

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO” – UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ESTUDO DA BIOCAMPATIBILIDADE E MORFOMETRIA DO GEL DE
QUITOSANA ASSOCIADA AO GLICEROL FOSFATO PARA
REPARAÇÃO DE DEFEITOS ÓSSEOS INDUZIDOS
EXPERIMENTALMENTE NO RÁDIO DE COELHOS (ORYCTOLAGUS
CUNICULUS)**

Rafael Manzini Dreibi

Médico Veterinário

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO” – UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ESTUDO DA BIOCAMPATIBILIDADE E MORFOMETRIA DO GEL DE
QUITOSANA ASSOCIADA AO GLICEROL FOSFATO PARA
REPARAÇÃO DE DEFEITOS ÓSSEOS INDUZIDOS
EXPERIMENTALMENTE NO RÁDIO DE COELHOS (ORYCTOLAGUS
CUNICULUS)**

Rafael Manzini Dreibi

Orientação: Prof. Associado Bruno Watanabe Minto

**Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para qualificação para
obtenção do título de Doutor em Cirurgia
Veterinária**

D771e

Dreibi, Rafael Manzini

Estudo da biocompatibilidade e morfometria do gel de quitosana associada ao glicerol fosfato para reparação de defeitos ósseos induzidos experimentalmente no rádio de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) / Rafael Manzini Dreibi. -- Jaboticabal, 2021

39 p. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Bruno Watanabe Minto

1. Cirurgia veterinária. 2. Fraturas em animais. 3. Regeneração óssea. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

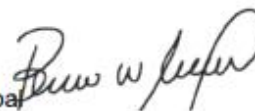
TÍTULO DA TESE: ESTUDO DA BIOCOMPATIBILIDADE E MORFOMETRIA DO GEL DE QUITOSANA ASSOCIADA AO GLICEROL FOSFATO PARA REPARAÇÃO DE DEFEITOS ÓSSEOS INDUZIDOS EXPERIMENTALMENTE NO RÁDIO DE COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)

AUTOR: RAFAEL MANZINI DREIBI

ORIENTADOR: BRUNO WATANABE MINTO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:

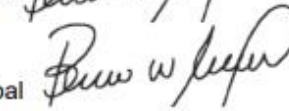
Prof. Dr. BRUNO WATANABE MINTO (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



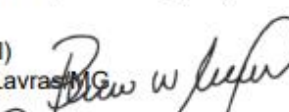
Prof. Dr. LUÍS GUSTAVO GOSUEN GONÇALVES DIAS (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. PAOLA CASTRO MORAES (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / UNESP / FCAV - Jaboticabal



Prof. Dr. FERNANDO YOITI KITAMURA KAWAMOTO (Participação Virtual)
Departamento de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Lavras / Lavras/MG



Prof. Dr. LUÍS GUILHERME DE FARIA (Participação Virtual)
Universidade de Uberaba-UNIUBE / Uberaba/MG



Jaboticabal, 10 de agosto de 2021

2021

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RAFAEL MANZINI DREIBI nasceu na cidade de Mococa, no dia 25 de maio do ano de 1986, filho de João Batista Dreibi e Claudia Maria Manzini Dreibi. Em outubro de 2013, graduou-se em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Lavras (UFLA). cursou o Programa de Residência Clínica Cirúrgica e Anestesiologia de Animais de Companhia, no período de 01 de março de 2014 a 01 de março de 2016 na mesma instituição. Ingressou no Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária, curso de Mestrado, Universidade Estadual Paulista FCAV – UNESP – Câmpus de Jaboticabal, em março de 2016, sob orientação do Prof. Dr. Bruno Watanabe Minto, defendendo sua dissertação em fevereiro de 2018. Em março de 2018, deu continuidade à pós-graduação ingressando no curso de Doutorado em Cirurgia Veterinária na mesma instituição. Ao longo do programa foi bolsista do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) no Mestrado e bolsista CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) no Doutorado.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meus profundos agradecimentos aos meus pais, João Batista Dreibi e Claudia Maria Manzini Dreibi, fonte de amor, inspiração e sabedoria, sempre.

Aos meus irmãos, Rodrigo e Vanessa, pelos incentivos, conselhos, exemplos e risadas, juntamente com meus cunhados, Marina e Bueno, por complementa-los tão perfeitamente

À minha namorada, Carol, por ser minha certeza, porto seguro, conselheira, inspiração e exemplo.

Agradeço ao Prof. Dr. Bruno Watanabe Minto, pela orientação de Mestrado e Doutorado, amizade, parceria e sabedoria compartilhada.

Ao Profs. Dr. Luís Gustavo Gosuen Gonçalves Dias e Dra. Paola de Castro Moraes por aceitarem compor a banca, por todo conhecimento e sabedoria transmitidos.

Também aos Profs. Fernando Yoiti Kitamura Kawamoto e Luis Guilherme de Faria, por além da satisfação de tê-los na banca, por serem exemplos e inspiração da vida acadêmica assim como grandes amigos que carrego comigo sempre.

A todos os professores que colaboraram pela minha formação profissional durante a graduação e residência na Universidade Federal de Lavras.

Aos amigos do Curso de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária, Serviço de Ortopedia e Neurocirurgia de Pequenos Animais, médicos veterinários residentes do setor de Cirurgia de Pequenos Animais, pela parceria, amizade e aprendizados compartilhados.

Aos funcionários do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” , por sempre proporcionarem bons momentos durante a rotina.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Aos animais, que sem eles, nada disso seria possível.

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT	xiv
1. CAPÍTULO 1: Considerações Gerais	15
1.1. Introdução e revisão de literatura	15
1.2. Justificativa	19
1.3. Objetivos	19
2. CAPÍTULO 2: Biocompatibilidade do gel de quitosana associado ao glicerol fosfato na reparação de defeitos ósseos induzidos experimentalmente no rádio de coelhos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>).....	21
3. DISCUSSÃO	39
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	41
6. REFERÊNCIAS	42

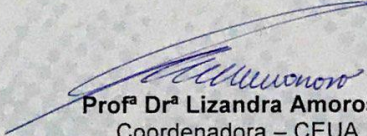
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “**Estudo da biocompatibilidade do gel de quitosana associada ao glicerol fosfato para reparação de defeitos ósseos induzidos experimentalmente no rádio de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*)**”, protocolo nº 6.503/16, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Bruno Watanabe Minto, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 04 de maio de 2016.

Vigência do Projeto	01/07/2016 a 30/06/2017
Espécie / Linhagem	Coelhos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) / Raça Nova Zelândia
Nº de animais	15
Peso / Idade	3,5 kg
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério

Jaboticabal, 04 de maio de 2016.


Prof.ª Dr.ª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n - 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
tel 16 3209 2600 fax 3202 4275 www.fcav.unesp.br

ESTUDO DA BIOCOMPATIBILIDADE E MORFOMETRIA DO GEL DE QUITOSANA ASSOCIADA AO GLICEROL FOSFATO PARA REPARAÇÃO DE DEFEITOS ÓSSEOS INDUZIDOS EXPERIMENTALMENTE NO RÁDIO DE COELHOS (ORYCTOLAGUS CUNICULUS)

RESUMO - A engenharia de tecidos caracteriza-se como ciência interdisciplinar, a qual vem desenvolvendo biomateriais para a regeneração do tecido ósseo no âmbito das medicinas humana e veterinária. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a regeneração óssea obtida da aplicação do hidrogel de quitosana associado ao glicerol fosfato em falha óssea experimentalmente induzida no rádio de coelhos. Foram utilizados 15 coelhos adultos, distribuídos aleatoriamente em dois grupos, representados por cada um dos rádios de cada animal, sendo um grupo tratado com hidrogel de quitosana associado ao glicerol fosfato (grupo biomaterial - GB) e um grupo que não recebeu tratamento com o biomaterial (grupo controle - GC). Os animais foram avaliados radiograficamente, por densitometria óptica, análise histológica e contagem de osteócitos e osteoblastos da interface osso-implante, nos períodos 30, 60 e 90 dias pós-operatórios. Houve superioridade estatística na média geral das avaliações radiográficas do GB ($2,33 \pm 0,48$) sobre o GC ($1,77 \pm 0,06$). As médias gerais de avaliação densitométrica do GB foram superiores às do GC, sendo $6,207 \pm 1,374$ e $5,71 \pm 1,512$, respectivamente. A avaliação histopatológica do GB foi superior à do GC nos períodos de 30, 60 e 90 dias. A contagem de osteócitos e osteoblastos foi superior no grupo controle comparado ao tratamento com quitosana ($p = 0,0044$; $p = 0,035$) 60 dias após a cirurgia.

Palavras-chave: coelho, regeneração óssea, biomateriais, quitosana

BIOCOMPATIBILITY AND MORPHOMETRY STUDY OF CHITOSAN GEL ASSOCIATED WITH GLYCEROL PHOSPHATE ON EXPERIMENTALLY INDUCED BONE DEFECTS REGENERATION IN RABBIT'S RADIOS (ORYCTOLAGUS CUNICULUS)

ABSTRACT - Tissue engineering is an interdisciplinary science that has been developing biomaterials for bone regeneration in medicine and veterinary medicine, following an imminent need. The aim of this study was to evaluate bone regeneration after use of chitosan hydrogel associated with glycerol phosphate in experimentally induced bone gap in the radius of rabbits. Fifteen adult rabbits were randomly distributed in two experimental groups, represented by each radius of every single animal. The animals in the Biomaterial Group (GB) were treated with a glycerol phosphate-associated chitosan hydrogel and in the Control Group (GC) they received no treatment with the biomaterial. The animals were evaluated radiographically, by optical densitometry, and histological analysis and count of osteocytes and osteoblasts from the bone-implant interface, in the periods 30, 60 and 90 days postoperatively. There was statistical superiority in the general average of the radiographic evaluations of the GB (2.33 ± 0.48) over the CG (1.77 ± 0.06). The general averages of densitometric evaluation of the GB were higher than those of the CG, being 6.207 ± 1.374 and 5.71 ± 1.512 , respectively. Histopathological evaluation of GB was superior to that of CG in periods of 30, 60 and 90 days. The osteocyte and osteoblast count was higher in the control group compared to treatment with chitosan ($p = 0.0044$; $p = 0.035$) 60 days after surgery.

Keywords: rabbit, bone regeneration, biomaterials, chitosan

1. CAPÍTULO 1: Considerações Gerais

1.1. Introdução e revisão de literatura

Dentre as diversas afecções que afetam a estrutura óssea, as fraturas com perda de massa óssea têm sido amplamente estudadas, especialmente devido às consequências destas lesões na qualidade de vida dos animais. Estes problemas atingem tanto animais jovens quanto idosos. Por esse motivo, ressalta-se a importância da busca por materiais sintéticos que facilitem a reparação óssea, visando o restabelecimento rápido das funções fisiológicas.

Alguns autores avaliando as afecções ortopédicas em membros pélvicos de cães observaram que as fraturas representaram as afecções mais comuns (KEMPER; DIAMANTE, 2010; SOUZA et al., 2011). Segundo Souza e colaboradores (2011), de um total de 889 animais, 31,9% apresentaram fraturas dos ossos longos (n=284) e 11,5% fraturas da pelve (n=102), as demais corresponderam a doenças articulares.

Após o tratamento das fraturas, podem ocorrer algumas complicações importantes que incluem osteomielite, união retardada, não-união, má união, fechamento prematuro da fise e sarcoma associado com fratura (JACKSON; PACCHIANA, 2004). Assim, a melhora no processo de cicatrização óssea constitui uma parte essencial no tratamento cirúrgico de muitas condições ortopédicas (VERTENTEN et al., 2010), principalmente, quando se tem defeitos maiores, especificamente aqueles definidos como "defeitos de tamanho crítico" que representam um enorme desafio, tanto na ortopedia humana como na veterinária (GARTNER; HIATT, 2001). Estes defeitos não mostram qualquer fechamento espontâneo, requerendo meios adicionais para potencializar a união óssea (GARTNER; HIATT, 2001).

As modalidades de tratamento convencional utilizadas na reconstrução do tecido ósseo apresentam resultados muitas vezes aquém do esperado (OLIVEIRA et al., 2010). Não obstante, a inabilidade em restaurar a integridade

do esqueleto pode levar a comorbidades associadas, consultas médicas frequentes, diminuição na qualidade de vida e aumento dos custos médicos (CARLO et al., 2009). As técnicas tradicionais utilizam transplante autólogo de tecido ósseo, promovendo velocidade de incorporação maior do que qualquer outro tipo de enxerto (SCHWARTZ et al., 2009). No entanto, existem algumas desvantagens desse tipo de enxerto, dentre elas a quantidade disponível do tecido é frequentemente limitada, especialmente ao lidar com grandes defeitos ósseos, o que incentiva o uso de xenoenxertos e diferentes substitutos ósseos (VERTENTEN et al., 2010).

Dessa forma, a pesquisa por novos biomateriais tem-se mostrado fundamentalmente importante para uma melhoria na qualidade de vida das pessoas, refletindo no aumento na média de vida, na saúde em geral e no bem-estar da população (MARTINS, 2012). A aplicação de biomateriais sintéticos na regeneração do tecido ósseo, como uma alternativa aos enxertos ósseos, é relevante, pois eles não danificam tecidos saudáveis, não aumentam os riscos de contaminações virais e bacterianas, além de serem disponibilizados comercialmente (WILLIAMS, 1987). Podem, ainda, ser de fácil dissolução e absorção, ao mesmo tempo em que permitem e estimulam a formação óssea (WAN; NACAMULI; LONGAKER, 2006; CHEN et al., 2009).

O termo biomaterial foi definido como qualquer substância de origem natural ou sintética que pode ser usada por qualquer período, como todo ou parte de um sistema que trata, aumenta ou substitui algum tecido, órgão ou função do corpo (BRUCK, 1991; RODRIGUES, 2013; RESENDE, 2014; RIBEIRO, 2014). São exemplos de biomateriais mais utilizados nas cirurgias médicas e odontológicas: os metais ou ligas metálicas (titânio, titânio-alumínio-vanádio, ferro-cromo-níquel), as cerâmicas (hidroxiapatita, trifosfato de cálcio), os polímeros (poliamida, polipropileno, polimetilmetacrilato) e os compósitos (amálgama) (CALIXTO, 2001; RODRIGUES, 2013; RESENDE, 2014; RIBEIRO, 2014; PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

Dentre os polímeros, destaca-se a quitosana, derivada do processo de desacetilação da quitina, principal componente estrutural da carapaça de crustáceos (camarão, carangueijo e lagosta) (AZEVEDO et al., 2007; PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015), encontrada também em parede celular de fungos (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015). Ela tem sido considerada um material potencialmente atraente para diversos usos, principalmente em engenharia, biotecnologia e medicina, em função da sua natureza não tóxica, atividade antibacteriana, biodegradabilidade, biocompatibilidade (BERGER et al., 2004; PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015), abundância, atividade antioxidante, produção de baixo custo e ecologicamente correta (BERGER et al., 2004).

No contexto da medicina veterinária, a quitosana tem sido utilizada para melhorar as funções de leucócitos polimorfonucleares (PMN) (fagocitose, produção de osteopontina e leucotrieno B₄), macrófagos (fagocitose e na produção de interleucina-1, transformando β 1 do fator de crescimento derivado das plaquetas e fator de crescimento) e fibroblastos (produção de interleucina-8) (MUZZARELLI, 2009). Além disso, tem sido amplamente empregada na engenharia de tecido ósseo, uma vez que foi demonstrado que promove o crescimento celular e deposição de matriz mineral rico por células osteoblásticas em cultura (SEOL et al., 2004).

Estudos demonstraram a sua não toxicidade in vivo, sendo biodegradado pela lisozima, uma enzima presente em tecidos, órgãos e fluidos corporais de mamíferos, inclusive no fluido lacrimal (MI et al., 2002). Devido a isso, a quitosana oferece uma ampla gama de aplicações, principalmente engenharia de tecidos, incluindo cartilagem (MARTINS, 2010), cicatrização de feridas (UENO; MORI; FUJINAGA, 2001) e aplicações ortopédicas (DI MARTINO et al., 2005).

Segundo Tan et al. (2014) a quitosana tem sido utilizada com outras matrizes formadoras de osso, como hidroxapatita, colágeno e suportes artificiais de poli (lactido-co-glicolido) (PLGA) ou poli (L-ácido láctico) (PLLA), na engenharia de tecidos ósseos. Adicionalmente, também é estudada para

tratamento de cânceres, como de pulmão, mama, fígado e colo-retal (TAN et al., 2014). Neste mesmo estudo, foi observada que a quitosana pura, em baixas concentrações aumentou significativamente o número de osteoblastos. Constatou-se também por meio de radiografias, a reparação óssea dos sítios de fraturas (TAN et al., 2014),

Em pesquisa realizada por Kim e colaboradores (2014), a quitosana associada ao lactato fibrinogênio, apresentou eficiência em depositar BMP-2 (proteína óssea morfogenética - 2), que regula a resposta celular, melhora a osteogênese e conseqüentemente acelera a reparação óssea, tanto in vitro quanto in vivo. Em outro estudo, realizado em coelhos, foi observada que a associação de biopolímero com fosfato de cálcio é promissor para o reparo de tecido ósseo, promovendo diferenciação celular e acelerando a deposição de osteóide no defeito ósseo (AZEVEDO et al., 2014).

Ao associar a carboximetilquitosana com gelatina a fim de simular o colágeno natural no tecido, Han e colaboradores (2015) obtiveram um hidrogel gradiente que demonstrou boa reparação de defeito osteocondral e foi sugerida a potencialidade de uso para a reparação da interface osso-cartilagem. Segundo Li et al. (2015), o composto proteína óssea morfogenética 2 + peptídeo relacionado P24 / poli (ácido láctico-co-glicólico) / quitosana é um novo material para reparo de defeitos ósseos, com atividade estável para induzir a formação óssea.

Outro experimento demonstrou a viabilidade dos esqueletos de quitosana carregada com cobre para a engenharia de tecidos ósseos, melhorando a reparação e regeneração de defeitos ósseos em calota craniana de ratos (D'MELLO et al., 2015). Um estudo em coelhos com osteoporose demonstrou que o implante de titânio com técnica de montagem eletrostática camada por camada – LBL – contendo proteína óssea morfogenética 2, quitosana e agentes anti-osteoporóticos de calcitonina (TC4/LBL/CT/BMP2) pode promover consideravelmente a formação e remodelação de osso novo (HUANG et al., 2016).

Outra evidência do uso benéfico de quitosana em defeitos ósseos foi demonstrada em estudo realizado por Ho e colaboradores (2015), no qual a implantação de nanofibras de quitosana em fêmures proximais de camundongos machos resultou em melhora na reparação do osso, aumentando inclusive a formação de trabéculas ósseas, quando comparado ao grupo controle.

1.2. Justificativa

A quitosana tem sido considerada como um dos polímeros naturais mais efetivos para aplicação na engenharia biomédica, devido à sua semelhança estrutural com as glicosaminoglicanas, encontradas nos ossos, além de características como biodegradabilidade, biocompatibilidade e excelentes propriedades mecânicas (PARK et al., 2000; YAMAGUCHI et al., 2001; RUSU et al., 2005). Martins (2010) utilizou a quitosana associada ao glicerol fosfato para reparação de defeitos osteocondrais induzidos experimentalmente na tróclea do talus de equinos, indicando que é biocompatível com o ambiente articular. Poucos trabalhos citam seu uso no ambiente de fratura in vivo e associando-a a outros biomateriais (FILGUEIRA, 2012; KASHIWAZAKI et al., 2010; DANILCHENKO et al., 2009; ZHAO, 2002), justificando a pesquisa, uma vez que sua matéria-prima é abundante na natureza e a confecção é simples e de baixo custo.

QUANTIDADE DE ENXERTO AUTOGENO, PROBLEMAS DE USAR ENXERTOS ALÓGENOS E XENOGENOS, QUITOSANA E JUSTIFICATIVA

1.3. Objetivos

- Avaliar a regeneração óssea obtida com a aplicação do hidrogel de quitosana associada ao glicerol fosfato na falha óssea experimentalmente criada no rádio de coelhos;

- Avaliar a regeneração óssea por meio de radiografia e densitometria óptica;
- Avaliar histologicamente a regeneração óssea por meio da análise descritiva e morfométrica.

2. CAPÍTULO 2: Biocompatibilidade do gel de quitosana associado ao glicerol fosfato na reparação de defeitos ósseos induzidos experimentalmente no rádio de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*)

Biocompatibilidade do gel de quitosana associado ao glicerol fosfato na reparação de defeitos ósseos induzidos experimentalmente no rádio de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*)

*[Biocompatibility of chitosan gel associated with glycerol phosphate for the healing of experimentally induced radial defects in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*)]*

RESUMO

A engenharia de tecidos caracteriza-se como ciência interdisciplinar, a qual vem desenvolvendo biomateriais para a regeneração do tecido ósseo no âmbito das medicinas humana e veterinária. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a regeneração óssea obtida da aplicação do hidrogel de quitosana associado ao glicerol fosfato em falha óssea experimentalmente induzida no rádio de coelhos. Foram utilizados 15 coelhos adultos, distribuídos aleatoriamente em dois grupos, representados por cada um dos rádios de cada animal, sendo um grupo tratado com hidrogel de quitosana associado ao glicerol fosfato (grupo biomaterial - GB) e um grupo que não recebeu tratamento com o biomaterial (grupo controle - GC). Os animais foram avaliados radiograficamente, por densitometria óptica e

análise histológica, nos períodos 30, 60 e 90 dias pós-operatórios. Houve superioridade estatística na média geral das avaliações radiográficas do GB ($2,33\pm 0,48$) sobre o GC ($1,77\pm 0,06$). As médias gerais de avaliação densitométrica do GB foram superiores às do GC, sendo $6,207\pm 1,374$ e $5,71\pm 1,512$, respectivamente. A avaliação histopatológica do GB foi superior à do GC nos períodos de 30, 60 e 90 dias.

Palavras-chave: biomateriais, falha óssea, quitosana, regeneração óssea

ABSTRACT

Tissue engineering is an interdisciplinary science that has been developing biomaterials for bone regeneration in medicine and veterinary medicine, following an imminent need. The aim of this study was to evaluate bone regeneration after use of chitosan hydrogel associated with glycerol phosphate in experimentally induced bone gap in the radius of rabbits. Fifteen adult rabbits were randomly distributed in two experimental groups, represented by each radius of every single animal. The animals in the Biomaterial Group (GB) were treated with a glycerol phosphate-associated chitosan hydrogel and in the Control Group (GC) they received no treatment with the biomaterial. The animals were evaluated clinically, radiographically, histologically and by optic densitometry at 30, 60 and 90 days postoperatively. There was statistical superiority in the general average of the radiographic estimates of GB (2.33 ± 0.48) over the CG (1.77 ± 0.06). The general averages of GB densitometric evaluation were higher than the CG, being 6.207 ± 1.374 and 5.71 ± 1.512 , respectively.

Histopathological evaluation of GB was superior to CG in periods of 30, 60 and 90 days.

Keywords: rabbit, bone regeneration, biomaterials, chitosan

INTRODUÇÃO

Apesar da existência e disponibilização de técnicas e implantes ortopédicos modernos, o tratamento das fraturas continua desafiador, com índices preocupantes de complicações e interferências no processo de consolidação óssea (Winkler *et al.*, 2018). Extensa gama de ferramentas facilitadoras da reparação do tecido ósseo tem sido utilizada na medicina humana e na veterinária, com foco especial em incrementar processos biológicos, tais como osteogênese, osteoindução e osteocondução, das quais se destacam o uso de biomateriais sintéticos, combinados ou não com fatores de crescimento ósseo (Giannoudis *et al.*, 2007; Gómez-Barrena *et al.*, 2015).

Os biomateriais compostos por polímeros biodegradáveis desempenham importante papel no desenvolvimento e na manufatura de implantes cirúrgicos, uma vez que se degradam por hidrólise ou outras reações enzimáticas específicas, evitando a necessidade de nova intervenção para remoção. Entre eles, a quitosana se destaca, a qual é biodegradada pela lisozima (Mi *et al.*, 2002; Ahsan *et al.*, 2017) e quitinase (Ahsan *et al.*, 2017).

A quitosana assemelha-se estruturalmente aos glicosaminoglicanos naturais do osso, o que a torna atrativa para uso em processos de regeneração óssea (Shakir *et al.*, 2018). Por apresentar boa biocompatibilidade e baixa toxicidade, com subprodutos da biodegradação não imunogênicos ou carcinogênicos, há grande potencial farmacêutico. Além disso, é capaz de melhorar a proliferação e a adesão de fibroblastos, demonstrando atividade promissora na regeneração

óssea em defeitos críticos (Mi *et al.*, 2002; Ahsan *et al.*, 2017; Shakir *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2018). O glicerol fosfato, por sua vez, define-se como sal de caráter básico, podendo ser utilizado para a formação de hidrogéis. Esse sal controla as ligações de hidrogênio e as interações hidrofóbicas, tamponando o hidrogel de quitosana e sendo capaz de manter o pH entre 7,0 e 7,4 (Chenite, 2000). Adicionalmente, impede agregação das cadeias de quitosana, permitindo a liberação prolongada de macromoléculas (Wu *et al.*, 2006).

Diante dos potenciais benefícios da utilização da quitosana associada ao glicerol fosfato no reparo de defeitos ósseos, o presente estudo teve por objetivo estudar o uso desse composto no processo de consolidação óssea, durante o reparo de defeitos ósseos críticos experimentalmente induzidos na diáfise do rádio de coelhos.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho de pesquisa foi conduzido de acordo com os princípios éticos na experimentação animal e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Ceua) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (Unesp), *Câmpus* de Jaboticabal, sob Protocolo n° 6.503/16.

Foram utilizados 15 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), fêmeas, da raça Nova Zelândia Branco, adultos (seis meses de idade) e peso corporal de $3,0 \pm 1,0$ kg, provenientes da cunicultura regulamentada. Todos os animais foram clinicamente avaliados e estavam saudáveis, livres de comorbidades ou alterações ortopédicas e locomotoras. Dois grupos experimentais foram compostos pelos

15 coelhos, representados por cada um dos membros torácicos de cada animal. O grupo biomaterial (GB) (n=15) foi constituído pelos raios tratados com o hidrogel de quitosana associado ao glicerol fosfato, enquanto que, o grupo controle (GC) (n=15) pelos raios que não receberam tratamento com o biomaterial.

Optou-se por utilizar o membro torácico direito para o grupo do biomaterial e o membro torácico esquerdo para o grupo controle. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três subgrupos, com cinco animais cada, os quais se diferenciaram quanto ao período de acompanhamento e de avaliação (30, 60 e 90 dias). O gel de quitosana foi obtido de acordo com o procedimento proposto por Chenite *et al.* (2000). Para tanto, 200mg de quitosana foram dissolvidos em 9mL de solução de ácido clorídrico 0,1M. À solução resultante, adicionaram-se, lentamente e sob agitação, 560mg de fosfato de glicerol dissódico, previamente dissolvidos em 1mL de água destilada, o que levou à formação de gel esbranquiçado. Após o preparo, o gel foi submetido à esterilização em autoclave, para posterior aplicação.

Todos os 15 animais foram submetidos ao mesmo protocolo anestésico. Os animais foram pré-medicados com midazolam (2mg/kg) associado à morfina (2mg/kg) e à cetamina (25mg/kg), por via intramuscular (IM). A indução anestésica foi realizada com isoflurano 100%, por meio de máscara facial. Enrofloxacina (5mg/kg), por via subcutânea (SC), foi aplicada como antibioticoterapia profilática 30 minutos antes do início do procedimento.

Os animais foram posicionados em decúbito dorsal, com os membros torácicos, devidamente tricotomizados, estendidos caudalmente. Procedeu-se à antissepsia do campo cirúrgico (clorexidina 2% e clorexidina alcóolica 0,5%) e à proteção da extremidade do membro com atadura, coberta posteriormente com

um dedo de luva, ambos estéreis. Após delimitação da área operatória com panos de campo, realizou-se incisão de aproximadamente 2,5cm sobre a pele, na região craniomedial do rádio, seguida de divulsão do tecido subcutâneo e da musculatura. Em ato contínuo, realizou-se ostectomia parcial de 1cm de extensão na diáfise radial, a 1,5cm da articulação radiocárpica, utilizando-se serra oscilatória e um especímetro para as mensurações.

Removeu-se o segmento do rádio, juntamente com seu periósteo, obtendo-se, dessa forma, falha óssea de 10 milímetros de extensão. A sutura da musculatura e do tecido subcutâneo foi realizada com fio de náilon cirúrgico 4-0, em padrão simples contínuo, seguida pela dermorrafia com náilon cirúrgico 4-0, em padrão simples separado. O mesmo procedimento cirúrgico foi realizado no rádio contralateral. Posteriormente, no local da falha óssea, realizou-se aplicação percutânea de 0,2mL de hidrogel de quitosana associado ao glicerol fosfato no rádio direito (grupo biomaterial – GB); mesma quantidade (0,2mL) de solução salina 0,9% foi aplicada no rádio esquerdo (grupo controle – GC). Ambos os procedimentos foram realizados de forma estéril, com auxílio de seringa de 1mL e agulha 40x12.

As feridas cirúrgicas foram avaliadas diariamente até o oitavo dia pós-cirúrgico. Hemorragia, secreção purulenta ou deiscência de sutura foram classificadas em ausente e presente. Edema foi considerado discreto quando se limitou ao local da incisão cirúrgica, moderado quando acometeu também a face lateral do membro, e intenso quando se estendeu por todo o membro. Foram realizadas radiografias nas projeções craniocaudal e mediolateral dos membros operados, no período pré-operatório, imediatamente após a cirurgia e aos 30, 60 e 90 dias pós-operatórios, objetivando-se avaliar a morfologia óssea dos rádios e acompanhar o processo de reparação óssea. Para avaliação da linha de fratura e do calo ósseo, foi empregada escala gradual de radiopacidade, proposta por

Azevedo (2011). Essa avaliação foi realizada por três avaliadores experientes, resultando em média da soma dos valores obtidos.

A densitometria óptica foi realizada nos momentos pré-operatório e 30, 60 e 90 dias pós-operatórios. Foi utilizada escala de alumínio, posicionada lateralmente à falha óssea, como referencial densitométrico, permitindo avaliar-se a densidade mineral óssea. As imagens radiográficas foram analisadas em *software* digital, a partir do qual se determinou a densidade óptica óssea em milímetros de alumínio (mmAl). Selecionou-se um ponto na área central de cada degrau da escala de alumínio, o qual teve sua tonalidade média de cinzas aferida, que variava de zero (totalmente negro) a 235 (totalmente branco). A sequência de medidas seguiu do primeiro degrau, mais fino (menos radiopaco), para o 10º, mais espesso (mais radiopaco). Posteriormente, selecionou-se um ponto na região de falha óssea de cada imagem radiográfica para medir a sua tonalidade de cinza (Figura 1)

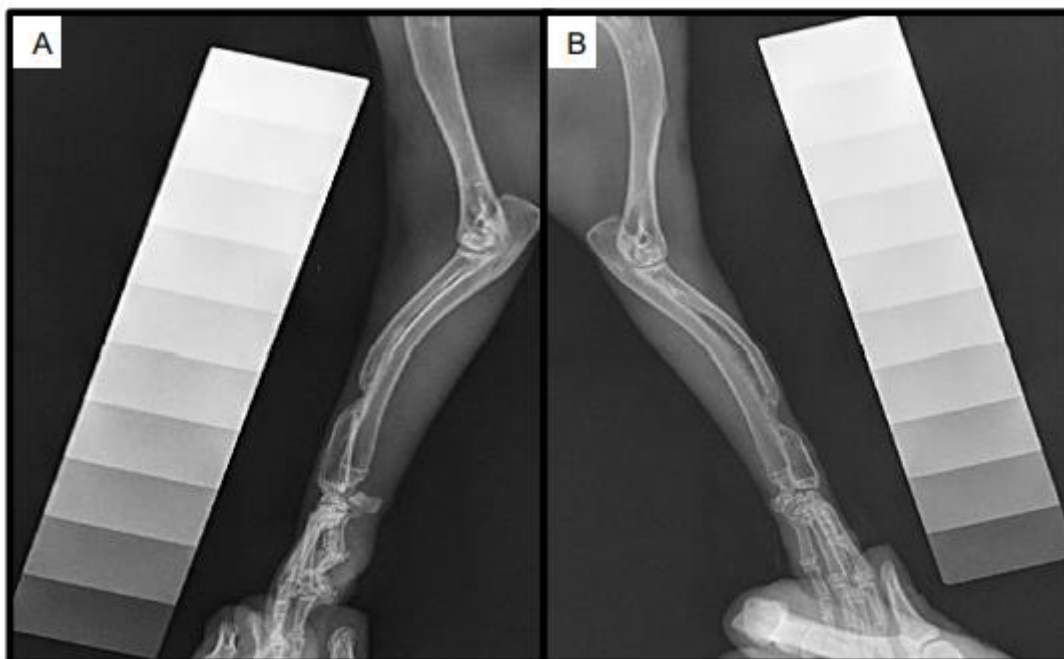


Figura 1: Imagens radiográficas lateromedial de membros torácicos de coelho submetido a falha óssea experimental exemplificando o referencial densitométrico (escada de alumínio (liga 6063, ABNT) 10 degraus). A: Biomaterial – GB. B: Controle – GC.

Após as eutanásias (30, 60 e 90 dias), retirou-se o terço médio de ambos os raios de cada animal, com auxílio de serra manual. Em ato contínuo, os fragmentos foram acondicionados em frascos contendo formalina tamponada a 10%, durante dois dias. Posteriormente, o material foi lavado em água corrente e descalcificado em solução de ácido fórmico a 5% e ácido clorídrico a 5%, durante 15 dias (Figura 2). Em seguida, os fragmentos foram incluídos em parafina líquida, depois cortados em fatias transversais de cinco micrômetros de espessura e montados em lâminas de vidro.



Figura 2: Imagem fotográfica de segmento de rádio direito de coelho submetido a falha óssea experimental (1cm) e posterior tratamento com aplicação de hidrogel de quitosana associado a glicerol fosfato (grupo biomaterial – GB) (60 dias PO). Seta indicando falha óssea. Asterisco (*) indicando formação de tecido fibroso.

De cada bloco, foram obtidas quatro lâminas, sendo essas submetidas às técnicas de hematoxilina-eosina (HE) para visibilização histológica por meio de microscópio óptico de luz com aumentos de 10x e 40x, avaliando-se a interface osso-implante, os graus de reação endosteal e periosteal, a proliferação e diferenciação celular no tecido cicatricial e a presença de tecido conjuntivo. Para avaliação histopatológica, foram atribuídos escores de 1 a 4 para cada parâmetro: tecido fibroso, tecido cartilaginoso, tecido ósseo, neovascularização e infiltrado inflamatório. Os escores de cada parâmetro foram somados, sendo 4 o valor mínimo (não união) e 20 o valor máximo (união óssea)

As variáveis foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis (não paramétrico), sendo consideradas significativas, para valores de p iguais ou inferiores a 0,05 ($P < 0,05$), as diferenças entre as medianas entre grupos, tempos, grupos dentro de tempos e tempos dentro de grupos.

RESULTADOS

Foram avaliados 30 membros torácicos (15 coelhos), sendo 15 raios do grupo biomaterial (GB) e 15 raios do grupo controle (GC). Não foram observadas complicações pós-operatórias como fístulas, secreções ou reações inflamatórias intensas durante o período de acompanhamento clínico dos animais. No oitavo dia de acompanhamento, todos animais apresentavam retorno funcional dos membros. As osteotomias apresentaram tamanho (1cm) e localização desejados em todos os animais. No que tange à análise radiográfica (Tab.1), os graus de radiopacidade entre os dois grupos após 30 dias de pós-operatório não foram estatisticamente diferentes ($P > 0,05$).

A média entre os grupos neste período foi de 1,86 e 1,80, respectivamente. A avaliação após 60 dias revelou médias de escore 2,3 no GB e 1,7 no GC. Após 90 dias, ambos os grupos apresentaram aumento no grau de radiopacidade óssea: grupo GB ($2,80 \pm 0,44$) e grupo GC ($1,80 \pm 0,40$). Na comparação geral das médias de grau de radiopacidade dos dois grupos, nos três períodos de avaliação, revelou-se maior média geral ($2,33 \pm 0,48$) para o GB, quando comparado ao GC ($1,77 \pm 0,06$), sendo estatisticamente significativo ($P < 0,05$).

Houve diferença estatística significante ($P < 0,05$) nos três períodos de avaliação pós-operatória para a avaliação da densitometria óptica (Tab. 2), tendo

o GB apresentou maior valor na comparação de médias com o GC, respectivamente: $6,207 \pm 1,374$ e $5,71 \pm 1,512$.

Tabela 1. Comparação das médias dos graus de radiopacidade entre os raios de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), fêmeas adultas, da raça Nova Zelândia Branco, avaliados dos grupos 1 (biomaterial – GB) e 2 (controle – GC), nos períodos pós-operatórios (30 dias, 60 dias e 90 dias)

Período	Grupo	Média	Mediana	Mínimo	Máximo
30 dias de	GB	1,87 ($\pm 0,35$)	2	1	2
Pós-operatório	GC	1,80 ($\pm 0,40$)	2	1	2
60 dias de	GB	2,30 ($\pm 0,48$)	2	2	3
Pós-operatório	GC	1,70 ($\pm 0,48$)	2	1	2
90 dias de	GB	2,80 ($\pm 0,44$)	3	2	3
Pós-operatório	GC	1,80 ($\pm 0,44$)	2	1	2

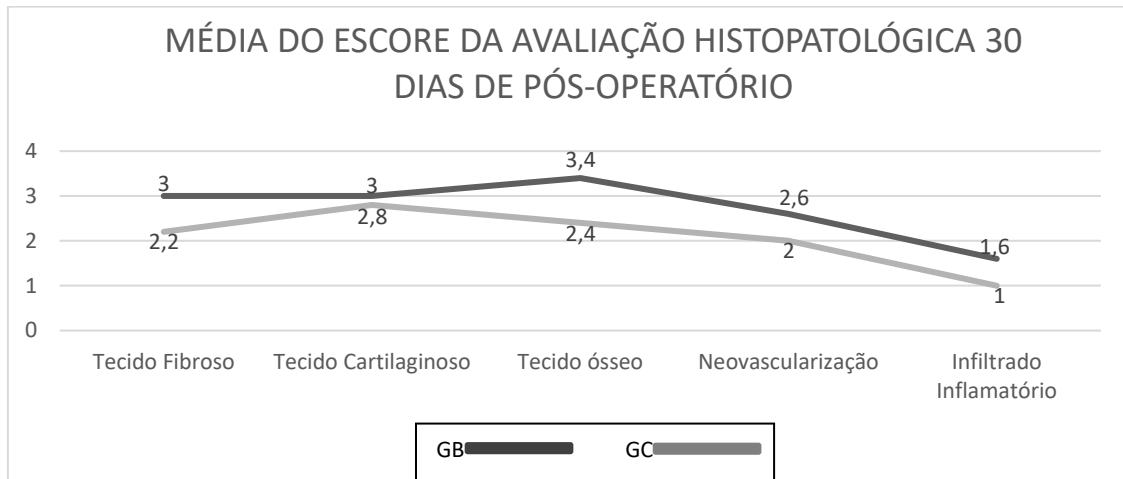
Médias realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis. Os resultados obtidos não foram estatisticamente significativos ($P > 0,05$).

Tabela 2. Comparação das médias dos graus de densitometria óptica em mmAl entre os raios de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), fêmeas adultas, da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos 1 (biomaterial – GB) e 2 (controle – GC), nos períodos pós-operatórios (30 dias, 60 dias e 90 dias)

Período	Grupo	Média	Mediana	Mínimo	Máximo
30 dias de	GB	4,91 ($\pm 0,83$)	5	3	6
Pós-operatório	GC	4,19 ($\pm 0,63$)	4	3	5
60 dias de	GB	6,08 ($\pm 0,72$)	6	5	7,2
Pós-operatório	GC	5,93 ($\pm 0,87$)	6,1	4	7
90 dias de	GB	7,64 ($\pm 0,47$)	7,5	7	8,2
Pós-operatório	GC	7,1 ($\pm 0,54$)	7	6,5	8

Médias realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis. Os resultados obtidos foram estatisticamente significativos ($P < 0,05$).

A média da soma do escore de cada parâmetro da avaliação histopatológica do GB foi superior à do GC nos períodos de 30 dias (GB: 13,6 e GC: 10,4) (Fig. 3), 60 dias (GB: 13,8 e GC: 10,8) (Fig. 4) e 90 dias (GB: 15,2 e GC: 11,0) (Fig. 5) e apresentou significância dos resultados, havendo superioridade geral do grupo em que se utilizou o biomaterial, comprovando-se, então, seu efeito positivo (Tab. 3).



Figura

3. Imagem de gráfico demonstrando a evolução da média do escore de avaliação histológica entre os raios de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), fêmeas adultas, da raça Nova Zelândia Branco, no primeiro período de avaliação (30 dias PO) para os grupos GB e GC. Médias realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis. Os resultados obtidos foram estatisticamente significativos ($P < 0,05$).

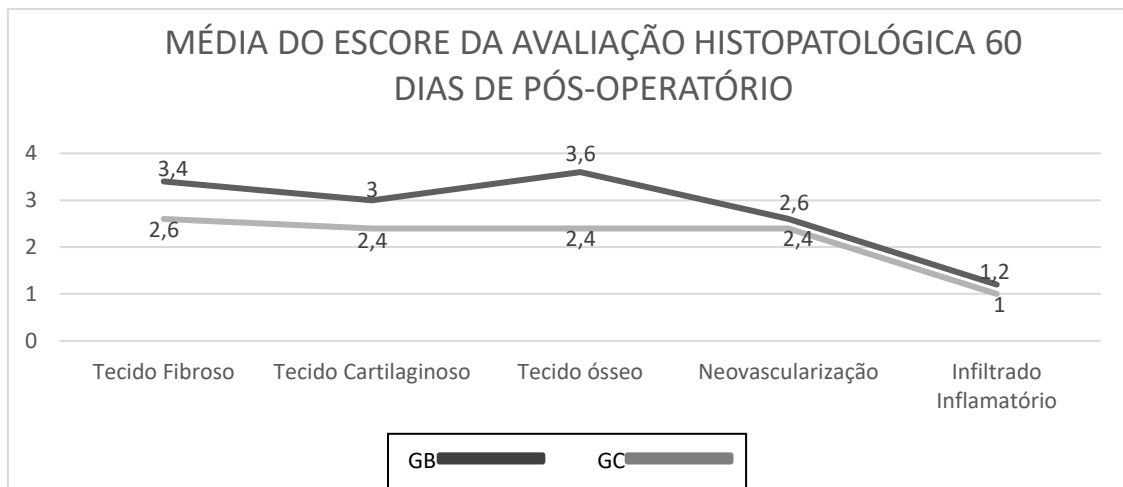


Figura 4. Imagem de gráfico demonstrando a evolução da média do escore de avaliação histológica entre os raios de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), fêmeas adultas, da raça Nova Zelândia Branco, no segundo período de avaliação (60 dias PO) para os grupos GB e GC. Médias realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis. Os resultados obtidos foram estatisticamente significativos ($P < 0,05$).

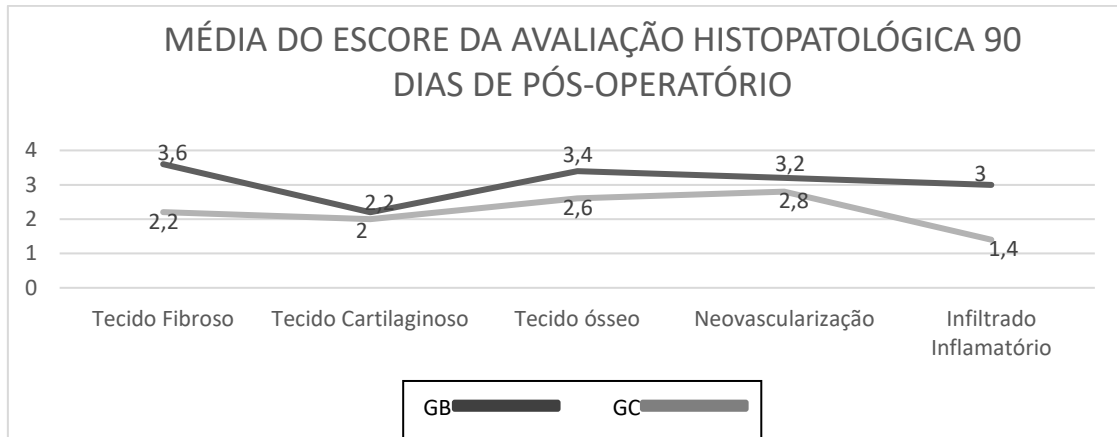


Figura 5. Imagem de gráfico demonstrando a evolução da média do escore de avaliação histológica entre os raios de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), fêmeas adultas, da raça Nova Zelândia Branco, no terceiro período de avaliação (90 dias PO) para os grupos GB e GC. Médias realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis. Os resultados obtidos foram estatisticamente significativos ($P < 0,05$).

Tabela 3. Comparação das médias da avaliação histopatológica entre os raios de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), fêmeas adultas, da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos GB e GC, nos períodos pós-operatórios (30 dias, 60 dias e 90 dias)

Período	Grupo	Média	Mediana	Mínimo	Máximo
30 dias de Pós-operatório	GB	13,6 ($\pm 1,94$)	13	12	17
	GC	10,4 ($\pm 0,89$)	10	10	13
60 dias de Pós-operatório	GB	13,8 ($\pm 1,78$)	13	13	4
	GC	10,8 ($\pm 1,64$)	10	9	4
90 dias de Pós-operatório	GB	15,2 ($\pm 4,49$)	15	13	19
	GC	11,0 ($\pm 2,0$)	10	9	14

Médias realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis. Os resultados obtidos foram estatisticamente significativos ($P < 0,05$).

A contagem de osteócitos e osteoblastos (Figura 5) foi significativamente superior no grupo controle comparado ao tratamento com quitosana ($p = 0,0044$; $p = 0,035$), 60 dias após a cirurgia. Ao longo do experimento o grupo controle apresentou maior número de osteócitos aos 60 pós-operatório (Fig.2A) em comparação aos 90 pós-operatório ($p = 0,0009$). Aos 90 pós-operatório, a análise das fotografias histológicas possibilitou identificar maior quantidade de tecido fibroso na região da falha óssea no grupo controle.

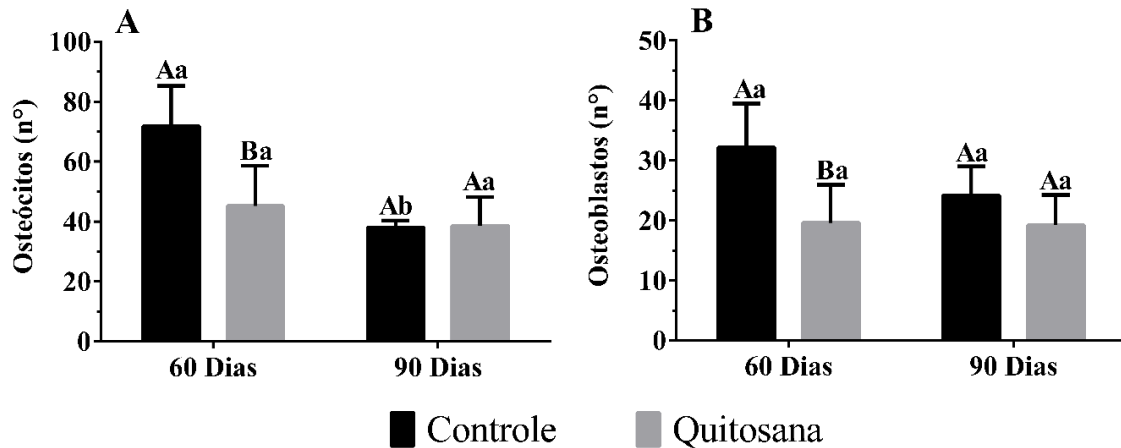


Figura 6. Valores médio (\pm DP) e ANOVA observados na contagem de osteócitos e osteoblastos em coelhos pós-cirurgia. Médias ($n = 10$ coelhos) seguidos da mesma letra não diferem no teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada período experimental. Letras minúsculas avaliam a evolução de cada tratamento ao longo do período experimental. Período experimental: 60 e 90 dias pós-operatório.

DISCUSSÃO

A quitosana vem sendo amplamente estudada nas áreas médicas, especialmente por ser considerada um polímero de alta bioatividade, biocompatibilidade e biodegradabilidade. Adicionalmente, mostra-se não tóxico ou imunogênico e, quando associado a outros biomateriais, apresenta potencial relevante para acelerar a cicatrização e a reparação de tecidos, como a pele, a cartilagem e o osso (Oryan e Sahvieh, 2017; Shakir *et al.*, 2018; Filgueira *et al.*, 2019). Em concordância com estudos realizados anteriormente e guardadas as devidas particularidades metodológicas, o presente estudo obteve resultados positivos com a administração do biomaterial composto por quitosana associada ao glicerol fosfato na regeneração óssea de falhas críticas.

Considerando a quantidade de deposição óssea no defeito de tamanho crítico observada, a qual se mostrou significativamente superior ao encontrado no grupo controle aos 60 dias de pós-operatório, valida-se a hipótese inicial de que a composição utilizada poderia trazer avanço na consolidação óssea. Assim como descrito por Shakir *et al.* (2018), evidencia-se aceleração do processo de regeneração com mínima interferência ou inflamação no período pós-operatório.

Os resultados obtidos das avaliações radiográficas adicionam sustentação à hipótese do potencial regenerativo do biomaterial. Ao se compararem os graus de radiopacidade entre os dois grupos, pôde-se observar diferença estatística significativa, com resultados mais satisfatórios no GB a partir dos 60 dias, a despeito dos achados mais precoces de Santana *et al.* (2014), os quais encontraram tais diferenças já aos 30 dias. Contudo, aos 60 dias de pós-operatório, os resultados apresentaram-se semelhantes aos do presente estudo, validando a característica de aceleração da regeneração óssea e de maiores graus de radiopacidade nos animais tratados.

Corroborando as citações acima, entretanto utilizando modelo experimental de falha não crítica no fêmur de ratos, Ho *et al.* (2015) evidenciaram maiores densidades radiográficas nos animais tratados com quitosana, o que indica melhor taxa regenerativa. Houve aumento da deposição e da espessura de osso trabecular. Tais resultados comprovam, por meios radiográficos, a progressão rápida de deposição óssea, tendo, por consequência, a consolidação em menor período de tempo.

A densitometria destaca-se por aprimorar a qualidade da avaliação do reparo ósseo. No estudo em tela, houve diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre os grupos nos três períodos de avaliação pós-operatória, sendo o GB superior ao GC. Resultados semelhantes foram encontrados por Shakir *et al.* (2018), ao utilizarem composto à base de quitosana em defeitos calvários críticos em ratos albinos, evidenciando maior atividade metabólica e osteoblástica do grupo tratado. Os resultados densitométricos favoráveis condizem com a influência positiva da quitosana sobre a morfologia tecidual, culminando em arquitetura favorável ao crescimento ósseo e à fixação biológica dos tecidos perilesionais, sem indução de resposta tóxica ou rejeição.

As análises histopatológicas evidenciaram superioridade do GB em todos os períodos avaliados, considerando-se a média da soma dos escores de cada parâmetro. Diferentemente dos animais do grupo controle, os quais apresentaram apenas certo

grau de proliferação óssea aos 60 dias, observou-se inflamação granulomatosa e tecido cartilaginoso com proliferação óssea nas avaliações dos animais tratados. A superioridade na atividade osteoblástica, na proliferação de tecido conjuntivo frouxo e nas formações de osso trabecular nas bordas da lesão, já aos 30 dias, caracteriza efeito osteocondutor do composto e valida tal hipótese. Adicionalmente, e da mesma forma que Santana *et al.* (2014), não foram identificados sinais compatíveis com processo infeccioso ou rejeição do material, caracterizando biocompatibilidade.

Os resultados da presente pesquisa, associados àqueles anteriormente citados por Kong *et al.* (2006), Ho *et al.* (2015) e Oryan e Sahviah (2017), sugerem que a associação de quitosana com o glicerol fosfato culmina em potencial efeito osteocondutor. Ampliação, aprimoramento e maior precocidade na regeneração óssea sustentam tal afirmação e validam essa hipótese. A quitosana caracteriza-se por ser um biomaterial que promove consolidação óssea de forma mais rápida e eficiente (Ahsan *et al.*, 2017). Ao se analisar a densidade mineral óssea, a radiopacidade e as características histopatológicas de animais tratados com gel à base de quitosana associado ao glicerol fosfato, puderam ser observados maior resposta e reparo ósseo, comprovando sua eficácia e utilidade na consolidação de defeitos ósseos críticos.

CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos, é possível afirmar que a quitosana associada ao glicerol fosfato constitui biomaterial de características desejadas, promovendo consolidação óssea mais rápida e de qualidade superior. Esses fatores podem contribuir, potencialmente, para a diminuição na morbidade pós-operatória e a aquisição de melhores resultados de consolidação óssea em cirurgias ortopédicas para tratamento de fraturas.

REFERÊNCIAS

- AHSAN, M.; EK, WE.; RASK-ANDERSEN, M. *et al.* The relative contribution of DNA methylation and genetic variants on protein biomarkers for human diseases. *PLoS Genet.*, v.13, n.9, 2017.
- AZEVEDO, A.S. *Utilização de fosfatos de cálcio, quitosana e medula óssea no reparo ósseo em coelhos. Estudo clínico-cirúrgico, radiológico e histológico.* 2011. 60f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB.
- CHENITE, A.; CHAPUT, C.; WANG, D. *et al.* Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. *Biomaterials*, v.21, p.2155-2161, 2000.
- FILGUEIRA, F.G.F.; MINTO, B.W.; CHUNG, D.G. *et al.* Platelet-rich plasma, bone marrow and chitosan in minimally invasive plate osteosynthesis of canine tibia fractures—a randomized study. *Vet. Med.*, v.64, p.309-316, 2019.
- GIANNOUDIS, P.V.; EINHORN, T.A.; MARSH, D. Fracture healing: the diamond concept. *Injury Int. J. Care Injured*, v.38, p.53-56, 2007.
- GÓMEZ-BARRENA, E.; ROSSET, P.; LOZANO, D. *et al.* Bone fracture healing: cell therapy in delayed unions and nonunions. *Bone*, v.70, p.93-101, 2015.
- HO, M.H.; YAO, C.J.; LIAO, M.H. *et al.* Chitosan nanofiber scaffold improves bone healing via stimulating trabecular bone production due to upregulation of the Runx2/osteocalcin/alkaline phosphatase signaling pathway. *Int. J. Nanomed.*, v.10, p.5941-5954, 2015.
- KONG, L.; GAO, Y.; LU, G. *et al.* A study on the bioactivity of chitosan/nano hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Eur. Polymer J.*, v.42, p.3171-3179, 2006.
- MI, F.L.; TAN, YC.; LIANG, H.F. *et al.* In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant. *Biomaterials*, v.23, p.181-191, 2002.
- ORYAN, A.; SAHVIEH, S. Effectiveness of chitosan scaffold in skin, bone and cartilage healing. *Int. J. Biol. Macromol.*, v.104, p.1003-1011, 2017.
- SANTANA, C.C.; NÓBREGA NETO, P.I.; SÁ, M.J.C. *et al.* Utilização do filme de quitosana na reparação de tendão em coelhos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.66, p.995-1002, 2014.
- SHAKIR, M.; JOLLY, R.; KHAN, A.A. *et al.* Resol based chitosan/nano-hydroxyapatite nanoensemble for effective bone tissue engineering. *Carbohydr. Polymers*, v.179, p.317-327, 2018.
- WINKLER, T.; SASS, F.A.; DUDA, G.N. *et al.* A review of biomaterials in bone defect healing, remaining shortcomings and future opportunities for bone tissue engineering: the unsolved challenge. *Bone Joint Res.*, v.7, p.232-243, 2018.
- WU, C.; SU, H.; KARYDIS, A. *et al.* Mechanically stable surface-hydrophobilized chitosan nanofibrous barrier membranes for guided bone regeneration. *Biomed. Mater.*, v.13 p.15004, 2018.

WU, J.; SU, Z.; MA, G. A thermo-and pH-sensitive hydrogel composed of quaternized chitosan/glycerophosphate. *Int. J. Pharm.*, v.35, p.1-11, 2006.

3. DISCUSSÃO

Estudos sobre o uso de biomateriais para reparo de falhas ósseas têm sido cada vez mais executados na Ortopedia Veterinária. O interesse por formas de minimizar o tempo de recuperação e consequente reabilitação do animal vêm ganhando cada vez mais importância, uma vez que os cuidados intensivos acabam sendo por um menor tempo, diminuindo o trabalho para os proprietários. Oryan e Sahviah (2017) e Shakir e colaboradores (2017) descrevem a quitosana como polímero de alta bioatividade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, atóxico e característica não imunogênicas, que, associada a outros biomateriais, aceleram a cicatrização e reparo de tecidos como a pele, cartilagem e osso. Wu e colaboradores (2018) observaram que a quitosana é mecanicamente estável, citocompatível, imunocompatível e degradável tornando-se excelente material para reparo ósseo e uso na engenharia de tecidos. Corroborando com os autores acima, na avaliação clínica, os animais tratados (GB) apresentaram menor escore médio, sendo esse composto pelas avaliações de dor à manipulação, edema e claudicação. O que evidencia uma melhor recuperação no pós-operatório e consequente melhor regeneração óssea, uma vez que a reação inflamatória exacerbada foi menor quando comparada ao GC. O GB também se apresentou superior ao GC em todas as outras análises. A avaliação radiográfica permitiu a comparação dos graus de radiopacidade entre os dois grupos, podendo verificar se houve formação óssea e em que grau e qualidade ocorreu. Na primeira avaliação, com 30 dias de pós-operatório, não teve diferença estatística significativa entre os GB e GC (Tabela 2). Entretanto, em períodos mais avançados, com 60 e 90 dias pós cirúrgico, houve diferença estatística significativa entre os dois grupos, sendo o grupo de biomaterial com resultados superiores (Figuras 3 e 4).

Os resultados das análises de densitometria óptica permitiram avaliar a densidade mineral óssea, portanto, possibilitou observar se o reparo ósseo ocorreu de maneira correta. Semelhante às demais análises, ocorreu diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre os grupos nos três períodos de avaliação pós-operatória (Tabela 3) (Figura 9), sendo o GB com médias superiores ao GC (Figura 10). Por último, pôde ser observado nas análises histopatológicas que a média da soma do

escore de cada parâmetro da avaliação histopatológica do GB foi superior à do GC (Figura 11) em todos os períodos (Figuras 12, 13 e 14; Tabela 4). Na análise histopatológica também pode ser observado que animais tratados com a quitosana já apresentaram inflamação granulomatosa e tecido cartilaginoso com proliferação óssea aos 60 dias de pós operatório (Figuras 16 e 17), enquanto que o Grupo Controle apresentou certo grau de proliferação óssea apenas 60 dias após indução da falha óssea (Figura 15).

Shakir e colaboradores (2017) em estudo realizado com camundongos, observaram que o grupo tratado com a quitosana houve maior atividade metabólica e osteoblástica. De forma semelhante, no presente estudo, o grupo tratado com a quitosana também apresentou maior atividade osteoblástica, sendo essa evidenciada pela maior radiopacidade e densidade mineral óssea. Outra similaridade entre ambos foi que o grupo tratado com quitosana apresentou melhor formação óssea, evidenciado pela radiografia.

Oryan e Sahviah (2017) afirmam que a influência da quitosana pura no reparo de falhas ósseas promove resultados insatisfatórios, entretanto, este biomaterial com outra apresentação, como por exemplo em gel, ou associado a algum componente, promove regeneração óssea mais rápida e de boa qualidade. O que ocorreu na presente pesquisa: a quitosana em forma de gel associada ao glicerol fosfato apresentou regeneração óssea mais rápida.

Durante o reparo ósseo, os pedaços de cartilagem que formam a ponte entre os fragmentos vão sendo substituídos pelo calo ósseo ou osso primário, seguida pela formação de osso com estrutura lamelar típica (CROCI et. al, 2003; KRAUS e KIRKER-HEAD, 2006; KNIGHT e HANKENSON, 2013). Como comprovado por Ahsan e colaboradores (2017), a quitosana é um biomaterial que promove essa regeneração óssea de forma mais rápida. Portanto, ao se analisar a densidade mineral óssea, a radiopacidade e as características histopatológicas, pode ser observado reparo ósseo em estágios mais avançados quando tratado com a quitosana, o que ocorreu nesse estudo.

4. CONCLUSÃO

A partir de todas as análises foi verificado a superioridade do reparo ósseo no grupo tratado com o biomaterial, se comparado com o grupo controle. Com os resultados obtidos, é possível afirmar que a quitosana associada ao glicerol fosfato constitui um biomaterial de características desejadas, promovendo um reparo ósseo mais rápido e de qualidade superior. O que contribui para a queda na morbidade pós operatória em cirurgia ortopédica para reparo de fraturas. Portanto, assim como descrito pelos autores acima, a quitosana se mostrou um material de alta qualidade para reparo ósseo.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos sobre o uso de biomateriais para reparo de falhas ósseas têm sido cada vez mais executados na Ortopedia Veterinária. O interesse por formas de minimizar o tempo de recuperação e consequente reabilitação do animal vêm ganhando cada vez mais importância, uma vez que os cuidados intensivos acabam sendo por um menor tempo, diminuindo o trabalho para os proprietários. Oryan e Sahvieh (2017) e Shakir e colaboradores (2017) descrevem a quitosana como polímero de alta bioatividade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade e característica não imunogênicas, que, associada a outros biomateriais, aceleram a cicatrização e reparo de tecidos como a pele, cartilagem e osso. Wu e colaboradores (2018) observaram que a quitosana é mecanicamente estável, citocompatível, imunocompatível e degradável tornando-se excelente material para reparo ósseo e uso na engenharia de tecidos.

6. REFERÊNCIAS¹

AHSAN, M.; EK, W.E.; RASK-ANDERSEN, M.; KARLSSON, T.; LIND-THOMSEN, A.; ENROTH S. The relative contribution of DNA methylation and genetic variants on protein biomarkers for human diseases. **PLoS Genet.** v.13, n.9, 2017.

CROCI, A. T.; CAMARGO, O. P.; BITAR, G.; PEREIRA, S. L. B.; MOREIRA, M.; JUNIOR, S. F. Efeito do Concentrado de Plasma em Falhas Ósseas Provocadas em Fêmures de Camundongos como Estimulação de Formação Óssea. Estudo Experimental. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.11, n.4, p.230-239, 2003.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Color textbook of histology.** v.2. Philadelphia: WB Saunders Company, p.416-434, 2001.

GIANNOUDIS, P. V.; EINHORN, T. A.; MARSH, D. Fracture healing: The diamond concept. **Injury - International Journal of the Care of the Injured**, v.38, n.4, p.53-56, 2007.

GRONINGEN, J. M. V.; SCHUURMAN, A. H. Treatment of post-traumatic degenerative changes of the radio-carpal and distal radio-ulnar joints by combining radius, scaphoid, and lunate (RSL) fusion with ulnar head replacement. **European Journal of Plastic Surgery**, v.34, n.6, p.465-469, 2011.

JACKSON, L. C.; PACCHIANA, P. D. Common Complications of Fracture Repair. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.19, n.3, p.168-179, 2004.

KNIGHT, M. N.; HANKENSON, K. D. Mesenchymal Stem Cells in Bone Regeneration. **Advances in Wound Care**, v.2, n.6, p.306-316, 2013.

KRAUS, K. H.; KIRKER-HEAD, C. Mesenchymal Stem Cells and Bone Regeneration. **Veterinary Surgery**, v.35, n.3, p.232-242, 2006.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 23 p.

MANDALESON, A.; THAM, S. K.; LEWIS, C.; ACKLAND, D. C.; EK, E. T. Scaphoid Fracture Fixation in a Nonunion Model: A Biomechanical Study Comparing 3 Types of Fixation. **The Journal of Hand Surgery**, doi: 10.1016/j.jhsa.2017.10.005.

MI, FL.; TAN, YC.; LIANG, HF.; SUNG, HW. In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant. *Biomaterials*, v.23, n.1, p.181-191, 2002.

ORYAN, A.; SAHVIEH, S. Effectiveness of chitosan scaffold in skin, bone and cartilage healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.06.124>, 2017.

SHAKIR, M.; JOLLY, R.; KHAN, A. A.; AHMED, S. S.; ALAM, S.; RAUF, M. A.; OWAIS, M.; FAROOQI, M. A. Resol based chitosan/nano-hydroxyapatite nanoensemble for effective Bone tissue engineering. *Carbohydrate Polimers*, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.09.103>, 2017.

VERTENTEN, G.; GASTHUYS, F.; CORNELISSEN, M.; SCHACHT, E.; VLAMINCK, L. Enhancing bone healing and regeneration: present and future perspectives in veterinary orthopaedics. In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant, v.23, n.3, p.153–162, 2010.

WU, C.; SU, H.; KARYDIS, A.; ANDERSON, K. M.; GHADRI, N.; TANG, S.; WANG, Y.; BUMGARDNER J. D. Mechanically stable surface-hydrophobilized chitosan nanofibrous barrier membranes for guided bone regeneration. **Biomedical Materials**, v.13, 2018.