 60 dias, podemos ver pequena formação óssea (*), porém o tecido conjuntivo encontra-se com intenso infiltrado inflamatório (→), com áreas necróticas (100x, HE).

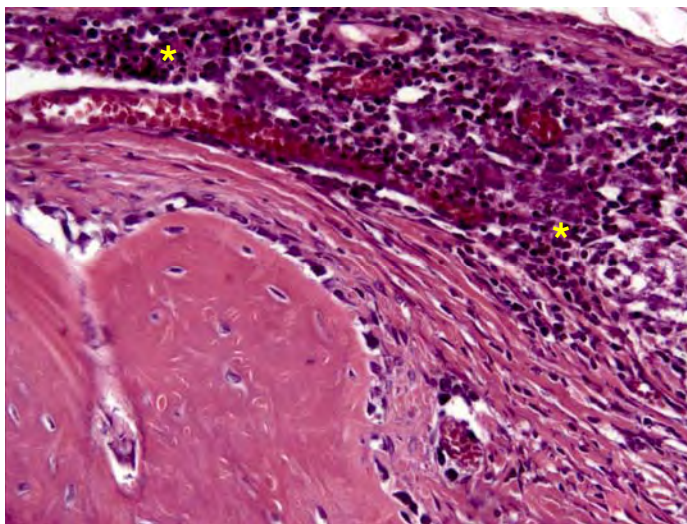


FIGURA 27 - Maior aumento do quadro anterior, demonstrando o elevado conteúdo inflamatório (*) do tecido conjuntivo próximo ao osso neoformado (400x, HE).

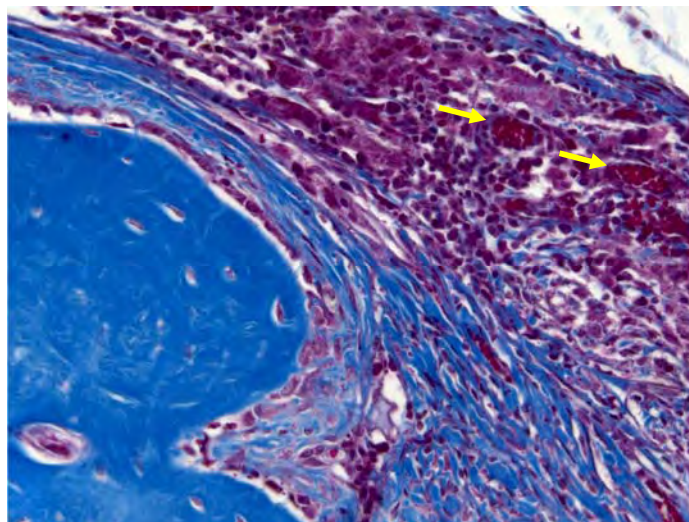


FIGURA 28 - Mesmo campo, porém em outra coloração. Notar conteúdo celular elevado do tecido conjuntivo, com vasos estasiados (→) (400x, Tricrômico de Masson).

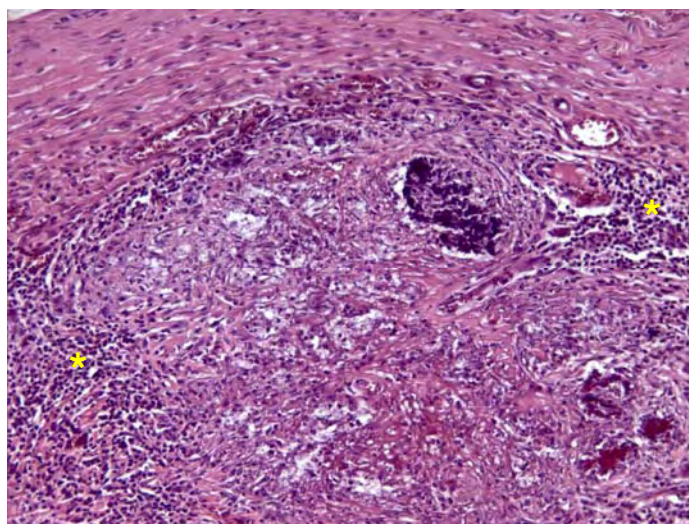


FIGURA 29 - Finalizando o período de 60 dias deste grupo, na região central do defeito, regiões de tecido conjuntivo fibroso denso, variavelmente organizado com intenso infiltrado inflamatório (*) (200x, HE).

7.2.3 Grupo Quitosana de alto peso molecular

Quando o material utilizado para o preenchimento dos defeitos ósseos foi o gel de quitosana de alto peso molecular, aos 15 dias observou-se presença de tecido conjuntivo com densidade colágena variável preenchendo toda a área do defeito, onde se destacou próximo a borda do defeito criada pequena área de formação de osso trabecular.

Infiltrado inflamatório crônico moderado estava presente, composto principalmente por macrófagos, sendo que podiam ser observadas áreas nas quais a concentração de macrófagos era extensa, causando necrose tecidual, observada pontualmente. Estase vascular pôde ser observada em toda a área do defeito.

Para o período de 60 dias pode-se observar a evolução do quadro acima, com a diferença de que o quadro inflamatório apresentava-se em estado de resolução ainda inicial, com diminuição das áreas de necrose tecidual. Além do tecido ósseo formado nas bordas do defeito criado, focos com maior organização de tecido conjuntivo, com potencial de organização para formação de centros de ossificação, ainda em período inicial, são notados em meio ao tecido conjuntivo fibroso ricamente celularizado que preenchia a maior parte do defeito.

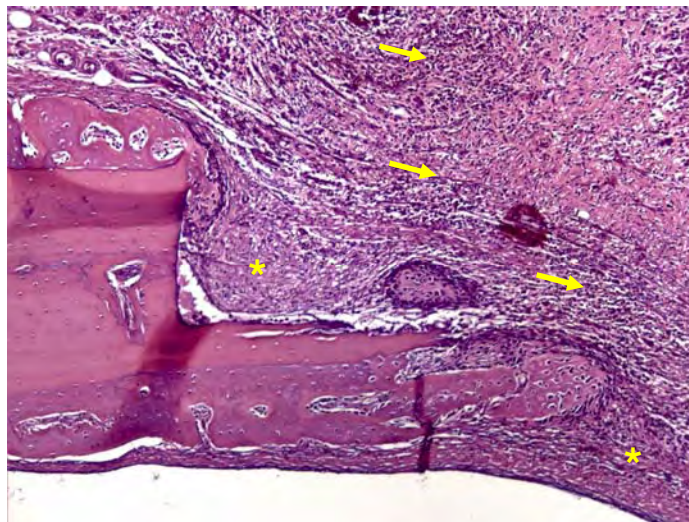


FIGURA 30 - Período de 15 dias, focando região da borda do defeito ósseo. Pode-se ver tecido conjuntivo com densidade colágena variável (*) e infiltrado inflamatório crônico (→) (100x, HE).

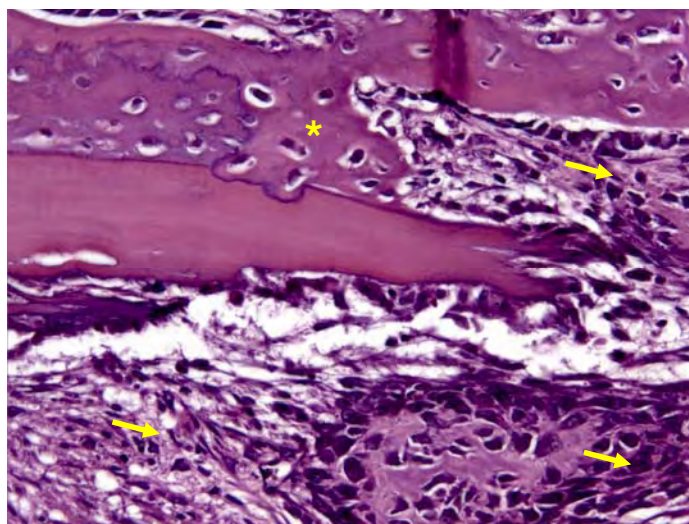


FIGURA 31 - Em um maior aumento do quadro anterior pode-se ver pequena área de neoformação óssea (*) e tecido conjuntivo altamente celularizado, com infiltrado inflamatório (→) (400x, HE)

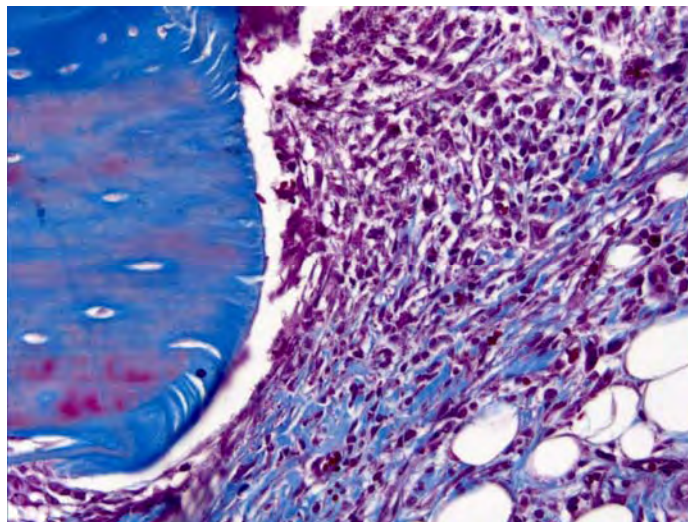


FIGURA 32 – Fotomicrografia do campo anterior, outra coloração, permitindo ver o conteúdo colágeno variável no tecido altamente infiltrado por células inflamatórias (400x, Tricrômico de Masson).

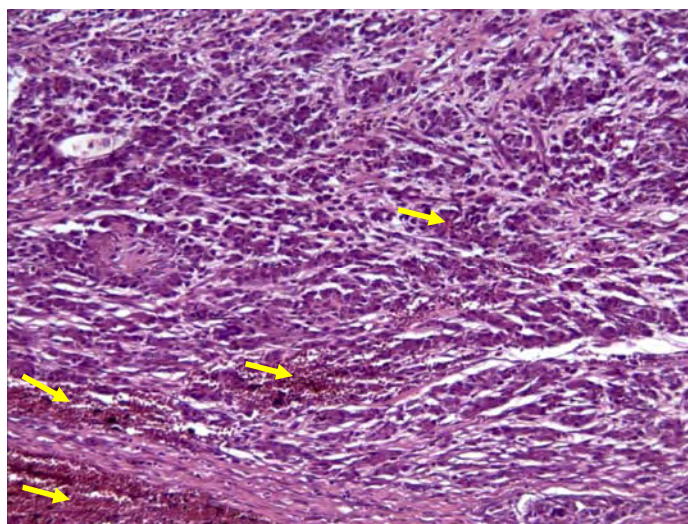


FIGURA 33 - Centro do defeito no grupo de 15 dias. A estase vascular é visível pontualmente (→), e o infiltrado inflamatório é rico em macrófagos (200x, HE).

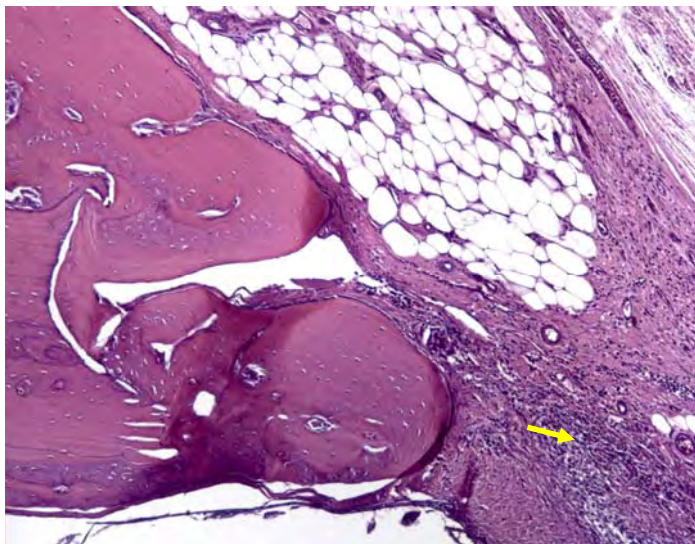


FIGURA 34 - Período de 60 dias, evidenciando a borda do defeito ósseo. Evolução do quadro observado aos 15 dias, porém ainda com infiltrado inflamatório crônico extenso (→) (100x, HE).

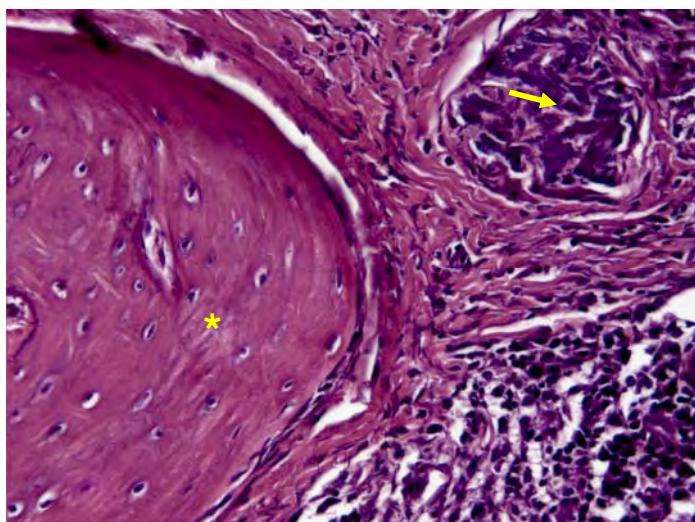


FIGURA 35 - Maior aumento do campo anterior. Apesar de osso neoformado próximo a margem do defeito (*), vê-se infiltrado inflamatório crônico extenso, com áreas de necrose (→) (400x, HE).

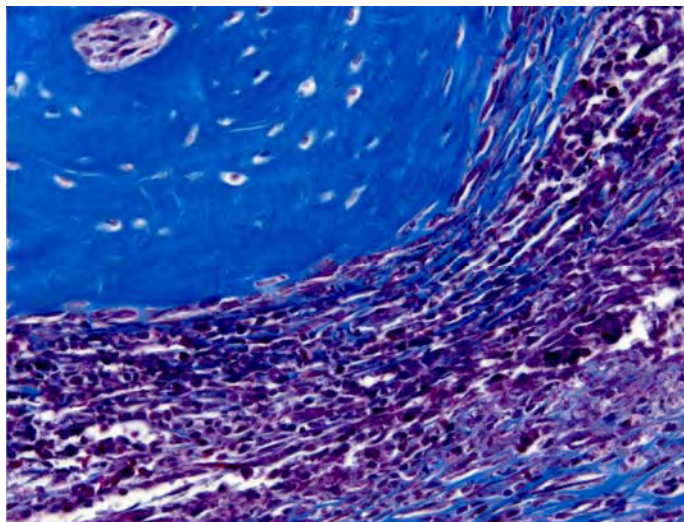


FIGURA 36 – Mesmo campo em outra coloração. Atentar para o pouco conteúdo fibroso e alto conteúdo celular do tecido conjuntivo (400x, Tricrômico de Masson).

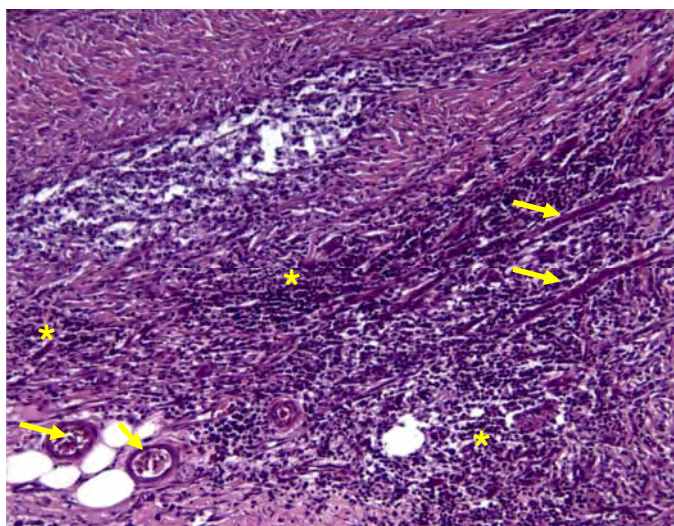


FIGURA 37 - Centro do defeito aos 60 dias, evidenciando região com infiltrado inflamatório crônico extenso (*), e estase celular (→) (200x, HE).

7.2.4 Grupo Cloridrato de Quitosana de baixo peso molecular

Em relação ao grupo que teve os defeitos tratados com gel de cloridrato de quitosana de baixo peso molecular, podemos notar aos 15 dias reduzida área de neoformação óssea restrita as margens do defeito criado. Tecido conjuntivo com densidade colágena variável, e rico em células inflamatórias pode ser visto, e nessas regiões há o predomínio de macrófagos.

Na região central do defeito o quadro é bem semelhante, com intenso quadro inflamatório. A estase celular também está presente. Não foram encontrados resquícios do biomaterial.

Para o período de 60 dias, observa-se evolução significativa do quadro inflamatório na região próxima à borda do defeito, com aumento do conteúdo colagenoso do tecido, embora sem que haja aumento no volume de osso neoformado. A estase celular continua presente.

Na região central do defeito ainda pode ser observado quadro de infiltrado inflamatório crônico moderado com áreas de extensa concentração de macrófagos e necrose tecidual. A área mais interna do defeito apresentava tecido conjuntivo melhor organizado, com diminuição do conteúdo celular e aumento do conteúdo de colágeno.

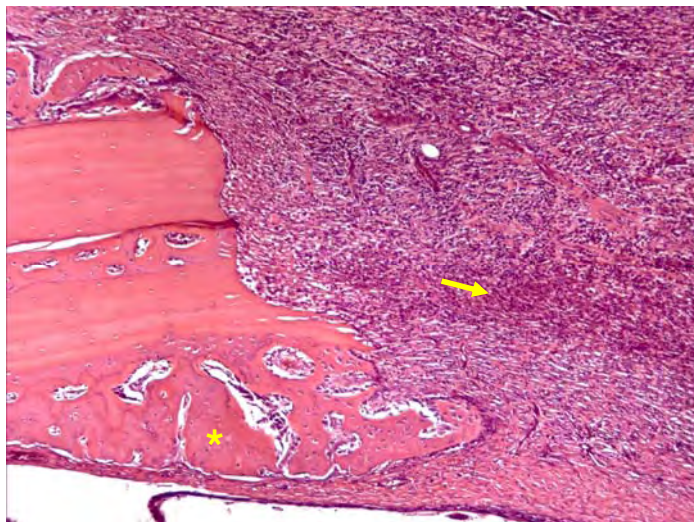


FIGURA 38 - Imagem do período de 15 dias, mostrando área de neoformação óssea restrita às margens do defeito criado (*). Tecido conjuntivo com densidade colágena variável, e rico em células inflamatórias também pode ser visto (100x, HE).

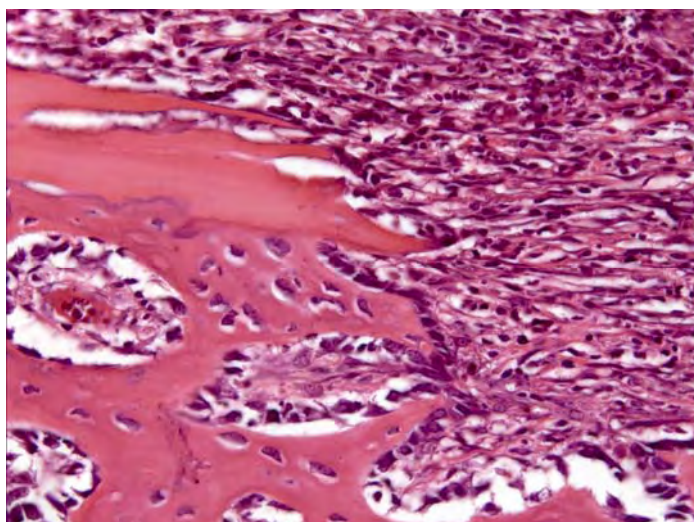


FIGURA 39 - Em maior aumento, o infiltrado inflamatório ao redor do osso neoformado fica mais visível (400x, HE).

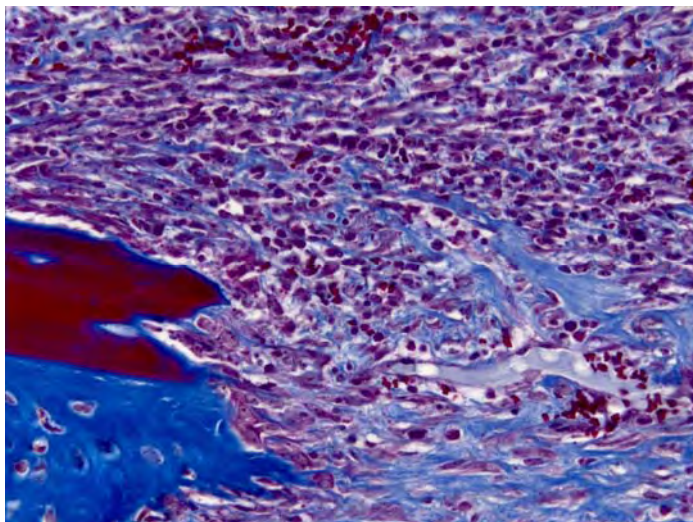


FIGURA 40 - No mesmo campo, em outra coloração, pode-se ver o conteúdo celular elevado em relação ao conteúdo fibroso, no interior do defeito (400x, Tricrômico de Masson).

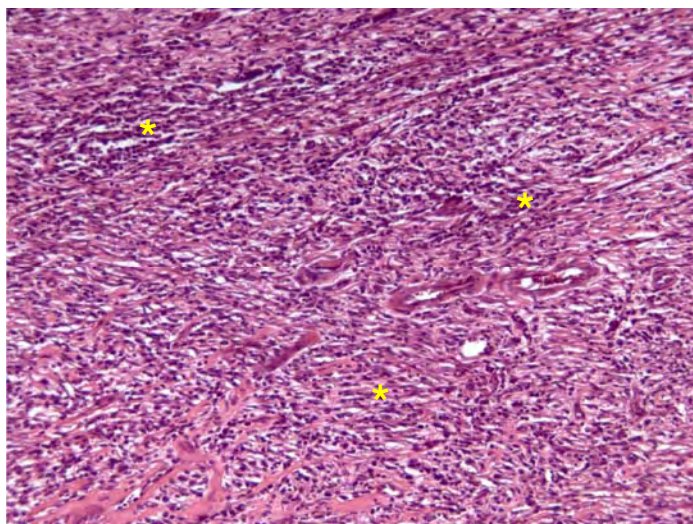


FIGURA 41 - No centro do defeito do período de 15 dias pode ser visto com intenso quadro inflamatório (*), com pontos de estase celular (200x, HE).

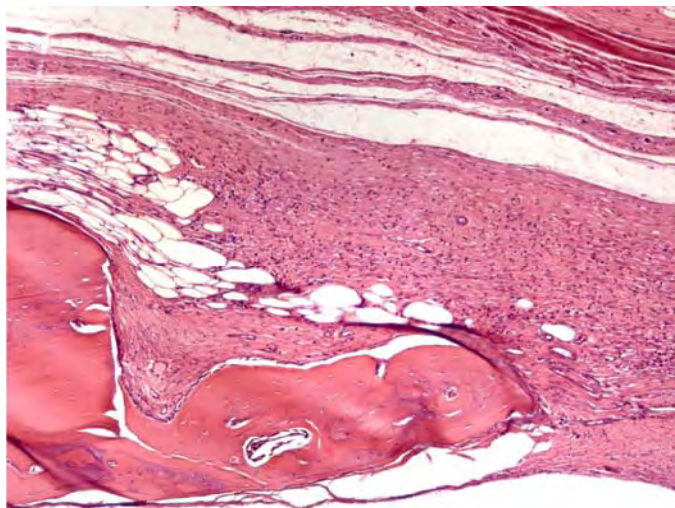


FIGURA 42 - Evolução significativa do quadro inflamatório no período de 60 dias, na região próxima à borda do defeito, com elevação do conteúdo colagenoso do tecido (100x, HE).

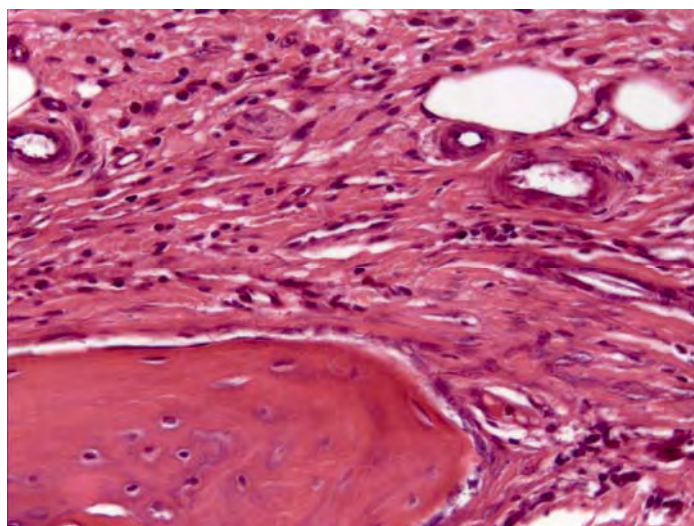


FIGURA 43 - Atentar para o maior aumento da situação anterior, evidenciando o reduzido conteúdo inflamatório e moderada organização do colágeno (400x, HE).

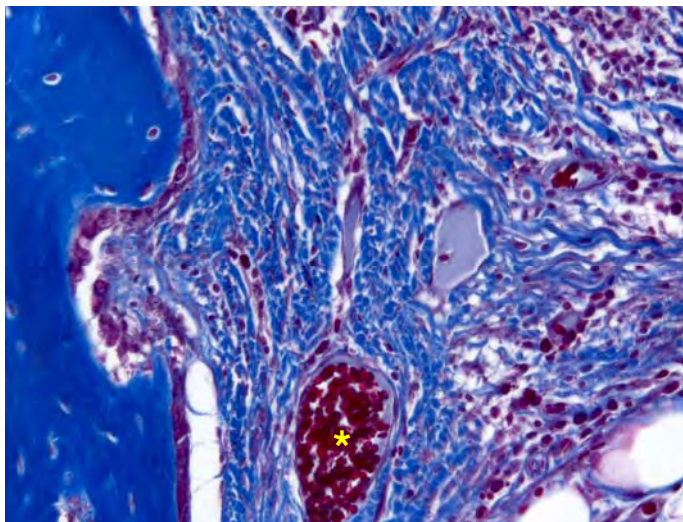


FIGURA 44 - Outra coloração do campo anterior, deixando claro o aumento do volume e da organização do colágeno em relação ao período inicial. Pouca estase celular é vista (*) (400x, HE).

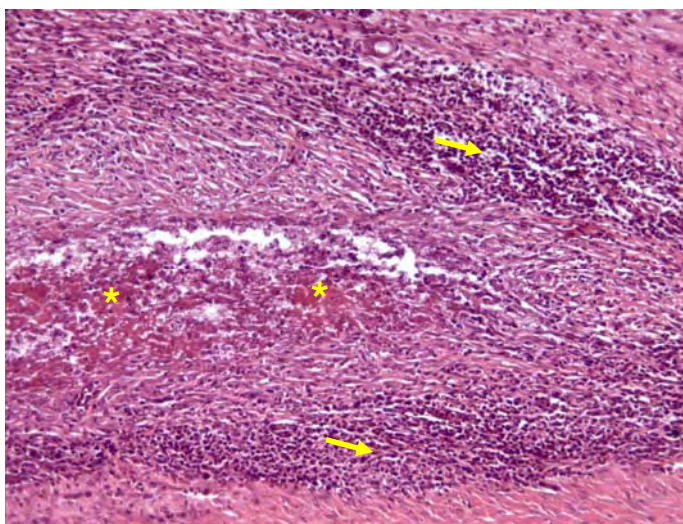


FIGURA 45 - A região central do defeito mostra evolução reduzida, com a manutenção do infiltrado inflamatório crônico (→) e áreas necróticas (*) (200x, HE).

7.2.5 Grupo Cloridrato de Quitosana de alto peso molecular

Quando foi utilizado o gel de cloridrato de quitosana de alto peso molecular como biomaterial para preenchimento dos defeitos ósseos criados, observa-se aos 15 dias que pouco osso se formou próximo à margem do defeito, e que este está quase que totalmente preenchido por tecido conjuntivo de densidade variável altamente celularizado, com exuberante infiltrado inflamatório podendo ser observado.

Em alguns locais, necrose tecidual em fase inicial pode ser observada, sendo que na região central do defeito esse quadro é mais avançado, com muitos macrófagos no tecido conjuntivo.

Aos 60 dias o que se nota é que este quadro não apresentou evolução, pois ao redor da diminuta quantia de osso que se formou próximo as margens do defeito, se observa um infiltrado inflamatório crônico, com o tecido conjuntivo rico em células, principalmente macrófagos, agrupados pontualmente em algumas regiões.

No centro do defeito essa situação é mantida, embora focos necróticos, ao contrário do que se observou no grupo de 15 dias, não são vistos.

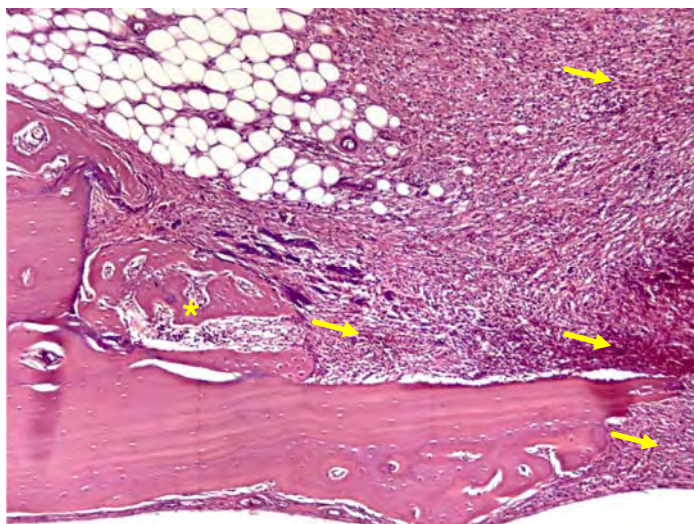


FIGURA 46 - Aos 15 dias podemos observar pouco osso neoformado (*) e o defeito preenchido por tecido conjuntivo de densidade variável, com exuberante infiltrado inflamatório (→) (100x, HE).

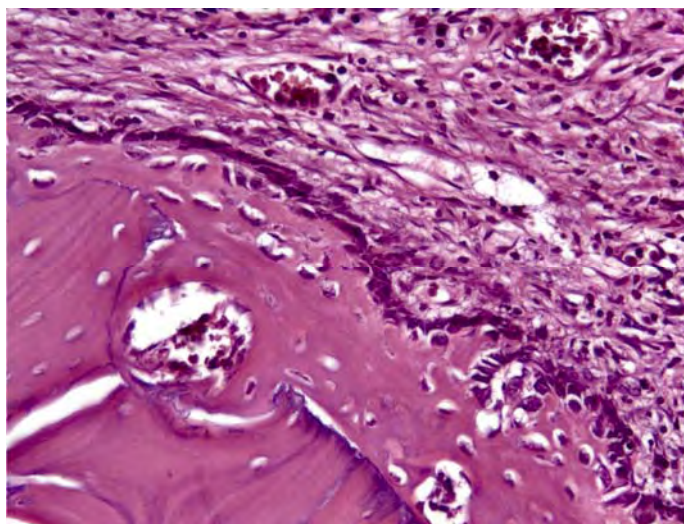


FIGURA 47 - Em um maior aumento do campo anterior, observa-se o infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo próximo ao osso neoformado (400x, HE).

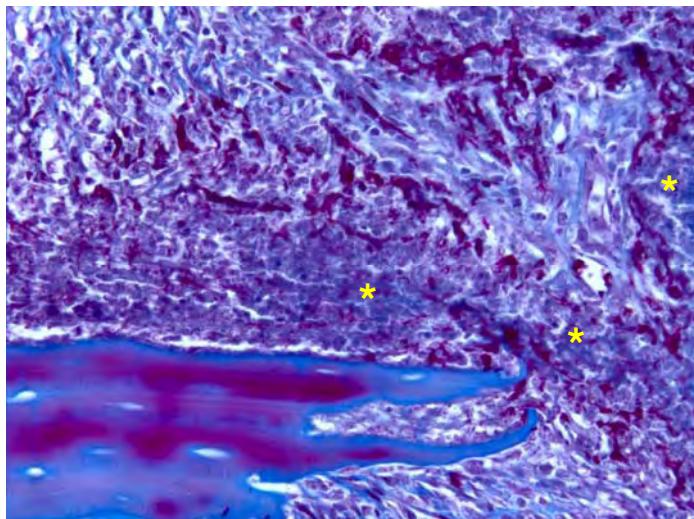


FIGURA 48 – No mesmo campo, em outra coloração, percebe-se a degradação celular no interior do tecido conjuntivo (*), com áreas iniciais de necrose tecidual (400x, Tricrômico de Masson).

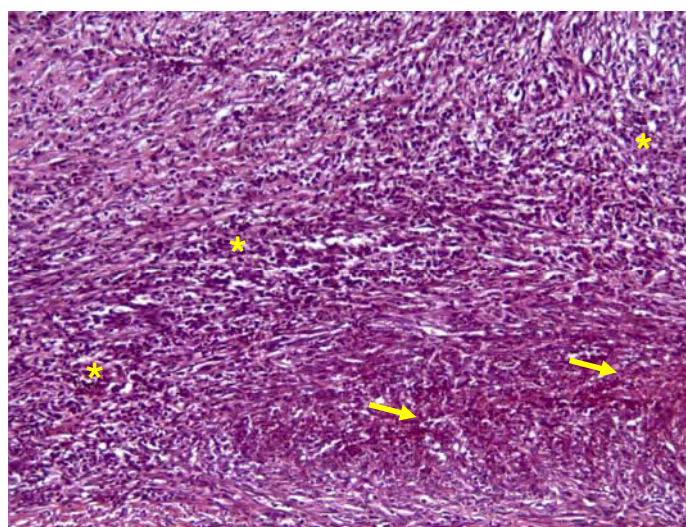


FIGURA 49 - A região central do defeito apresenta infiltrado inflamatório rico em células (*), principalmente macrófagos, e pontos iniciais de necrose tecidual (→) (200x, HE).

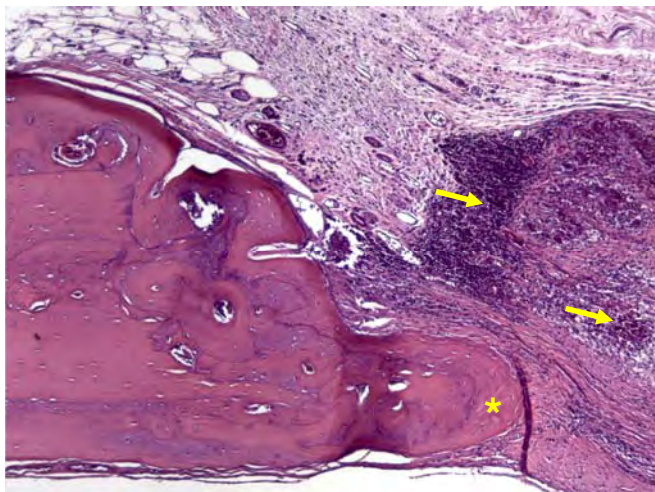


FIGURA 50 - No grupo de 60 dias pode-se ver diminuta quantia de osso neoformado (*) e infiltrado inflamatório crônico (→) ocupando o tecido conjuntivo que preenche o defeito (100x, HE).

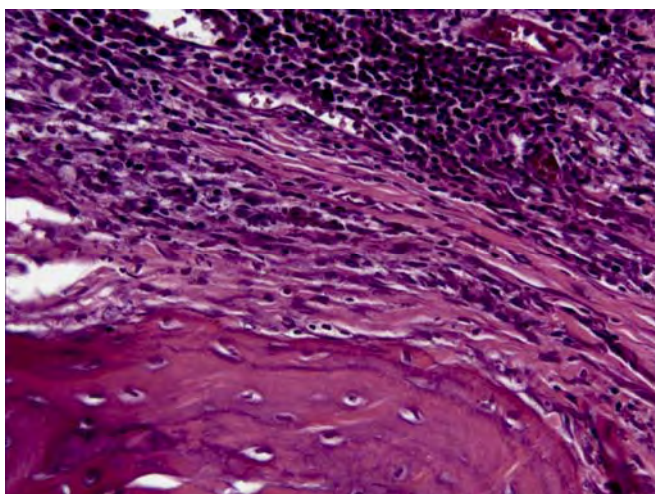


FIGURA 51 - Esse infiltrado inflamatório pode ser mais bem visto em maior aumento, bem como o pequeno conteúdo colagenoso do tecido, rico em células ao redor do osso neoformado (400x, HE).

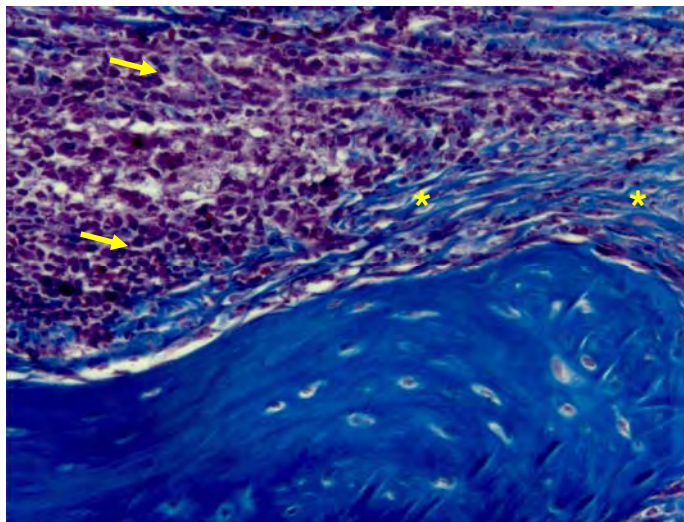


FIGURA 52 - Contraste entre o tecido conjuntivo rico em colágeno (*) e o infiltrado inflamatório altamente celularizado (→) (400x, Tricrômico de Masson).

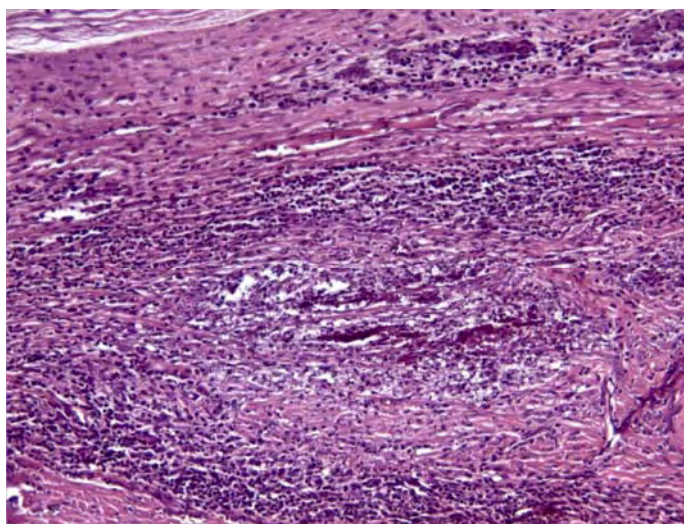


FIGURA 53 - Finalmente, no grupo de 60 dias, temos a região central do defeito, com intenso infiltrado inflamatório, porém sem a presença de focos necróticos.

8 DISCUSSÃO

Atualmente o número de pacientes em busca de reabilitações orais complexas, baseadas principalmente em implantes osseointegráveis aumentou muito. Devido à ausência de altura e largura óssea, freqüentemente encontradas em pacientes candidatos a esta modalidade de tratamento, e essenciais para que estes implantes possam ser corretamente instalados, várias técnicas são propostas objetivando viabilizar as condições ósseas, permitindo a ampliação das indicações da reabilitação com implantes e sua colocação em posições que favoreçam a estética e a funcionalidade.²

A engenharia tecidual óssea oferece uma estratégia de grande potencial na tentativa de recuperar osso perdido. Nela, os substitutos ósseos biodegradáveis agem como uma espécie de esqueleto temporário, inserido em sítios defeituosos ou aonde houve perda de tecido ósseo, na tentativa de dar suporte e de estimular a regeneração do osso enquanto sofre degradação gradativa, sendo substituído pelo osso neo-formado.⁹

Há anos, pesquisas têm procurado maneiras para substituir tecidos vivos, utilizando como substâncias sintéticas ou naturais. Williams, Blayney⁹¹, em 1987, relatam que para um biomaterial possa ser utilizado como substituto ósseo deverá ter in vivo, dois objetivos básicos: poder ser utilizado como substituto ósseo permanente, ocupando o lugar do tecido ósseo e desempenhando suas funções protetoras e de suporte, situação esta onde não é pré-requisito que o material possua uma estrutura física e química semelhante ao osso, mas sim propriedades mecânicas, físicas e

químicas adequadas, como por exemplo, estabilidade, fácil utilização clínica e habilidade de se incorporar ao tecido ósseo, além disso, também pode ser utilizado como substituto ósseo, pela sua capacidade de formação de arcabouço para neoformação tecidual em seu interior, devendo ser reabsorvido ou dissolver-se ao final do processo de remodelamento tecidual. É sabido também que um material para enxerto ou transplante deve ser capaz de promover osteocondução, osteoindução e osteopromoção, isoladamente ou em conjunto.⁸

Uma das principais propriedades desejáveis dos biomateriais de enxerto é que apresentem compatibilidade com os tecidos vivos. Sabe-se que a biocompatibilidade de um material é avaliada pela sua capacidade em produzir uma resposta apropriada no hospedeiro, a qual é influenciada por uma série de fatores que dependem de sua aplicação específica.²² Além disso, em relação à sua aplicação, esses substitutos ósseos devem possuir capacidade de ser injetados diretamente na lesão, com consistência apropriada, não sofrendo variações de temperatura in vivo, e de preferência serem bioativos e radiopacos.⁷⁸

Hoje em dia há uma enorme variedade de biomateriais que podem ser utilizados como substitutos ósseos, entre eles os aloplásticos poliméricos, que podem ser preparados em laboratório, tais como os biomateriais à base de quitosana.^{25,54,53,91} Os biomateriais poliméricos têm sido desenvolvidos em busca dessas características, na tentativa de se obter uma substância que agregue o maior número possível delas.

Biomateriais a base de quitosana são uma realidade na área da saúde, e sua aplicação vem sendo estudada em vários campos, desde a indústria farmacêutica, até a engenharia tecidual. Fatores como a facilidade de obtenção, possibilidade de manipulação em diferentes formas, desde as mais viscosas, como os géis, até elaborados suportes celulares, e carreadores de fatores de crescimento, além da biocompatibilidade, biodegradabilidade, fazem com que a quitosana se mantenha como foco de pesquisas atual e relevante dentro da Odontologia e Medicina.^{58,59,66-69}

Este estudo teve como objetivo desenvolver e avaliar radiográfica e histologicamente biomateriais à base de quitosana. Especificamente, foram desenvolvidos géis de quitosana e de cloridrato de quitosana, com diferentes pesos moleculares, e na seqüência aplicamos esses géis em defeitos ósseos críticos criados na calvária de ratos, avaliando a densidade radiográfica óssea inicial e final, e os aspectos histológicos da região tratada com os biomateriais desenvolvidos.

O primeiro desafio em nossa pesquisa foi manipular géis de quitosana e de cloridrato de quitosana passíveis de serem aplicados nos defeito ósseos criados. Gerentes et al.²⁷, em 2002, mostraram a possibilidade de manipulação do gel de quitosana, podendo assim tornar sua consistência compatível com diferentes situações clínicas que necessitassem do material de consistência mais ou menos endurecido para os diferentes defeitos a serem regenerados. Esses autores avaliaram

a possibilidade de utilização deste gel em sítios cirúrgicos ou em terapia periodontal não cirúrgica. Nos casos de sítios fechados, bolsas periodontais, defeitos infra-ósseos, o gel pode ser levado com uma seringa sem a necessidade de anestesia e adicionado à solução hidroalcoólica para diminuir sua viscosidade. Já para preenchimento de defeitos ósseos, essa fluidez deveria ser ajustada para que houvesse um completo preenchimento da cavidade e, portanto, não poderia ter um alto grau de escoamento. Os autores também descrevem que a apresentação do gel pode variar de acordo com a relação entre o polímero e o solvente, obtendo-se assim as diferentes consistências desejadas.²⁷

Essa versatilidade da quitosana permite, por exemplo, que ela seja estudada como adjuvante para melhorar a injetabilidade de outros biomateriais, tais como cimentos de hidroxiapatita, sem que houvesse perda de suas características físico-químicas necessárias para uso médico (ortopédico), tal como a taxa de desintegração e tempo de aplicação.⁴⁵ Esta possibilidade permitiu que, no plano piloto, nos orientássemos quanto às misturas das partes para criarmos um gel que tivesse uma grande viscosidade e aderência, favorecendo um completo preenchimento do defeito, minimizando o escoamento do material.

Em relação ao desempenho dos biomateriais testados, em nosso estudo os géis de quitosana e de cloridrato de quitosana apresentaram resultados aquém do esperado, já que radiograficamente, nenhum dos biomateriais foi capaz de aumentar a densidade óssea radiográfica na

área do defeito criado de maneira significativa, em relação ao grupo controle, sendo que em todos os casos os valores obtidos no grupo controle foram superiores aos obtidos com os biomateriais.

Histologicamente os resultados obtidos condizem com o que foi observado radiograficamente, já que, em todos os grupos aonde se usou algum biomaterial para o preenchimento do defeito e nos dois períodos avaliados não houve neoformação óssea além das bordas do defeito, e, na região central dos defeitos o que se observou foram reações inflamatórias de níveis variados, basicamente compostas por macrófagos, em alguns casos até mesmo com a presença de pontos necróticos. O grupo controle foi o que apresentou melhor resultado na região central do defeito, pois neste o colágeno mostra-se bem organizado e a reação inflamatória bastante diminuída, sendo notado claramente um quadro evolutivo, ou seja, de reparação, nessa região, quando comparamos o período de 15 dias com o de 60 dias.

O primeiro ponto de interesse a ser discutido sobre os resultados obtidos seria a ocorrência de inflamação. Embora a presença de mínimo infiltrado inflamatório ou ausência do mesmo sejam citadas em alguns casos na literatura, mostrando que esses biomateriais não apresentam toxicidade sistêmica ou local, sendo, portanto biocompatíveis^{8,76,81}, em nossa pesquisa isso não pôde ser observado, já que todos os biomateriais testados induziram a formação de infiltrado inflamatório de

grau variado, embora tivessem sido produzidos de maneira controlada e asséptica.

É bem conhecido o fato de que, em cavidades ósseas, materiais de implantes ou enxertos, via de regra atrasam a reparação em grau maior ou menor, já que o biomaterial tem que ser substituído, incorporado ou eliminado, para que a reparação óssea ocorra, processo esse que começa a partir de uma reação inflamatória (variável, dependendo do biomaterial) e que evolui até a resolução do defeito.⁶⁴

Esse aspecto é bem nítido em nosso estudo, já que, para todos os grupos tratados com os biomateriais testados, tanto aos 15 quanto aos 60 dias de observação, a avaliação histológica mostrou graus variados de inflamação que ocorreu frente à implantação do biomaterial. Fator relevante é que, com a ocorrência de inflamação, fica impossibilitada a reorganização tecidual e a neoformação óssea em toda a área do defeito.

A literatura é controversa em relação à utilização dos biomateriais obtidos da quitosana e da inflamação por eles desencadeada. Em 1995, Okamoto e colaboradores reportaram que a quitosana é capaz de influenciar todos os estágios de reparação tecidual em modelos experimentais com animais.⁶⁴ Na fase inflamatória, as propriedades hemostáticas da quitosana são independentes da cascata convencional de cicatrização. In vivo, esse polímero poderia estimular a proliferação de fibroblastos e modular a migração de neutrófilos e macrófagos, modificando processos de reparo subseqüentes tais como as fibroplasias

e neoformação tecidual.⁴¹ Nesse sentido, os polímeros de quitosana vêm sendo testados com sucesso no tratamento de defeitos periodontais^{59,67} mostrando não promover reações alérgica ou inflamatória importantes após sua implantação, injeção, aplicação tópica ou ingestão.¹¹

Em contrapartida, Hidaka e colaboradores, em 1999, ao avaliarem membranas de quitosana com diversos graus de desacetilação implantadas na calvária de ratos, reportaram que tal biomaterial levou a formação de uma reação inflamatória severa nos períodos iniciais, que evoluiu para um quadro inflamatório moderado nos períodos de quatro e oito semanas. O infiltrado inflamatório era composto basicamente por macrófagos, e um menor número de linfócitos e células gigantes.³¹

Asikainem et al.⁴, em 2007, avaliaram a biocompatibilidade de biomateriais compostos de fibras quitosana e vidro bioativo, implantados no tecido subcutâneo de ratos. Os autores relataram formação de infiltrado inflamatório moderado desde os períodos iniciais do estudo, sendo que essa reação tecidual se manteve mesmo após a absorção dos grânulos do vidro bioativo, indicando que provavelmente essa reação seria causada pelas fibras de quitosana. Em períodos mais longos, como o de 24 semanas, infiltrado inflamatório crônico moderado ainda podia ser visto.

A literatura tem relatado que a quitosana e seus derivados possuem a capacidade de ativar macrófagos e iniciar reações inflamatórias. Mori et al.⁵⁶, em 2005, avaliaram detalhadamente os

mecanismos pelos quais a quitosana e seus derivados podem causar a ativação de macrófagos. Os autores compararam a quitina pura, quitosana de alto peso molecular e quitosana de baixo peso molecular, colocadas em culturas de macrófagos peritoneais, e concluíram que todas essas substâncias induzem, *in vivo*, a ativação dos complexos de histocompatibilidade principais I e II, sendo que o menor grau de ativação foi encontrado para a quitosana de baixo peso molecular. Os autores concluem que tais alterações na ativação celular podem, até certo ponto, colaborar com a aceleração da reparação tecidual, porém, se muito severas ou prolongadas, podem acabar por causar processos inflamatórios crônicos, impedindo processos regenerativos mais complexos. Em outro estudo, um grupo de pesquisadores também liderado por Mori relata que, quando inseridos em culturas de fibroblastos, a quitosana e seus derivados levam a produção elevada de interleucina 8, aumentando a migração neutrofílica, o que pode, *in vivo*, colaborar para o aparecimento de reação inflamatória.⁵⁵

Outro fator que pode também ter influenciado para o aparecimento da reação inflamatória pode ter sido o método de esterilização empregado, pois, como desvantagem conhecida da quitosana e de seus derivados, surge a ausência de um consenso científico sobre o correto método de esterilização que deva ser utilizado, fator esse essencial para que as diferentes formulações obtidas sejam aprovadas pelas agências e federações que regulamentam o comércio e aplicação de novos

biomateriais no Brasil e internacionalmente. O que ocorre é que a maioria dos meios de esterilização utilizados atualmente, como autoclavagem ou exposição à radiação gama, degradam os géis de quitosana e de seus derivados, dificultando seu uso.⁹³ No nosso caso, cuidado foi tomado durante a produção da quitosana, com o uso de materiais esterilizados e de água estéril como solvente, aliado ao fato de que foi usada radiação ultra-violeta sobre os géis, durante o período de 12 horas, antes de sua utilização.

Um quesito que também pôde ser observado em todos os materiais testados foi sua biodegradabilidade, pois, em ambos os períodos de observação, nenhum resquício dos biomateriais pôde ser observado. Um grande número de polímeros, sintéticos e naturais têm sido estudados em relação à essa característica, especialmente a quitosana, que pode ser facilmente manipulada em laboratório, favorecendo a biodegradabilidade e, portanto, favorecendo a osteocondução.²⁰

Outro ponto importante a ser discutido seria o fato de não ter havido neoformação óssea nos defeitos preenchidos com os biomateriais avaliados, o que pode ter ocorrido devido às características do próprio biomaterial, à reação do organismo frente a esses biomateriais (conforme já citado), ou ainda devido ao tipo de defeito ósseo utilizado.

Um dos desafios em nossa pesquisa foi definir o tamanho do defeito ósseo crítico que seria utilizado. Muito se discute na literatura sobre qual tamanho de defeito deve ser adotado em pesquisas como

esta, já que o parâmetro de “defeito ósseo crítico” difere entre clínicos (periodontistas, cirurgiões, implantodontistas) e pesquisadores de área básica (histologistas e anatomistas).

Pesquisadores de área básica consideram como defeito crítico todo e qualquer defeito ósseo com mais de um milímetro de diâmetro, já que esse é o tamanho mínimo para que o tecido ósseo não possa se regenerar por deposição simples, ou seja, de forma direta. Para os histologistas, tais defeitos irão regenerar-se, mas de maneira lenta, em etapas que devem ser levadas em consideração nas pesquisas sobre regeneração óssea e biomateriais.³⁰

Já para os clínicos, o defeito crítico é aquele que não é capaz de se regenerar sozinho, independentemente do período de avaliação, ou seja, o tecido não se recuperará totalmente de maneira espontânea sem o auxílio de alguma técnica ou biomaterial específico. Nesta linha de pensamento, para o modelo utilizado nessa pesquisa, um defeito crítico deveria possuir entre 5 e 8 mm de diâmetro.^{9, 19, 24, 34, 48, 71}

Sendo assim, e pelo fato desta ter enfoque na aplicação clínica dos biomateriais pesquisados, optamos por utilizar o conceito clínico atual de defeito crítico, criando defeitos com 8 mm de diâmetro.

Os defeitos ósseos podem se regenerar quando há a reposição das células e elementos teciduais originais, ou podem ser reparados com substituição do tecido lesado por outro tecido de preenchimento ou suporte. O osso é um tecido que apresenta potencial único para restaurar

sua estrutura original, dentro de certas limitações, sendo que a reconstrução ao nível original de organização ocorre seqüencialmente e repete exatamente o padrão de desenvolvimento e crescimento ósseo, assim o enxerto autógeno é o mais completo dentre os materiais de enxertos devido às suas propriedades osteocondutoras, osteoindutoras e osteogênicas.⁸⁸

Park e colaboradores, em 2003, realizaram um estudo histológico em cães Beagle, para analisar o efeito da quitosana na regeneração de defeitos intra-ósseos (4 x 4mm), cirurgicamente criados. Os três grupos testados foram: grupo controle cirúrgico, no qual foi realizado apenas o retalho, grupo controle tampão, no qual a solução tampão fosfatada foi adicionada a uma esponja de colágeno, e o último grupo foi tratado com quitosana também em esponja de colágeno. O grupo que melhor manteve a migração apical de um epitélio juncional longo, e que teve maior regeneração de cemento e ainda maior quantidade de regeneração óssea alveolar foi o grupo quitosana. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos quando se avaliou a extensão da adesão dos tecidos do ligamento.⁶⁷

Artigos mais recentes avaliam a utilização do gel de quitosana como carreador para substâncias indutoras da formação óssea. Issa et al.^{35,36}, em 2007, relatam a utilização de géis de quitosana associados ao recombinante humano da proteína morfogenética óssea do tipo 2 (rhBMP-2) na correção de defeitos ósseos criados na mandíbula de ratos, e

concluíram que, apesar de quando associado a rhBMP-2 o gel de quitosana atuar como um bom biomaterial carreador, levando à neoformação óssea, o gel de quitosana isolado não foi capaz de causar regeneração do tecido ósseo.

O que se nota na maioria dos artigos existentes na literatura que testam a quitosana como biomaterial para regeneração óssea é que em raros momentos as regiões centrais dos defeitos são apresentadas nos resultados histológicos, fazendo com que nossos resultados, baseados na observação do defeito como um todo, e não apenas de suas margens, não sejam similares a maioria dos relatados na literatura. Além disso, características como grau de acetilação, concentração, e peso molecular da quitosana e de seus derivados utilizados na composição dos biomateriais testados raramente são reportados.^{20, 27, 58, 59}

Em nosso estudo, apesar de todos os fatores relacionados à obtenção do gel estarem bem delimitados e descritos na metodologia, o resultado histológico encontrado nos períodos avaliados não foi favorável à indicação do uso do gel de quitosana para o preenchimento de defeitos ósseos críticos. Dois fatores marcantes do ponto de vista de nossa avaliação seriam a resposta inflamatória persistente ainda em períodos mais longos, como o de 60 dias, e a ausência de formação óssea no interior dos defeitos. Tendo por base as avaliações radiográficas e histológicas feitas nessa pesquisa, podemos afirmar que não houve benefício na utilização dos biomateriais avaliados.

Como demonstrado anteriormente, a literatura tem relatado trabalhos aonde o uso de géis de quitosana foi favorável à regeneração de defeitos ósseos. No entanto, nem sempre são delimitados os parâmetros do biomaterial utilizado, faltando dados como concentração, peso molecular, método de esterilização, dentre outros. Desta forma, acreditamos que frente aos resultados obtidos, e dentro das condições experimentais deste estudo, estes biomateriais devem ser mais bem estudados antes de serem utilizados clinicamente dentro da engenharia tecidual, como material de preenchimento de defeitos ósseos, buscando, inclusive auxiliar na sua correção.

9 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho e nos limites da metodologia empregada, é lícito concluir que:

- Reação inflamatória em graus variados foi observada nos grupos tratados com os géis de quitosana e de cloridrato de quitosana, em ambos os períodos;
- A variação do peso molecular nos géis de quitosana e de cloridrato de quitosana não levou a modificações significativas nas propriedades biológicas dos materiais testados;
- Nenhum dos materiais testados ou suas variações contribuíram para a formação óssea nos defeitos críticos criados.

10 REFERÊNCIAS

Referências*

1. Aaboe M, Pinholt EM, Hjorting-Hansen E. Healing of experimentally created defects: a review. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 1995; 33: 312-8.
2. Adell R, Lekholm U, Rockler B, Branemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg.* 1981; 10: 387-416.
3. Aimin C, Chunlin H, Juliang B, Tinyin Z, Zhichao D. Antibiotic loaded chitosan bar. An in vitro, in vivo study of a possible treatment for osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res.* 1999; 239-47.
4. Asikainen AJ, Hagstrom J, Sorsa T, Nojonen J, Kellomaki M, Juuti H, et al. Soft tissue reactions to bioactive glass 13-93 combined with chitosan. *J Biomed Mater Res A.* 2007; 83: 530-7.
5. Boss JH, Shajrawi I, Aunullah J, Mendes DG. The relativity of biocompatibility. A critique of the concept of biocompatibility. *Isr J Med Sci.* 1995; 31: 203-9.
6. Buser D, Dahlin C, Schenk RK. Guided bone regeneration in implant dentistry. Chicago: Quintessence Publ.; 1994.
7. Buser D, Dula K, Hess D, Hirt HP, Belser UC. Localized ridge augmentation with autografts and barrier membranes. *Periodontol* 2000. 1999; 19: 151-63.

* De acordo com o estilo Vancouver.
Disponível em http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

8. Cancian DC, Hochuli-Vieira E, Marcantonio RA, Garcia Junior IR. Utilization of autogenous bone, bioactive glasses, and calcium phosphate cement in surgical mandibular bone defects in *Cebus apella* monkeys. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004; 19: 73-9.
9. Cardoso AK, Barbosa Ade A Jr, Miguel FB, Marcantonio E Jr, Farina M, Soares GD, et al. Histomorphometric analysis of tissue responses to bioactive glass implants in critical defects in rat calvaria. *Cells Tissues Organs*. 2006; 184: 128-37.
10. Carvalho VA, Tosello Dde O, Salgado MA, Gomes MF. Histomorphometric analysis of homogenous demineralized dentin matrix as osteopromotive material in rabbit mandibles. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004; 19: 679-86.
11. Chatelet C, Damour O, Domard A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*. 2001; 22: 261-8.
12. Chen J, Li Q, Xu J, Huang Y, Ding Y, Deng H, et al. Study on biocompatibility of complexes of collagen-chitosan-sodium hyaluronate and cornea. *Artif Organs*. 2005; 29: 104-13.
13. Chen WR, Korbelik M, Bartels KE, Liu H, Sun J, Nordquist RE. Enhancement of laser cancer treatment by a chitosan-derived immunoadjuvant. *Photochem Photobiol*. 2005; 81: 190-5.

14. Chesmel KD, Branger J, Wertheim H, Scarborough N. Healing response to various forms of human demineralized bone matrix in athymic rat cranial defects. *J Oral Maxillofac Surg.* 1998; 4: 857-65.
15. Craveiro AA, Craveiro AC, Queiroz DC. *Quitosana – a fibra do futuro.* São Paulo: Padetec; 1999.
16. de Carvalho PS, Mariano RC, Okamoto T. Treatment of fibrinolytic alveolitis with rifamycin B diethylamide associated with gelfoam: a histological study. *Braz Dent J.* 1997; 8: 3-8.
17. Decker EM, von Ohle C, Weiger R, Wiech I, Brex M. A synergistic chlorhexidine/chitosan combination for improved antiplaque strategies. *J Periodontal Res.* 2005; 40: 373-7.
18. Dempster DW, Parisien M, Silverberg SJ, Liang XG, Schnitzer M, Shen V, et al. On the mechanism of cancellous bone preservation in postmenopausal women with mild primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metabol.* 1999; 84: 1562-6.
19. Develioglu H, Saraydin SU, Dupoirieux L, Sahin ZD. Histological findings of long-term healing of the experimental defects by application of a synthetic biphasic ceramic in rats. *J Biomed Mater Res A.* 2007; 80: 505-8.
20. Di Martino A, Sittinger M, Risbud MV. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials.* 2005; 26: 5983-90.
21. Ducky P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science.* 2000; 289: 1501-4.

22. Edgerton M, Levine MJ. Biocompatibility: its future in prosthodontic research. *J Prosthet Dent.* 1993; 69: 406-15.
23. Felt O, Buri P, Gurny R. Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm.* 1998; 24: 979-93.
24. Furlaneto FA, Nagata MJ, Fucini SE, Deliberador TM, Okamoto T, Messora MR. Bone healing in critical-size defects treated with bioactive glass/calcium sulfate: a histologic and histometric study in rat calvaria. *Clin Oral Implants Res.* 2007; 18: 311-8.
25. Furusawa T, Mizunuma K. Osteoconductive properties and efficacy of resorbable bioactive glass as a bone-grafting material. *Implant Dent.* 1997; 6: 93-101.
26. Gartner LP, Hiatt JL. *Color textbook of histology.* 3rd ed. Philadelphia: Saunders; 2007.
27. Gerentes P, Vachoud L, Doury J, Domard A. Study of a chitin-based gel as injectable material in periodontal surgery. *Biomaterials.* 2002; 23: 1295-302.
28. Gross JS. Bone grafting materials for dental applications: a practical guide. *Compend Contin Educ Dent.* 1997; 18: 1013-24.
29. Hall EE, Meffert RM, Hermann JS, Mellonig JT, Cochran DL. Comparison of bioactive glass to demineralized freeze-dried bone allograft in the treatment of intrabony defects around implants in the canine mandible. *J Periodontol.* 1999; 70: 526-35.

30. Harris WH, White RE, Jr., McCarthy JC, Walker PS, Weinberg EH. Bony ingrowth fixation of the acetabular component in canine hip joint arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res.* 1983; 176: 7-11.
31. Hidaka Y, Ito M, Mori K, Yagasaki H, Kafrawy AH. Histopathological and immunohistochemical studies of membranes of deacetylated chitin derivatives implanted over rat calvaria. *J Biomed Mater Res.* 1999; 46: 418-23.
32. Hirano S, Ohe Y, Ono H. Selective N-acylation of chitosan. *Carbohydr Res.* 1976; 47: 315-20.
33. İkinci G, Senel S, Akincibay H, Kas S, Ercis S, Wilson CG, et al. Effect of chitosan on a periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Int J Pharm.* 2002; 235: 121-7.
34. Inoda H, Yamamoto G, Hattori T. rh-BMP2-induced ectopic bone for grafting critical size defects: a preliminary histological evaluation in rat calvariae. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2007; 36: 39-44.
35. Issa JP, do Nascimento C, Bentley MV, Del Bel EA, Iyomasa MM, Sebald W, et al. Bone repair in rat mandible by rhBMP-2 associated with two carriers. *Micron.* 2007. [cited 2008 mar 10]. Available from: <http://www.sciencedirect.com>
36. Issa JP, Spadaro AC, Bentley MV, Iyomasa MM, Siessere S, Regalo SC, et al. Monoolein and chitosan gels as potential carriers of the rhBMP-2, using decortication surgical technique in Wistar rats as experimental

model. *Micron*. 2007. [cited 2008 mar 10]. Available from: <http://www.sciencedirect.com>

37. Je JY, Kim SK. Antimicrobial action of novel chitin derivative. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1760: 104-9.

38. Junqueira LCU, Carneiro J. *Basic histology : text & atlas*. 11th ed. New York: McGraw-Hill, Medical Pub. Division; 2005.

39. Kamiyama K, Onishi H, Machida Y. Biodisposition characteristics of N-succinyl-chitosan and glycol-chitosan in normal and tumor-bearing mice. *Biol Pharm Bull*. 1999; 22: 179-86.

40. Kim IY, Seo SJ, Moon HS, Yoo MK, Park IY, Kim BC, et al. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnol Adv*. 2008; 26: 1-21.

41. Kosaka T, Kaneko Y, Nakada Y, Matsuura M, Tanaka S. Effect of chitosan implantation on activation of canine macrophages and polymorphonuclear cells after surgical stress. *J Vet Med Sci*. 1996; 58: 963-7.

42. Lee JY, Nam SH, Im SY, Park YJ, Lee YM, Seol YJ, et al. Enhanced bone formation by controlled growth factor delivery from chitosan-based biomaterials. *J Control Release*. 2002; 78: 187-97.

43. Lee KY, Ha WS, Park WH. Blood compatibility and biodegradability of partially N-acylated chitosan derivatives. *Biomaterials*. 1995; 16: 1211-6.

44. Lee YM, Park YJ, Lee SJ, Ku Y, Han SB, Choi SM, et al. Tissue engineered bone formation using chitosan/tricalcium phosphate sponges. *J Periodontol.* 2000; 71: 410-7.
45. Leroux L, Hatim Z, Freche M, Lacout JL. Effects of various adjuvants (lactic acid, glycerol, and chitosan) on the injectability of a calcium phosphate cement. *Bone.* 1999; 25: 31S-4S.
46. Lillie RD. *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry.* 1 ed. New York; 1954.
47. Lim LY, Khor E, Koo O. Gamma irradiation of chitosan. *J Biomed Mater Res.* 1998; 43: 282-90.
48. Lin Y, Wang T, Wu L, Jing W, Chen X, Li Z, et al. Ectopic and in situ bone formation of adipose tissue-derived stromal cells in biphasic calcium phosphate nanocomposite. *J Biomed Mater Res A.* 2007; 81: 900-10.
49. Liu DZ, Chen WP, Lee CP, Wu SL, Wang YC, Chung TW. Effects of alginate coated on PLGA microspheres for delivery tetracycline hydrochloride to periodontal pockets. *J Microencapsul.* 2004; 21: 643-52.
50. Malette WG, Quigley HJ, Gaines RD, Johnson ND, Rainer WG. Chitosan: a new hemostatic. *Ann Thorac Surg.* 1983; 36: 55-8.
51. Marx RE, Garg AK. Bone structure, metabolism, and physiology: its impact on dental implantology. *Implant Dent.* 1998; 7: 267-76.
52. McSheehy PM, Chambers TJ. Osteoblastic cells mediate osteoclastic responsiveness to parathyroid hormone. *Endocrinology.* 1986; 118: 824-8.

53. Mellonig JT, Nevins M, Sanchez R. Evaluation of a bioabsorbable physical barrier for guided bone regeneration. Part II. Material and a bone replacement graft. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1998; 18: 129-37.
54. Mellonig JT, Nevins M, Sanchez R. Evaluation of a bioabsorbable physical barrier for guided bone regeneration. Part I. Material alone. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1998; 18: 139-49.
55. Mori T, Okumura M, Matsuura M, Ueno K, Tokura S, Okamoto Y, et al. Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblasts in vitro. *Biomaterials.* 1997; 18: 947-51.
56. Mori T, Murakami M, Okumura M, Kadosawa T, Uede T, Fujinaga T. Mechanism of macrophage activation by chitin derivatives. *J Vet Med Sci.* 2005; 67: 51-6.
57. Morse A. Formic acid-sodium citrate decalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bones for sectioning in paraffin. *J Dent Res* 1945; 24: 143-53.
58. Muzzarelli C, Muzzarelli RA. Natural and artificial chitosan-inorganic composites. *J Inorg Biochem.* 2002; 92: 89-94.
59. Muzzarelli RA, Mattioli-Belmonte M, Tietz C, Biagini R, Ferioli G, Brunelli MA, et al. Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan. *Biomaterials.* 1994; 15: 1075-81.
60. Needleman IG, Smales FC. In vitro assessment of bioadhesion for periodontal and buccal drug delivery. *Biomaterials.* 1995; 16: 617-24.

61. Needleman IG, Smales FC, Martin GP. An investigation of bioadhesion for periodontal and oral mucosal drug delivery. *J Clin Periodontol.* 1997; 24: 394-400.
62. Needleman IG, Martin GP, Smales FC. Characterisation of bioadhesives for periodontal and oral mucosal drug delivery. *J Clin Periodontol.* 1998; 25: 74-82.
63. Novaes AB, Jr., Papalexiou V, Muglia V, Taba M, Jr. Influence of interimplant distance on gingival papilla formation and bone resorption: clinical-radiographic study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2006; 21: 45-51.
64. Okamoto Y, Shibazaki K, Minami S, Matsushashi A, Tanioka S, Shigemasa Y. Evaluation of chitin and chitosan on open wound healing in dogs. *J Vet Med Sci.* 1995; 57: 851-4.
65. Paradossi G, Chiessi E, Venanzi M, Pispisa B, Palleschi A. Branched-chain analogues of linear polysaccharides: a spectroscopic and conformational investigation of chitosan derivatives. *Int J Biol Macromol.* 1992; 14: 73-80.
66. Park IK, Park YH, Shin BA, Choi ES, Kim YR, Akaike T, et al. Galactosylated chitosan-graft-dextran as hepatocyte-targeting DNA carrier. *J Control Release.* 2000; 69: 97-108.
67. Park JS, Choi SH, Moon IS, Cho KS, Chai JK, Kim CK. Eight-week histological analysis on the effect of chitosan on surgically created one-

wall intrabony defects in beagle dogs. *J Clin Periodontol.* 2003; 30: 443-53.

68. Park YJ, Lee YM, Lee JY, Seol YJ, Chung CP, Lee SJ. Controlled release of platelet-derived growth factor-BB from chondroitin sulfate-chitosan sponge for guided bone regeneration. *J Control Release.* 2000; 67: 385-94.

69. Park YJ, Lee YM, Park SN, Sheen SY, Chung CP, Lee SJ. Platelet derived growth factor releasing chitosan sponge for periodontal bone regeneration. *Biomaterials.* 2000; 21: 153-9.

70. Paschoal AL, Vanancio EC, Canale Lde C, da Silva OL, Huerta-Vilca D, Motheo Ade J. Metallic biomaterials TiN-coated: corrosion analysis and biocompatibility. *Artif Organs.* 2003; 27: 461-4.

71. Pryor ME, Susin C, Wikesjo UM. Validity of radiographic evaluations of bone formation in a rat calvaria osteotomy defect model. *J Clin Periodontol.* 2006; 33: 455-60.

72. Raisz LG, Simmons HA, Thompson WJ, Shepard KL, Anderson PS, Rodan GA. Effects of a potent carbonic anhydrase inhibitor on bone resorption in organ culture. *Endocrinology.* 1988; 122: 1083-6.

73. Rao SB, Sharma CP. Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential. *J Biomed Mater Res.* 1997; 34: 21-8.

74. Richter HE, Boyne PJ. New concepts in facial bone healing and grafting procedures. *J Oral Surg.* 1969; 27: 557-9.

75. Rodan GA, Martin TJ. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption--a hypothesis. *Calcif Tissue Int.* 1981; 33: 349-51.
76. Senel S, İkinci G, Kas S, Yousefi-Rad A, Sargon MF, Hincal AA. Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery. *Int J Pharm.* 2000; 193: 197-203.
77. Senel S, McClure SJ. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004; 56: 1467-80.
78. Service RF. Tissue engineers build new bone. *Science.* 2000; 289: 1498-500.
79. Shahidi F, Abuzaytoun R. Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, production, applications, and health effects. *Adv Food Nutr Res.* 2005; 49: 93-135.
80. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.* 1997; 89: 309-19.
81. Singla AK, Chawla M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects--an update. *J Pharm Pharmacol.* 2001; 53: 1047-67.
82. Summers BN, Eisenstein SM. Donor site pain from the ilium. A complication of lumbar spine fusion. *J Bone Joint Surg Br.* 1989; 71: 677-80.
83. Takeuchi H, Matsui Y, Yamamoto H, Kawashima Y. Mucoadhesive properties of carbopol or chitosan-coated liposomes and their

effectiveness in the oral administration of calcitonin to rats. *J Control Release*. 2003; 86: 235-42.

84. Tarsi R, Muzzarelli RA, Guzman CA, Pruzzo C. Inhibition of *Streptococcus mutans* adsorption to hydroxyapatite by low-molecular-weight chitosans. *J Dent Res*. 1997; 76: 665-72.

85. Ten Cate AR. *Oral histology : development, structure, and function*. 5th ed. St. Louis: Mosby; 1998.

86. Thesingh CW, Burger EH. The role of mesenchyme in embryonic long bones as early deposition site for osteoclast progenitor cells. *Dev Biol*. 1983; 95: 429-38.

87. Tormala P, Pohjonen T, Rokkanen P. Bioabsorbable polymers: materials technology and surgical applications. *Proc Inst Mech Eng [H]*. 1998; 212: 101-11.

88. Triplett RG, Schow SR. Surgical advances in implant dentistry. *Tex Dent J*. 1994; 111: 12-3, 5-7, 9.

89. Ueno H, Murakami M, Okumura M, Kadosawa T, Uede T, Fujinaga T. Chitosan accelerates the production of osteopontin from polymorphonuclear leukocytes. *Biomaterials*. 2001; 22: 1667-73.

90. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science*. 1965; 150: 893-9.

91. Williams KR, Blayney AW. Tissue response of several polymeric materials implanted in the rat middle ear. *Biomaterials*. 1987; 8: 254-8.

92. Yamada Y, Ueda M, Naiki T, Nagasaka T. Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. *Clin Oral Implants Res.* 2004; 15: 589-97.
93. Zahraoui C, Sharrock P. Influence of sterilization on injectable bone biomaterials. *Bone.* 1999; 25: 63S-5S.

ANEXOS



Anexo 1: Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal,
autorizando a realização desta pesquisa



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara
FACULDADE DE ODONTOLOGIA




Proc. CEEA nr. 24/2006

Araraquara, 22 de outubro de 2007

Senhor Pesquisador:

O Comitê de Ética em Experimentação Animal-
CEEA desta Faculdade, reunido em 22/10/2007, após a avaliação do
relatório parcial referente ao projeto de sua responsabilidade "Uso do gel de
quitosana associado a BMP-2 na correção de defeitos ósseos críticos feitos em calvária de ratos:
análises histométrica, radiográfica e molecular" (Proc. 24/2006), **autorizou a**
inclusão de mais vinte animais como também, **autorizou a alteração** do
título para: "*Desenvolvimento e aplicação de biomateriais à base de quitosana,
associados à BMP-2: análises histométrica, radiográfica e molecular*", ficando a
aprovação vinculada a apresentação do RELATÓRIO FINAL em
FEVEREIRO/2009.

Atenciosamente.


Prof. Dra. Maria Rita Brancini de Oliveira
Coordenadora do CEEA

Ao
Prof. Dr. ELCIO MARCANTONIO JUNIOR
DD. Pesquisador Responsável
Prof. Dr. CARLOS ROSSA JUNIOR
CD. RUBENS SPIN NETO
DD. Pesquisadores Colaboradores
Nesta

Anexo 2: Quadro com os valores brutos e relativizados da densidade radiográfica na área dos defeitos criados em cada um dos animais da pesquisa, no momento inicial e final

Grupo	Animal	Inicial			Final		
		Valor	Padrão	Relat.	Valor	Padrão	Relat.
Controle 15 dias	1	60.61	236.57	0.256	87.30	238.69	0.366
	2	59.10	237.41	0.249	99.33	241.36	0.412
	3	65.28	237.12	0.275	94.13	239.63	0.393
	4	52.34	233.83	0.224	95.33	240.64	0.396
	5	56.82	235.49	0.241	104.53	241.41	0.433
Controle 60 dias	6	46.17	234.89	0.197	81.55	239.62	0.340
	7	60.48	238.71	0.253	89.97	240.08	0.375
	8	51.22	236.89	0.216	86.65	241.34	0.359
	9	48.72	236.17	0.206	82.26	242.52	0.339
	10	53.46	234.52	0.228	85.39	241.26	0.354
Gel de Quitosana (Baixo Peso) 15 dias	11	92.64	240.22	0.386	110.89	242.27	0.458
	12	64.30	242.29	0.265	77.87	239.79	0.325
	13	78.79	241.90	0.326	71.07	237.39	0.299
	14	66.67	240.74	0.277	91.12	238.42	0.382
	15	60.86	241.96	0.252	57.24	238.06	0.240
Gel de Quitosana (Baixo Peso) 60 dias	16	60.85	240.06	0.253	95.52	242.66	0.394
	17	56.09	237.82	0.236	77.40	240.99	0.321
	18	64.19	238.11	0.270	77.36	241.52	0.320
	19	63.76	238.43	0.267	78.29	238.97	0.328
	20	65.34	239.79	0.272	81.01	239.76	0.338
Gel de Quitosana (Alto Peso) 15 dias	21	61.01	239.52	0.255	71.92	238.60	0.301
	22	57.52	239.65	0.240	50.81	236.03	0.215
	23	71.25	239.29	0.298	98.50	242.62	0.406
	24	55.94	238.33	0.235	93.77	239.77	0.391
	25	54.44	237.61	0.229	94.75	241.63	0.392
Gel de Quitosana (Alto Peso) 60 dias	26	55.97	237.56	0.236	69.73	239.21	0.292
	27	59.45	237.30	0.251	61.26	236.99	0.258
	28	68.82	238.44	0.289	57.33	236.30	0.243
	29	85.67	238.67	0.359	63.13	236.87	0.267
	30	83.94	242.12	0.347	87.20	238.53	0.366
Gel de Cloridrato de Quitosana (Baixo Peso) 15 dias	31	50.14	245.54	0.204	77.58	244.64	0.317
	32	59.64	245.16	0.243	71.50	245.14	0.292
	33	64.50	244.67	0.264	75.53	244.86	0.308
	34	58.14	245.16	0.237	70.44	242.73	0.290
	35	53.44	245.97	0.217	73.95	242.18	0.305
Gel de Cloridrato de Quitosana (Baixo Peso) 60 dias	36	69.86	240.18	0.291	72.44	235.45	0.308
	37	69.28	237.76	0.291	48.11	236.30	0.204
	38	58.62	236.54	0.248	47.73	235.94	0.202
	39	55.30	240.80	0.230	55.59	237.93	0.234
	40	57.04	239.16	0.239	44.76	235.76	0.190
Gel de Cloridrato de Quitosana (Alto Peso) 15 dias	41	67.21	238.43	0.282	94.18	244.64	0.385
	42	66.12	237.56	0.278	86.63	239.86	0.361
	43	89.88	236.65	0.380	113.66	245.34	0.463
	44	70.27	234.88	0.299	83.68	242.30	0.345
	45	62.41	234.67	0.266	80.44	242.64	0.332
Gel de Cloridrato de Quitosana (Alto Peso) 60 dias	46	69.01	238.68	0.289	90.21	243.70	0.370
	47	71.07	237.02	0.300	87.16	241.92	0.360
	48	69.45	237.36	0.293	50.97	234.58	0.217
	49	79.55	236.63	0.336	69.05	238.38	0.290
	50	58.06	236.78	0.245	33.46	235.29	0.142

Autorizo a reprodução deste trabalho.
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 17 de março de 2008.

RUBENS SPIN NETO