



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA HUMANA

TESE DE DOUTORADO

**AVALIAÇÃO IN VITRO E IN VIVO DE MATRIZES DE
QUITOSANA COMO ARCABOUÇO TRIDIMENSIONAL PARA
REGENERAÇÃO ÓSSEA**

RHYNA CARLA DA CUNHA COSTA

Salvador
2008



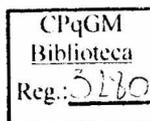
004071

RHYNA CARLA DA CUNHA COSTA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE MATRIZES DE
QUITOSANA COMO ARCABOUÇO TRIDIMENSIONAL PARA
REGENERAÇÃO ÓSSEA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia/Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Patologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiana Paim Rosa



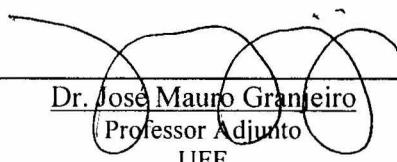
Salvador
2008

"Avaliação *in vitro* e *in vivo* do comportamento de matrizes de quitosana como arcabouço tridimensional para regeneração óssea "

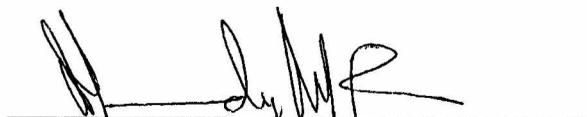
RHYNA CARLA DA CUNHA COSTA

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. José Mauro Granjeiro
Professor Adjunto
UFF



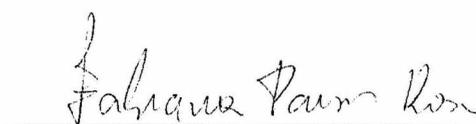
Dr. Alexandre Malta Rossi
Pesquisador Titular
CBPF-RJ



Dr. Nelson Gnoatto
Professor Adjunto
FBDC



Dr. Eduardo Antônio Gonçalves Ramos
Pesquisador Titular
FIOCRUZ



Dr.ª Fabiana Paim Rosa
Professora Adjunta
UFBA

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Costa, Rhyna Carla da Cunha

C837a Avaliação *in vitro* e *in vivo* do comportamento de matrizes de quitosana como arcabouço tridimensional para regeneração óssea [manuscrito] / Rhyna Carla da Cunha Costa. - 2008.

174f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Tese (doutorado) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina.
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2008.

Orientadora: Dr^a. Fabiana Paim Rosa, Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais (LBTB), Instituto de Ciências da Saúde (ICS), Universidade Federal da Bahia (UFBA).

1. Bioengenharia. 2. Quitosana. 3. Regeneração Óssea. 4. Rato. I. Título.

CDU 544.773.432:616.71

Dedico este trabalho...

A minha mãe, Raquel Santos Pinto da Cunha, sempre, amiga e eternamente amada. Orgulho-me de ser sua filha e agradeço-lhe, de forma quase indizível, pelo apoio incondicional e por jamais me permitir ousar desistir dos meus sonhos.

Ao meu pai, Haroldo Murilo Pinto da Cunha, de quem me orgulho profundamente, agradeço o exemplo de determinação e a presença constante na minha vida.

A minha filha, Paula Carolina, que pela sua tenra idade, ainda não compreende as minhas horas de ausência e que, ainda assim, me presenteia com a pureza do seu sorriso. Obrigada, meu grande amor.

Agradecimentos

À Prof^ª. Dr^ª. Fabiana Paim Rosa, minha orientadora, pela parceria ao longo dessa trajetória.

À Dr^ª. Isabel Maria Santana Ramos de Freitas Amaral, do Departamento do Instituto de Engenharia Biomédica INEB – Universidade do Porto – Portugal, pelo preparo, caracterização e desenvolvimento das matrizes de quitosana e colágeno utilizadas neste trabalho, como também, pelo acompanhamento em todas as etapas dos ensaios *in vitro*.

Ao Prof. Dr. Mário Barbosa, Diretor Científico do Instituto de Engenharia Biomédica INEB – Universidade do Porto – Portugal, pelo acolhimento e receptividade quando da minha estada em Porto, Portugal.

À Prof^ª. Dr^ª. Merriem Lamghari, pesquisadora do Instituto de Engenharia Biomédica INEB – Universidade do Porto – Portugal, e quem colaborou de forma intensa para a emergência dos resultados desta tese, sempre, com um belo sorriso no rosto.

Ao Dr. Rui Fernandes, chefe do laboratório de Histologia e Microscopia do Instituto de Biologia Molecular e Celular da Universidade do Porto - Portugal, pelo acompanhamento, boa vontade e receptividade na execução do preparo histológico e imunohistoquímico dessa tese.

A Dr^ª. Paula Sampaio, chefe do Serviço de Microscopia Confocal do Instituto de Biologia Molecular e Celular da Universidade do Porto - Portugal, pela atenção e acompanhamento dispensados.

A Prof^ª. Dr^ª. Cristina Ribeiro, pesquisadora do Instituto de Engenharia Biomédica INEB – Universidade do Porto – Portugal, quem também colaborou com esse trabalho e quem nos trata de forma especialmente carinhosa. Obrigada também à sua família, Eduardo e Francisca.

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

Ao Prof. Dr. Vítor Fortuna, do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) pela atenção e disponibilidade, e ainda, pelo auxílio na execução dos ensaios *in vitro*.

Ao grande parceiro de trabalho, nos ensaios *in vivo*, Prof. Flávio Augusto Aquino Carvalho, pela forma como lidamos com as horas árduas de muito trabalho, sem nos distanciarmos do bom humor e do espírito de equipe. O meu mais sincero agradecimento. Você é muito bem vindo ao rol de amigos queridos.

Ao amigo Prof. Fúlvio Borges Miguel, pelo companheirismo, amizade e solidariedade ao longo de todos esses anos.

A Eliane Santos da Silva, minha funcionária, quem compartilhou comigo muitas das viagens a Maceió e muitos dos sorrisos que demos. O meu especial carinho.

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

À funcionária Cristina Vasconcelos, do CPqGM – Fiocruz, pelo cuidado e atenção durante o processamento histotécnico das lâminas apresentadas neste trabalho. A Elisabeth, sua auxiliar direta, pelo bom humor e boa vontade com o nosso trabalho. As nossas muitas horas juntas e, em adição, as nossas muitas horas de risos durante a execução dos trabalhos.

Ao funcionário Cristovão Vasconcelos, do Laboratório de Biomateriais do Instituto de Ciências da Saúde – ICS / UFBA, pelo carinho e cuidado com a minha pessoa e, também, pela alegria com que sempre nos comunicamos.

A Lucilene Brito pelo auxílio inestimável.

A minha amiga querida e muito amada, Marluce Souza, que com palavras sempre carinhosas e edificantes, fez da minha jornada, um caminho especialmente prazeroso.

Aos amigos queridos, Rosália, Ana Karina Cardoso, Isabela Barreto, Edmália Barreto, Linda Maria, Victor Luiz, Lutero Silva, Flavia Bassi, Raimundo Fonseca, pessoas que estimo demais e que alegam a minha vida.

Ao sempre doce amigo, Wladimir Matos Soares, que ao longo desses últimos dois anos, acompanhou o nosso trabalho, sempre nos estimulando e nos apoiando, sem que, em momento algum, duvidasse de que conseguiríamos atingir nossos objetivos.

A Markus Fabrício Santil, exemplo de determinação, coragem e força de vida, quem teve uma participação muito importante nas nossas vidas, quando do período que estivemos em Portugal, eu, Paula, minha filha e Eliane, sua babá. Você é figura presente em nossos corações e para SEMPRE!!!

RESUMO

Na primeira parte desse estudo, foi avaliada *in vitro* a influência de 2 diferentes graus de N-acetilação (DA) de matrizes tridimensionais (3D) de quitosana sobre a viabilidade, adesão, distribuição e proliferação de células mesenquimais extraídas da medula óssea de ratos (rBMSC`s), assim como, a influência do soro autólogo de rato (RS), sobre os mesmos aspectos, como fonte de proteínas e fatores de crescimento. Para tanto, 10 animais foram utilizados para extração do RS e das rBMSC`s. As células foram semeadas e induzidas a osteodiferenciação sobre matrizes 3D de quitosana, com FBS (Soro Fetal Bovino) e sem adição do RS. Na segunda parte dessa análise, foi analisado *in vivo* o comportamento biológico de matrizes 3D de quitosana para a regeneração óssea, com DA`s de 4 e 15%, quando implantadas em defeitos com morfologia e dimensões críticas, criados em calvária de rato. Utilizou-se 80 animais, distribuídos em 4 grupos, com 5 animais cada, avaliados nos pontos biológicos de 7, 15, 45 e 120 dias. Os grupos foram divididos em: GI Controle – Sem implantação de biomaterial; GII - Implantação de matriz de quitosana 4%; GIII - Implantação de matriz de quitosana 15%; GIV - Implantação de matriz de colágeno tipo I. Os espécimes foram fixados e incluídos em blocos de resina e cortados em micrótomo de alto impacto, para tecidos não descalcificados e corados em H/E, Picrosírius Red e Tricrômio de Masson Goldner para avaliação histológica em microscopia de Luz. Também, foram confeccionados blocos em parafina para análise imunohistoquímica da formação vascular utilizando-se PECAM-1. Os resultados *in vitro* demonstraram que as rBMSC`s apresentaram-se viáveis quando cultivadas nos 2 tipos de soro. Mais ainda, as rBMSC`s aderiram e proliferaram sobre as matrizes de quitosana, em especial sobre a de 4%. Em adição, os achados sugeriram que o RS apresenta as proteínas e fatores necessários para o crescimento das rBMSC`s. Quando analisado o comportamento biológico das matrizes 3D *in vivo*, concluiu-se que, muito embora, as matrizes tenham sido consideradas biocompatíveis, e que tenham tido a sua região central permeada por vasos sanguíneos, não foi encontrada formação óssea *de novo* nos sítios de implantação.

Palavras-Chave: Bioengenharia; Quitosana; Regeneração Óssea; Rato.

ABSTRACT

In the first part of this study, an *in vitro* evaluation was made of the influence of 2 different grades of N-acetylation (DA) of tridimensional matrixes (3D) of chitosan on the viability, adhesion, distribution and proliferation of mesenchyme cells extracted from the bone marrow of rats (rBMSC`s), as well as the influence of autologous rate serum (RS), on the same aspects, as a source of proteins and growth factors. For this purpose, 10 animals were used for the extraction of RS and rBMSC`s. The cells were seeded and induced to osteodifferentiate on 3D chitosan matrixes, with FBS (Fetal Bovine Serum) and with the addition of RS. In the second part of this analysis, the biologic behavior of the 3D chitosan matrixes was analyzed *in vivo* for bone regeneration, with DA`s of 4 and 15%, when implanted in defects with critical morphology and dimensions, created in rat calvarias. Eighty animals distributed into 4 groups with 5 animals in each were used, and evaluated at the biological time points of 7, 15, 45 and 120 days. The groups were divided as follows: GI Control – Without biomaterial implantation; GII – Implantation of chitosan matrix at 4%; GIII – Implantation of chitosan matrix at 15%; GIV – Implantation of collagen type I matrix. The specimens were fixed and embedded in blocks of resin, and cut in a high impact microtome for non decalcified tissues, and stained with H/E, Picrosirius Red and Goldner`s Masson Trichrome for histomorphometric evaluation under light microscopy. Paraffin blocks were also made for immunohistochemical analysis of the vascular formation, using PECAM-1. The results *in vitro* demonstrated that the rBMSC`s presented as viable when cultivated in the 2 types of serum. Furthermore, the rBMSC`s adhered and proliferated on the chitosan matrixes, especially on the one with 4%. In addition, the findings suggest that RS presents the proteins and growth factors necessary for the growth of the rBMSC`s. When the biologic behavior of the 3D matrixes were analyzed *in vivo*, it was concluded that although the matrixes had been considered biocompatible, and also had their central regions permeated by blood vessels, no *de novo* bone formation was found at the implantation sites.

Key Words: Bioengineering; Chitosan; Bone regeneration; Rat.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Representação esquemática da estrutura molecular da quitina e quitosana. Azevedo e outros, 2007.	41
Figura 2 –	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das biomatrizes 3D planas de quitosana e colágeno. Imagens correspondentes aos cortes seccionais transversais das biomatrizes preparadas: (a e b) quitosana 4%; (c e d) quitosana 5%; (e e f) colágeno tipo I.	65
Figura 3 –	Matriz de Quitosana corada com Tricrômio de Masson (20x). Microscópio de Contraste de Fase. <i>Leica</i> , Alemanha.	66
Figura 4 –	Matriz de Colágeno tipo I corada com Tricrômio de Masson (20x). Microscópio de Contraste de Fase. <i>Leica</i> , Alemanha.	66
Figura 5 –	Cortador metálico utilizado para recortar as matrizes 3D de quitosana e colágeno tipo I no diâmetro interno de 8 mm.	68
Figura 6 –	Rato anestesiado previamente à extração do sangue (a) e durante a punção intracardiaca (b).	70
Figura 7 –	Lavagem do canal medular de fêmur e tibia de rato com meio de cultura α -MEM suplementado com FBS (10%), fungizona (10%) e Penicilina / Estreptomicina (10%) (a) e do precipitado celular (<i>pellet</i>) após centrifugação do meio com as rBMSC`s (b).	70
Figura 8 –	Curva padrão para a quantificação de DNA a partir de células extraídas do timo de bezerro. Quantificação realizada a partir da utilização do Kit DNA-QF e <i>Hoechst 33258</i> , Sigma.	75
Figura 9 –	Incisão bicoronal na calvária do animal (a) e posicionamento da trefina circular, durante a realização do procedimento de transfixação da calvária do animal (b).	79
Figura 10 –	Vista superior do defeito crítico após remoção do bloco ósseo (a) e Implantação da biomatriz 3D no defeito crítico criado na calvária do animal (b).	79
Figura 11 –	Desenho esquemático da vista frontal do defeito criado na calvária do animal (a), da vista lateral (b). Detalhe do recorte da peça e das linhas de referência utilizadas para o seu recorte (c).	81
Figura 12 –	Desenho esquemático, da área seccional do defeito, após corte no micrótomo.	83

Figura 13 –	Morfologia das rBMSC's cultivadas em TCPS; 14 dias após a semeadura e cultivo com meio osteogênico enriquecido: a) RS b) FBS. Microscópio Óptico Invertido de Contraste de Fase, <i>Leica</i> , Alemanha.	89
Figura 14 –	Análise da viabilidade das rBMSC's 14 dias após a semeadura e cultivo com meio osteogênico enriquecido com RS e FBS. Quitosana 4%: a) RS b) FBS; quitosana 15%: c) RS d) FBS; Colágeno: e) RS. Microscópio Confocal (<i>Laser Scanning Confocal Microscope – Leica Microsystems, Germany</i>). Reta de calibração=100µm.	92
Figura15 –	f-actina (verde) e DNA (vermelho) das rBMSC's, após 14 dias de cultivo em meio osteogênico sobre TCPS: a) RS b) FBS. Sobre matriz 3D de quitosana 4%: c) RS d) RS e) FBS f) FBS. Microscópio Confocal (<i>Laser Scanning Confocal Microscope – Leica Microsystems, Germany</i>). Reta de calibração=100µm.	95
Figura 16 –	f-actina (verde) e DNA (vermelho) das rBMSC's, após 14 dias de cultivo em meio osteogênico sobre matriz 3D de quitosana 15% enriquecido com RS: a) Borda da matriz b) Centro da Matriz c) Centro da Matriz d) Centro da Matriz e enriquecido com FBS: e) Borda da matriz f) Centro da Matriz. Microscópio Confocal (<i>Laser Scanning Confocal Microscope – Leica Microsystems, Germany</i>). Reta de calibração=100µm.	97
Figura 17 –	f-actina (verde) e DNA (vermelho) das rBMSC's, após 14 dias em meio osteogênico sobre matriz 3D de colágeno enriquecido com RS: a) Borda da matriz; b, c) Centro da Matriz; Centro da Matriz e enriquecido com FBS: e) Borda da matriz f) Centro da Matriz. Microscópio Confocal (<i>Laser Scanning Confocal Microscope – Leica Microsystems, Germany</i>). Reta de calibração=100µm.	99
Figura 18 –	Análise quantitativa da adesão das rBMSC's cultivadas em diferentes matrizes 3D, após 24h de incubação, com RS e FBS, determinada pelo conteúdo de DNA.	101
Figura 19 –	Análise quantitativa da proliferação das rBMSC's cultivadas sobre TCPS, após 4, 7 e 14 dias de incubação, com RS e FBS, determinada pelo conteúdo DNA.	102
Figura 20 –	Análise quantitativa da proliferação das rBMSC's cultivadas sobre quitosana 4%, após 4, 7 e 14 dias de incubação, com RS e FBS, determinada pelo conteúdo DNA.	103
Figura 21 –	Análise quantitativa da proliferação das rBMSC's cultivadas sobre quitosana 15%, após 4, 7 e 14 dias de incubação, com RS e FBS, determinada pelo conteúdo DNA.	104

Figura 22 –	Análise quantitativa da proliferação das rBMSC's cultivadas sobre colágeno, após 4, 7 e 14 dias de incubação, com RS e FBS, determinada pelo conteúdo DNA.	105
Figura 23 –	GI 7D. a) HE - Aspecto da borda do defeito, com proliferação óssea reparativa.; b) MASSON – Área central do defeito com hemorragia, edema e vasos sangüíneos. Legenda: Retalho (R); Tecido Conjuntivo (TC); Dura-máter (DM); Borda Óssea (BO).	110
Figura 24 –	GI 15D HE. Área central do defeito, preenchida por tecido conjuntivo fibroso. Legenda: Tecido Conjuntivo (TC); Dura-máter (DM); Borda Óssea (BO); Veia central (VC).	110
Figura 25 –	GI 45D HE. Aspecto da área central e da borda do defeito. Tecido fibroso com redução linear da espessura . Legenda: Tecido Conjuntivo (TC); Dura-máter (DM); Borda Óssea (BO); Veia central (VC).	110
Figura 26 –	GI 45D. a) GOLDNER – Área central do defeito. Presença de células fusiformes e hemossiderina; b) MASSON – Área Central do defeito. Tecido conjuntivo frouxo, vasos sangüíneos e células fusiformes. Legenda: Tecido conjuntivo (TC); Célula fusiforme (CFU); Hemossiderina (HS); Vaso sangüíneo (VS).	111
Figura 27 –	GI 120D HE. Borda óssea com proliferação óssea reparativa estável. Legenda: Tecido conjuntivo (TC); Dura-máter (DM); Borda óssea (BO); Núcleo de mineralização (NM).	111
Figura 28 –	Fotografias do Grupo I, sem implantação de biomaterial, coradas pelo Tricrômico de Masson, em diferentes pontos biológicos: a) 7 dias b) 45 dias. Ampliação: 8x.Lupa Olympus, Japão. Legenda: Extensão linear do defeito (ELD).	111
Figura 29 –	GII 7D HE. a) Região próxima à borda óssea, com deposição de tecido conjuntivo na interface borda-quitosana 4%; b) Reação inflamatória com mononucleares e polimorfonucleares, associada ao biomaterial. Legenda: Tecido conjuntivo (TC); Quitosana (CH); Interface (ITF);Borda óssea (BO); Hemácia (HC); Polimorfonuclear (PMN); Célula gigante (CG).	113
Figura 30 –	GII 7D HE. a) - Presença de cápsula fibrosa delimitando o biomaterial. Deposição de matriz de permeio à quitosana 4%; b) Células gigantes de permeio ao biomaterial. Legenda: Tecido conjuntivo (TC); Quitosana (CH); Cápsula Fibrosa (CF); Célula Gigante (CG).	113

- Figura 31 – GII 7D. a) PIFIG – Reação inflamatória e tecido conjuntivo com migração centrípeta em resposta ao biomaterial; b) Ampliação da figura anterior. Destaque para a deposição centrípeta de tecido conjuntivo fibroso. Legenda: Retalho (R); Dura-máter (DM); Quitosana (CH); Cápsula Fibrosa (CF); Célula Gigante (CG). 113
- Figura 32 – GII 7D. a) PIFG Luz Polarizada. Detalhe da figura anterior, em que a quitosana 4% aparece em branco e o colágeno em rosa, sob luz polarizada; b) PIFIG – Ampliação da figura anterior. Fibras colagênicas de permeio à quitosana. Presença de reação granulomatosa. Legenda: Tecido conjuntivo (TC); Quitosana (CH); Célula gigante (CG). 114
- Figura 33 – GII 7D. a) PIFG - Fragmentos da quitosana 4%. Presença de células mononucleares e deposição de fibras colagênicas; b) GOLDNER – Áreas de hemorragia de permeio à quitosana 4%. Legenda: Tecido conjuntivo (TC); Quitosana (CH); Célula gigante (CG); Hemácia (HC). 114
- Figura 34 – a) GOLDNER – Quitosana 4% associada a deposição de tecido conjuntivo, presença de células inflamatórias e fibroblastóides; b) MASSON – Deposição de fibras colágenas de permeio ao biomaterial, direção centrípeta. Legenda: Tecido conjuntivo (TC); Quitosana (CH); Cápsula fibrosa (CF); Célula fusiforme (CF). 114
- Figura 35 – GII 15D. a) HE – Deposição de tecido conjuntivo fibroso de permeio à quitosana 4%; b) GOLDNER - Presença de tecido conjuntivo fibroso e reação granulomatosa na periferia, células fusiformes e capilares sangüíneos em resposta ao biomaterial. Legenda: Tecido Conjuntivo (TC); Célula-gigante (CG). 116
- Figura 36 – GII 15D. a) GOLDNER – Ampliação da figura anterior; posição de tecido conjuntivo fibroso de permeio à quitosana 4%; b) MASSON – Deposição de fibras colágenas em direção centrípeta associada à presença do biomaterial. Legenda: Tecido Conjuntivo (TC); Célula-gigante (CG); Cápsula fibrosa (CF). 116
- Figura 37 – GII 45D. a) HE – Tecido conjuntivo fibroso de permeio ao biomaterial e células gigantes circundando os fragmentos da quitosana 4%; b) GOLDNER – Biomaterial fragmentado, reação granulomatosa e deposição de tecido conjuntivo. Presença de vasos sangüíneos. Legenda: Tecido conjuntivo (TC); Célula gigante (CG); Célula fusiforme (CFU); Vaso sangüíneo (VS); Quitosana (CH). 118
- Figura 38 – GII 45D GOLDNER. a) Vasos sangüíneos, células fusiformes, células gigantes e tecido conjuntivo fibroso de permeio à quitosana 4% em fragmentação ; b) Células gigantes e mononucleares associadas à quitosana, presença de células fusiformes e vasos sangüíneos. Legenda: Tecido conjuntivo (TC); Célula gigante (CG); Célula fusiforme (CFU); Vaso 118

sangüíneo (VS); Quitosana (CH).

- Figura 39 – GII 45D. a) PIFIG – Migração centrípeta de tecido conjuntivo associado à quitosana 4%; endênciã de migração de células gigantes. Biomaterial em fragmentação ; b) MASSON – Área central do defeito. Presença de células gigantes e fibras colágenas. Legenda: Tecido conjuntivo (TC); Célula gigante (CG); Quitosana (CH); Cápsula fibrosa (CF). 118
- Figura 40 – GII 120D HE. a) Extensa fragmentação da quitosana 4%, com grande deposição de tecido conjuntivo de permeio; b) Fragmentação da quitosana 4% com presença de células gigantes. Legenda: Tecido Conjuntivo (TC); Quitosana (CH); Célula gigante (CG); Célula fusiforme (CFU). 120
- Figura 41 – GII 120D GOLDNER. a e b) Quitosana 4% bem fragmentada, com deposição de tecido conjuntivo fibroso, e reação granulomatosa associada. Legenda: Tecido Conjuntivo (TC); Quitosana (CH); Célula gigante (CG); Célula fusiforme (CFU). 120
- Figura 42 – GII 120D PIFG. Deposição de tecido conjuntivo fibroso de forma a delimitar a quitosana 4%. Legenda: Tecido Conjuntivo (TC); Quitosana (CH); Célula gigante (CG); Cápsula fibrosa (CF); Retalho (R). 120
- Figura 43 – Fotografias do Grupo II, coradas em HE (c) e pelo Tricrômico de Masson, em diferentes pontos biológicos: a) 7 dias b) 15 dias c) 45 dias. Ampliação: 8x, exceto a ilustração (b): 6,3X. Lupa *Olympus*, Japão. Legenda: Borda óssea (BO); Tecido conjuntivo (TC); Quitosana (CH); Interface (ITF). 121
- Figura 44 – GIII 7D. PIFIG. Matriz 3D de quitosana 15% em início de degradação. Legenda: Retalho (R); Dura-máter (DM); Tecido conjuntivo (TC); Quitosana (CH). 123
- Figura 45 – GIII 7D GOLDNER. Intensa reação inflamatória associada à quitosana 15%. Legenda: Retalho (R); Dura-máter (DM); Vaso sangüíneo (VS); Quitosana (CH). 123
- Figura 46 – GIII 7D MASSON. Presença de células inflamatórias e hemorragia de permeio ao biomaterial. Legenda: Quitosana (CH); Hemácias (HC). 123
- Figura 47 – GIII 15D HE. a) Presença de tecido conjuntivo frouxo e vasos sangüíneos associados à superfície da quitosana 15%. Intensa atividade macrófagica ao redor do biomaterial; b) Presença de tecido conjuntivo na interface borda óssea reparativa e biomaterial. Legenda: Tecido conjuntivo (TC); Borda óssea (BO); Quitosana (CH); Cápsula fibrosa (CF). 125

- Figura 48 – GIII 15D. a) HE - GIII 15D HE. Quitosana 15% em fragmentação progressiva, com infiltrado inflamatório por polimorfonucleares e mononucleares e reação granulomatosa; b) PIFIG - Tecido conjuntivo fibroso encapsulando a quitosana 15%. Legenda: Tecido conjuntivo (TC); Borda óssea (BO); Quitosana (CH); Cápsula fibrosa (CF); Retalho (R); Dura-máter (DM); Osso novo (ON). 125
- Figura 49 – GIII 15D. a) PIFIG - Detalhe da figura anterior, com biomaterial bastante fragmentado, circundado na periferia por tecido conjuntivo fibroso e rara matriz colagênica em direção ao centro do defeito; b) MASSON - Tecido conjuntivo fibroso encapsulando a quitosana 15%. Legenda: Tecido conjuntivo (TC); Quitosana (CH); Cápsula fibrosa (CF); Célula gigante (CG); Vaso sanguíneo (VS). 125
- Figura 50 – GIII 45D PIFIG. Fragmentação do biomaterial com raras fibras colágenas de permeio. Legenda: Tecido conjuntivo (TC); Quitosana (CH). 127
- Figura 51 – GIII 45D GOLDNER. Fragmentos da quitosana 15% com células inflamatórias de permeio, circundados, na sua periferia, por tecido conjuntivo fibroso. Legenda: Tecido conjuntivo (TC); Quitosana (CH); Célula gigante (CG); Célula fusiforme (CFU). 127
- Figura 52 – GIII 45D MASSON. Área central do defeito. Cápsula fibrosa delimitando o biomaterial. Raras fibras colágenas de permeio à quitosana 15%. Legenda: Cápsula fibrosa (CF); Quitosana (CH). 127
- Figura 53 – GIII 120D HE. a) Região de interface borda óssea-defeito, com interposição de tecido conjuntivo fibroso; b) Presença de fragmentos da quitosana 15% circundada por tecido conjuntivo fibroso. Legenda: Osso antigo (OA); Tecido conjuntivo (TC); Retalho (R); Dura-máter (DM); Cápsula fibrosa (CF). 129
- Figura 54 – GIII 120D HE. a) Fragmentos da quitosana 15% na região central do defeito, circundados por tecido conjuntivo fibroso; b) Reação inflamatória gigante-celular ao redor dos fragmentos da quitosana 15%. Legenda: Tecido conjuntivo (TC); Retalho (R); Dura-máter (DM); Quitosana (CH); Célula gigante (CG). 129
- Figura 55 – GIII 120D PIFG. Tecido conjuntivo fibroso denso delimitando fragmentos da quitosana 15%. Raras fibras colágenas de permeio a estes fragmentos. Legenda: Tecido conjuntivo (TC); Quitosana (CH); Cápsula fibrosa (CF). 129

Figura 56 –	GIII 120D MASSON. Diferentes pontos biológicos: a) 15 dias b) 45 dias c) 120 dias. Ampliação: 8x. Lupa <i>Olympus</i> , Japão. Legenda: Quitosana (CH); Cápsula fibrosa (CF); Osso antigo (OA).	130
Figura 57 –	GIV 7D. a) MASSON – Reação inflamatória intensa associada a presença da matriz de colágeno; b) HE – Mononucleares de permeio à matriz de colágeno.	134
Figura 58 –	GIV 15D. a) HE – Presença de células gigantes de permeio ao colágeno; b) PIFIG - Fragmentação do biomaterial. Legenda : Matriz de colágeno (COL); Cápsula fibrosa (CF); Tecido conjuntivo (TC); Célula gigante (CG).	134
Figura 59 –	GIV 45D. a) MASSON – Presença de tecido conjuntivo e vasos sangüíneos; b) PIFIG - Tecido conjuntivo e células inflamatórias de permeio ao biomaterial. Legenda : Matriz de colágeno (COL); Cápsula fibrosa (CF); Tecido conjuntivo (TC); Célula gigante (CG).	134
Figura 60 –	GIV 120D HE. Presença de tecido conjuntivo preenchendo o defeito. Legenda: Tecido conjuntivo (TC); Borda óssea (BO).	136
Figura 61 –	Fotografias do Grupo IV, coradas pelo Tricrômico de Masson, em diferentes pontos biológicos: a) 7 dias b) 45 dias. Ampliação: 8x. Lupa <i>Olympus</i> , Japão. Legenda: Matriz de colágeno (COL).	136
Figura 62 –	GI 7 dias. Vasos sanguíneos marcados com PECAM-1: a) Imagem da interface do defeito b) Controle Negativo para PECAM -1.	138
Figura 63 –	GIV 7 dias. Vasos sanguíneos marcados com PECAM-1: a) Área central do defeito; defeito; b) Controle Negativo.	138
Figura 64 –	GII 45 dias. Fotografias da Matriz 3D de quitosana 4% permeada com vasos sanguíneos marcados com PECAM-1 na interface do defeito.	138
Figura 65 –	GIII 120 dias. Vasos sangüíneos permeando a matriz 3D de quitosana 15%. Marcação para PECAM-1. Imagens da interface do defeito.	139

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de animais de acordo com os grupos e pontos biológicos (dias).	62
Tabela 2 - Seqüência do protocolo de processamento histológico em resina metil-metacrilato (BARRETO, 2006).	83
Tabela 3 – Composição das soluções I, II e III utilizadas nas etapas VI, VII e VIII durante o processamento histológico para inclusão dos espécimes em resina metilmetacrilato (BARRETO, 2006).	83

LISTA DE QUADROS

- Quadro1 – Caracterização das biomatrizes 3D planas, antes da hidratação, em termos de porosidade, densidade e diâmetro dos poros, determinadas pela análise de degradação líquida e microscopia eletrônica de varredura (MEV). DA: *Degree of acetylation* (Grau de acetilação). 64

Lista de Abreviaturas e Siglas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
β	Beta
°C	Graus Celsius
μm	Micrômetro
mm	Milímetro
AL	Alagoas
BA	Bahia
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i> - Proteína Óssea Morfogenética
CESMAC	Centro de Estudo Superiores de Maceió
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
cm	Centímetro
CPqGM	Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz
3D	Tridimensional
FCBS	Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
g	gramas
GAG	Glicosaminoglicana
HA	Hidroxiapatita
HE	Hematoxilina-eosina
ICS	Instituto de Ciências da Saúde
INEB	Instituto de Engenharia Biomédica
mL	Militro
mm	Milímetro
mm	Milímetro
n°	Número
NEPE	Núcleo de Ensino e Pesquisa
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> – Tampão fosfato salino

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
2 REVISÃO DE LITERATURA	32
3 HIPÓTESES	55
4 OBJETIVOS	58
4.1 Objetivos gerais	58
4.2 Objetivos específicos	59
5 DESENHO EXPERIMENTAL E MÉTODOS	59
5.1 Amostra	61
5.2 Fornecimento das Matrizes Tridimensionais	63
5.2.1. PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS MATRIZES	63
5.2.2. RECORTE E ESTERILIZAÇÃO DAS MATRIZES	67
5.3 Ensaio <i>in vitro</i>	68
5.3.1EXTRAÇÃO DO SANGUE E PREPARO DO RS	68
5.3.2 EXTRAÇÃO DAS rBMSC's	69
5.3.3 EXPANSÃO E DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA <i>IN VITRO</i> DAS rBMSC's	71
5.3.4 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR	72
5.3.5AVALIAÇÃO DO ORGANIZAÇÃO DO CITOESQUELETO	73
5.3.6 ENSAIO PARA QUANTIFICAÇÃO DE DNA	73
5.4 Ensaio <i>in vivo</i> – Implante das matrizes 3D de quitosana e colágeno na calvária de ratos <i>Wistar Albinus</i>	76
5.4.1 ANESTESIA E PREPARO DOS ANIMAIS	76
5.4.2 CONFECÇÃO DO DEFEITO CRÍTICO	76
5.4.3 IMPLANTAÇÃO DAS MATRIZES 3D DE QUITOSANA E COLÁGENO	77
5.4.4 OBTENÇÃO DAS PEÇAS	80
5.4.5 CLIVAGEM DAS PEÇAS	80
5.4.6 FIXAÇÃO DAS PEÇAS	81

5.5 Processamento Laboratorial	82
5.5.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA	82
5.5.2 IMUNOHISTOQUÍMICA	85
6 RESULTADOS	87
6.1 Análises <i>in vitro</i>	87
6.1.1 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR	90
6.1.2 AVALIAÇÃO DO CITOESQUELETO	93
6.1.3. ENSAIO PARA QUANTIFICAÇÃO E DNA UTILIZANDO-SE <i>HOECHST</i> 33258	100
6.1.3.1 Avaliação da Adesão Celular	100
6.1.3.2 Avaliação da Proliferação Celular	101
6.2 Análise <i>in vivo</i>	106
6.2.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA	106
6.2.1.1 Grupo I em diferentes pontos biológicos	106
6.2.1.2 Grupo II em diferentes pontos biológicos	112
6.2.1.3 Grupo III em diferentes pontos biológicos	122
6.2.1.4 Grupo IV em diferentes pontos biológicos	131
6.2.2 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA	137
7 DISCUSSÃO	141
8 CONCLUSÃO	161
REFERÊNCIAS	165
ANEXO A	176

COSTA, Rhyna Carla da Cunha, *Avaliação in vitro e in vivo do comportamento de matrizes de quitosana como arcabouço tridimensional para regeneração óssea*. 2008, 176 fls. Tese (Doutorado em Patologia), Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia/Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz, Salvador.

Autorizo a reprodução parcial ou total deste trabalho para fins de
comutação bibliográfica.

Salvador, 18 de agosto de 2008.

Rhyna Carla da Cunha Costa

1 INTRODUÇÃO

A Bioengenharia Tecidual e a Medicina Regenerativa compõem novas áreas que investigam técnicas de reparação e regeneração teciduais a partir de marcadores naturais e componentes do próprio organismo, como presença de células mesenquimais e fatores de crescimento (ROSE e OREFFO, 2002). Assim, são duas vertentes de especial interesse e de mudanças céleres, a qual envolve progressos exponenciais, principalmente, na medida em que pesquisadores, envidando esforços para o avanço das bases científicas que as norteiam, aproximam-se da aplicação clínica do objeto de sua investigação, elaborando, por conseguinte, novos parâmetros para produção de tecidos *in vitro*, assim como, para a elaboração de procedimentos que envolvam reparo e regeneração teciduais *in vivo*. Em contraste com outros tecidos, como a cartilagem, o osso é remodelado de forma ininterrupta, durante toda a vida. Quando lesões ou defeitos ósseos ocorrem, nas mais variadas situações clínicas, a reconstrução tecidual, devolvendo integridades estrutural, funcional e mecânica, constitui num passo necessário para a reabilitação do paciente. A maior parte dessas lesões, em virtude do seu potencial de regeneração espontâneo, repara-se adequadamente pelo emprego de terapias

conservadoras ou técnicas cirúrgicas convencionais. No entanto, procedimentos de substituição óssea são freqüentemente necessários, especialmente, em Ortopedia e em intervenções bucomaxilofaciais, quando da existência de traumas extensos, defeitos pós-cirúrgicos de dimensões críticas e deformidades ósseas congênitas (CANCEDDA e outros, 2002).

Técnicas de enxertia, sejam elas autógenas, homogêneas ou heterogêneas, têm sido, portanto, tradicionalmente utilizadas como manobras curativas, não obstante, a existência de restrições impostas as mesmas, como obstáculos éticos e de compatibilidade imunitária, pequena disponibilidade de substância óssea nos sítios doadores, reentradas cirúrgicas, por vezes, freqüentes, elevada morbidade, e custo social e financeiro consideráveis.

Diante desse contexto, e na busca de se contornar tais situações clínicas, torna-se premente a utilização de protocolos que possibilitem a regeneração do tecido ósseo, ainda que em sítios considerados inóspitos, dentre eles aqueles acima ventilados, e em adição, em regiões com aporte sanguíneo comprometido, de difícil consolidação, em zonas onde o osso é conduzido a se formar em condições isentas de carga e/ou onde o tecido esteja completamente ausente (BOYAN e outros, 1999), de forma a que haja mínimo impacto para o restabelecimento estrutural e funcional da área atingida.

Reforça-se, assim, o conceito atual que respalda e incrementa as técnicas inerentes à Medicina Regenerativa e, mais especificamente, à Bioengenharia Tecidual Óssea, na medida em que é estabelecida a necessidade de que sejam desenvolvidos materiais de preenchimento, não unicamente biocompatíveis, mas também bioabsorvíveis, e que estruturalmente mimetizem a matriz extracelular, sendo capaz de interagir com células

osteoprogenitoras e moléculas de sinalização. Dentre outros atributos, tais biomateriais, considerados verdadeiros arcabouços de inserção celular, não unicamente devam contribuir para a adesão, proliferação e diferenciação das células que em sua direção migrem, mas também, devam ser capazes de permitir a invasão e crescimento vascular no sítio de sua implantação (BRUDER e CAPLAN, 2000), como um dos fundamentos básicos e essenciais para o estabelecimento do processo de regeneração tecidual.

Desta forma, o crescimento ósseo resultante do transplante de células autógenas, combinado com a utilização de matrizes tridimensionais bioabsorvíveis tem se constituído numa das técnicas mais promissoras, especialmente em cirurgias craniofaciais (SCHANTZ e outros, 2003).

Inserida neste cenário da Bioengenharia Tecidual está a quitina, biopolímero extraído primariamente de crustáceos, e que tem sido considerado pela comunidade científica, um candidato potencial para aplicações biomédicas em diversas áreas, especialmente quando se apresenta na forma de seu derivado químico, ou seja, na sua forma deacetilada, conhecida como quitosana, a qual tem se mostrado particularmente útil como polímero de emprego em protocolos que envolvem reparo tecidual, e de forma análoga, como veículo de liberação de fármacos, uma vez que, apresenta-se como um polissacarídeo catiônico singular, de presumível biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioadesão, com inexistente toxicidade e reações de imunogenicidade de pequena intensidade, além de atividade antibacteriana e antifúngica. Ademais, a sua similitude com a estrutura das glicosaminoglicanas, um dos principais constituintes da matriz extracelular, e o seu decorrente potencial osteocondutor, fazem-na despontar como um biomaterial de aparente

aplicabilidade clínica, especialmente na medida em que as investigações avancem e as suas características físico-químicas sejam esquadrinhadas (KHOR e LIM, 2003).

Parece-nos inquestionável, portanto, a necessidade da implementação de estudos complementares na investigação da resposta tecidual, mais especificamente, na osteogênese e formação vascular, a partir da inserção de matrizes, como as de quitosana, especialmente, em defeitos considerados críticos e em modelo animal. Acentua-se, portanto, que a partir da determinação da estrutura físico-química desse biopolímero, e da sua possível interferência na adesão, migração e proliferação de células osteoblásticas e endoteliais, possa ser reforçado e estabelecido o seu emprego como um biomaterial de excelência na Bioengenharia Tecidual Óssea.

Fundamentados por todos essas ponderações, engaja-se o trabalho desenvolvido pela nossa equipe multiinstitucional, o qual teve como objetivo primário a avaliação do comportamento biológico de matrizes 3D de quitosana, em dois diferentes graus de acetilação, e em dois modelos experimentais distintos, *in vitro* e *in vivo*, respectivamente, na regeneração óssea.

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

A Bioengenharia Tecidual tem sido primariamente definida como uma área que colige os princípios científicos que visam promover o desenho, a construção, modificação e crescimento de tecidos vivos pela utilização de biomateriais, implante de células e fatores celulares, de forma conjunta ou isolada (LANGER e VACANTI, 1993).

Sob essa perspectiva, a engenharia do tecido ósseo requer, essencialmente, a conjunção de três elementos centrais: a presença de um arcabouço osteocondutivo, aliado a uma inesgotável fonte de células osteoprogenitoras que respondam, por fim, a presença de seletos fatores osteoindutivos, disponibilizados, inclusive, por adequada malha vascular. Assim, compreender a função celular, o papel da matriz extracelular e a forma como a interação entre esses dois componentes ocorre, são conceitos-chave para o desenvolvimento de materiais que possam promover a desejada viabilidade das células envolvidas na fisiologia tecidual, mais especificamente, na fisiologia óssea (ROSE e OREFFO, 2002).

Importante ressaltar, que a formação óssea é orquestrada por uma cascata de eventos, a qual se inicia com o recrutamento e proliferação de

células osteoprogenitoras seguida por sua diferenciação celular, formação osteóide e mineralização (AUBIN e LIU, 1996). A ocorrência de tais eventos é facultada pelo fato do tecido ósseo se apresentar como um tipo especializado de tecido conjuntivo, formado por células, nomeadamente, osteócitos, osteoblastos, e osteoclastos, além de uma matriz óssea, cuja fração inorgânica é representada majoritariamente por íons de cálcio e fosfato. Esses íons formam cristais que, em estudos de difração de raios X, mostraram ter a estrutura da hidroxiapatita, com a seguinte composição estequiométrica: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. A sua fração orgânica inclui, além do colágeno, glicoproteínas e proteoglicanas, as quais presumivelmente atuam de forma ímpar na fase de mineralização do tecido (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2005). Apesar da sua resistência às pressões e da sua dureza, conferidas pela presença da referida hidroxiapatita e fibras colágenas do tipo I, o tecido ósseo é extremamente plástico, remodelando-se de forma contínua, em razão das demandas funcionais a que está submetido.

A capacidade do osso em regenerar é fundamentada, por sua vez, pela presença de células indiferenciadas, localizadas normalmente em suas superfícies, interna e externa, nominadas, respectivamente, de endóstio e perióstio (TRIFFITT, 1996) e que respondem, como visto, a agentes indutivos. O seu crescimento consiste na formação de tecido ósseo novo, promovido pela produção da fração orgânica, a partir da atividade osteoblástica, associada à reabsorção parcial de tecido já formado, viabilizada pela ação de hidrolases e colagenases, além de ácidos fracos, secretados pelos osteoclastos. A atividade dos osteoclastos, por sua vez, é coordenada pela ação de citocinas e por

hormônios, como a calcitonina e paratormônio (PTH) (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2005).

Como visto anteriormente, acredita-se que durante a osteogênese, a produção de células da linhagem osteogênica seja controlada por uma complexa seqüência de sinais moleculares a qual envolve, não somente controle genético, como também a própria regulação gênica (SODEK e CHEIFETZ, 2000). As proteínas ósseas morfogenéticas (BMP), inicialmente caracterizadas pela sua habilidade em eliciar formação óssea e cartilaginosa em sítios ectópicos, são consideradas moléculas sinalizadoras importantes na osteoindução (ROSEN; COX; HATTERSLEY, 1996). Essas citocinas são capazes, não apenas, de induzir diferenciação de células mesenquimais em distintas linhagens celulares, como também, promover diferenciação de tais unidades celulares em osteoblastos. Estudos *in vitro* têm demonstrado que as BMP regulam a expressão de fatores de transcrição específicos e críticos para o estabelecimento da rota osteogênica, tais como, o Cbfa1 e o Osf2 (*Core Binding Factor a 1 e Osteoblast Specific Factor*) (DUCY e outros, 1997).

Notadamente, existe uma íntima conexão entre fatores genéticos, físicos e bioquímicos, na fisiologia do tecido ósseo, e, mais especificamente, entre as células que o caracterizam, a matriz que as condiciona e a malha vascular que as permeia. Há muito, a importância dos vasos sanguíneos na formação óssea foi reconhecida, muito embora, ao longo de muitos anos, as pesquisas nessa área tenham centrado atenção, muito mais no papel das células osteoblásticas na produção da matriz óssea, do que na interferência da vascularização na homeostasia tecidual. Sabe-se, atualmente, que muitos fatores de crescimento relacionados à osteogênese, estimulam direta ou

indiretamente, a angiogênese, como, por exemplo, o VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*). Apenas para evidenciar essas afirmações, tanto o VEGF quanto a BMP-2 estimulam a diferenciação osteoblástica, tendo o VEGF papel importante na inibição da apoptose desse tipo celular. Diante desse singular, porém, contundente exemplo, não há como serem desconectados os mecanismos que disparam as cascatas metabólicas inerentes a angiogênese e a concomitante formação de tecido ósseo *de novo* (CARANO e FILVAROFF, 2003).

No entanto, a proliferação e diferenciação de células osteoprogenitoras parecem não estar unicamente regulada por fatores solúveis, exercendo a matriz extracelular, por meio de suas moléculas constituintes, dentre elas, colágeno e fibronectina, desde os estágios iniciais, papel primário na seqüência de eventos que culmina com o endereçamento de células indiferenciadas para as rotas de estabelecimento da linhagem ostogênica. E, como já mencionado, em estágios mais tardios, genes associados com a maturação da matriz óssea passam a ser expressos de forma mais acentuada. Esse é o caso da fosfatase alcalina (ALP), cujo aumento na expressão gênica faculta a subsequente mineralização da matriz de colágeno. Também, o gene para a osteopontina (OPN) passa a ser expresso em altos níveis, seguido do gene para a sialoproteína óssea e osteocalcina (OCN), o que se mantém durante a maturação óssea e o subsequente aprisionamento dos osteoblastos em osteócitos (AUBIN, 2000).

Parece-nos inequívoco, portanto, o papel exercido pela matriz extracelular, na formação do tecido ósseo, em todos os seus estágios, especialmente quando se ressalta o fato de que as células mesenquimais

indiferenciadas, presentes nas suas superfícies, encontram-se, inicialmente, descomprometidas de participação em uma rota de linhagem específica e que isso se torna viável consoante a expressão gênica dos agentes osteoindutores, uma vez que tais células têm potencial biológico para se diferenciar em fibroblastos, adipócitos, osteoblastos, condroblastos e células reticulares (TRIFFITT, 1996).

Assim, muito embora, o osso apresente potencial regenerativo, este não é ilimitado. Diante de situações clínicas pouco favoráveis à reabilitação estrutural e funcional do tecido, tais como, áreas de extenso comprometimento vascular e/ou perda ou ausência excessiva de substância óssea, a saber, na presença de defeitos ósseos, considerados críticos à regeneração tecidual, sejam eles resultantes de traumas, infecções, neoplasias ou anomalias de desenvolvimento, o reparo da lesão originariamente presente no tecido ósseo pode resultar na formação de tecido conjuntivo fibroso ou cicatricial, na maior parte dos casos com comprometimento estrutural e/ou funcional da região atingida (GONÇALVES; GUIMARÃES; GARCIA, 1998; LIM; LEE; YEO, 2000; SEAL; OTERO; PANITCH, 2001).

Na tentativa de se contornar o estabelecimento do tecido cicatricial em resposta ao dano ósseo, técnicas de enxertia têm sido utilizadas, e o enxerto autógeno, ainda na atualidade, responde pela manobra mais empregada em protocolos de reconstrução óssea (FINKEMEIER, 2002; KHAN e outros, 2000). Em condições consideradas ideais, o tecido ósseo é transferido do sítio doador para o sítio receptor, onde se espera que o mesmo seja integrado e remodelado, reconstituindo anátomo-funcionalmente a área em foco. No entanto, a limitada quantidade de tecido ósseo no sítio doador,

assim como, a elevada morbidade inerente ao procedimento, eventuais reentradas cirúrgicas, potencial risco de infecção e a própria absorção do tecido transplantado, configuram entre as restrições impostas à técnica (KHAN e outros, 2000; LANE e outros, 1999).

Avançando-se mais um pouco pela busca de manobras curativas mais efetivas e com menor custo biológico implícito, especialmente, considerando-se que a maior parte das lesões ósseas tratadas anualmente, em todo o mundo, requerem o emprego de técnicas de enxertia (EINHORN, 1999), aliada ao fato de que os enxertos alográficos, passíveis de utilização, trazem também, no bojo de sua técnica, restrições relativas a imunogenicidade e possibilidades de contaminação, reforça-se a necessidade do desenvolvimento de materiais de preenchimento com características físico-químicas que possibilitem aos mesmos, não apenas a sua integração ao microambiente em foco, de forma compatível a ocorrência dos fenômenos biológicos que se impõem e que são próprios do processo de reparo tecidual, mas também, e idealmente, que interajam ativamente com os componentes moleculares e celulares presentes no local (DIETMAR e GARCIA, 2005). Em razão desses atributos são denominados de biomateriais. No contexto da Bioengenharia Tecidual Óssea, o biomaterial adequado é aquele que, ao ser inserido no sítio sob necessidade de reconstrução, funcione como um arcabouço estrutural para a migração, adesão e proliferação de células osteoprogenitoras e para a deposição de matriz óssea, e enquanto suporta tal atividade biológica, apresente taxa de absorção compatível com o reparo tecidual desejado. Em adição, que tenha parâmetros microestruturais, tais como, textura e carga superficial, porosidade e conexões entre os poros, que possibilitem a inserção

vascular e o trânsito de moléculas sinalizadoras (MASTROGIACOMO e outros, 2005). Sendo de origem natural ou sintética, os biomateriais podem se apresentar de diversas formas (WILLIAMS 1985; VASCONCELOS e outros, 2003), inclusive sob arranjo bidimensional (2D) ou na forma de matriz 3D (BALGUDE e outros, 2001; CURTIS e WILKINSON, 1999; RAJNICEK e outros, 1997; RANUCCI e MOGHE, 2001; ZELTINGER e outros, 2001). Apenas para ressaltar, alguns estudos (ELSDALE, 1972; ROSKELLEY, 1995; ZAMIR e outros, 1999; CUKIERMAN e outros, 2001) já demonstraram que matrizes 3D parecem atuar de forma mais fisiológica, sendo mais efetivas em mediar adesão celular do que as 2D. Evidencia-se o trabalho de Zamir e colaboradores (1999), os quais, a partir da realização de ensaio de quantificação de adesão celular, 10 minutos após a semeadura sobre estruturas bidimensionais e 3D, demonstraram que os arcabouços 3D são mais eficientes em promover migração, adesão e proliferação celulares, além de, viabilizarem com menor intervalo de tempo a aquisição do fenótico celular.

Polímeros sintéticos biodegradáveis, assim como, polímeros naturais, são as duas categorias de biomateriais usualmente mais utilizadas no preparo de arcabouços para a Bioengenharia Tecidual Óssea. Como exemplo dos primeiros, pode-se citar o ácido poli-lático (PLA), o ácido poli-glicólico (PGA) e seu co-polímero, o ácido poli-lático-glicólico (PLGA). O colágeno e, mais recentemente, a quitosana, são representantes da segunda categoria (LIU e outros, 2004; YUAN e outros, 2004; SUNDARARAJAN e HOWARD, 1999). Um dos fundamentos para tal amplitude na sua utilização diz respeito ao fato de que tais estruturas poliméricas podem albergar a manipulação de suas características físico-químicas, otimizando-se a sua atuação como elemento

bioativo, a depender do sítio a ser implantado, da qualidade de células cuja migração, adesão e proliferação se quer eliciar, assim como, o compasso em que a sua estrutura deve ser degradada em obediência ao reparo tecidual esperado (BOYAN e outros, 1999). Apesar desses atrativos atributos, apresentam como desvantagem singular, em geral, a ausência de competência mecânica (ROSE e OREFFO, 2002).

As incessantes tentativas em se identificar um único arcabouço biológico como panacéia para a regeneração óssea tem permitido a otimização das características dos arcabouços matriciais, especialmente, no que se refere às interações específicas entre células e biomaterial (ROSE e OREFFO, 2002).

Estratégias alternativas incluem a utilização de arcabouços construídos a partir de componentes naturais extraídos de esqueletos animais, os quais foram otimizados por seleção biológica natural, para conferir suporte mecânico, com preservação da fisiologia dos diversos tipos de tecido acondicionados internamente. Por esse reconhecimento, passaram a ser objeto de interesse na experimentação científica. Materiais biomiméticos, como são considerados, reproduzem em parte as complexas estruturas que ocorrem na natureza, tais como, o coral, o nacre e as conchas de calcita, e, pelo processamento de suas características físico-químicas, acredita-se que em um tempo não muito longínquo, talvez possam contribuir para um comportamento celular osteoprogenitor, para a expressão gênica adequada e para a encompassada liberação de fatores de crescimento envolvidos na regeneração óssea (ROSE e OREFFO, 2002).

Dessa forma, suportada pela sua semelhança com a estrutura das glicosaminoglicanas, um dos principais constituintes da matriz extracelular que

desempenha papel singular no comportamento das células e das moléculas sinalizadoras na fisiologia óssea, o polissacarídeo linear, conhecido como quitosana (poli β 1,4 D-glicosamina) tem despertado interesse de comunidades científicas em todo o mundo como um potencial recurso para a confecção de matrizes que suportem mecânica e fisiologicamente os eventos celulares inerentes à regeneração óssea (HENRIKSEN e outros, 1996).

A quitosana é, portanto, produzida laboratorialmente a partir da manipulação química da quitina, biopolímero formado pela recorrência de unidades monoméricas de N-acetil-glicosamina e que compõe, primariamente, a carapaça de crustáceos (HENRIKSEN e outros, 1996) e o exoesqueleto de artrópodos. Assume, assim, uma forma derivada da quitina, na medida em que é resultado da sua deacetilação estrutural, ou seja, remoção parcial dos seus radicais acetil (Figura 1), o que está implicitamente relacionado com o seu comportamento como biomaterial, seja atuando como matriz de preenchimento ou como veículo para liberação de fármacos. A manipulação de seus parâmetros microestruturais, respaldada pelo atributo de ser um biopolímero, e, em adição, de origem natural, sub-produto da indústria de alimentos marinhos, fazem-no alvo, portanto, de muitos estudos para aplicação na área médica e, mais especificamente, configura-o como um biomaterial versátil, biocompatível e de ampla aplicabilidade na Engenharia de Tecidos.

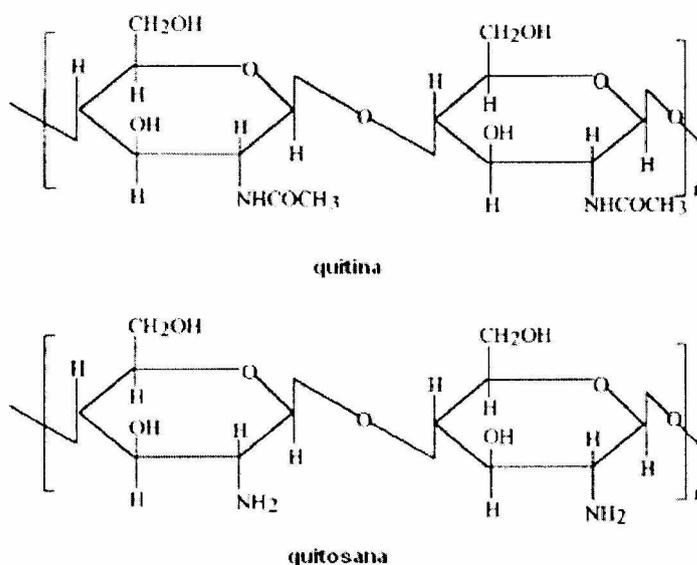


Figura 1. Representação esquemática da estrutura molecular da quitina e quitosana. Azevedo e outros, 2007.

Além da sua biodegradação, promovida pela lise das suas ligações glicosídicas, por enzimas animais, vegetais e humanas (MUZZARELLI, 1992), a quitosana, em razão do arranjo paralelo de suas pontes de hidrogênio, apresenta propriedades mecânicas mais compatíveis com as do osso, proporcionando à região do implante, estabilidade frente a cargas mecânicas desde os estágios iniciais do processo de reparo (ITO,1991; JUNG e outros, 2007).

Evans e Kent, ainda em 1962, observaram que a quitosana, em razão da sua estrutura policatiônica, diametralmente oposta quanto à carga elétrica, a das estruturas celulares, de superfície aniônica, apresentava a capacidade de se ligar e aglutinar uma variedade grande de células de mamíferos, representando os primeiros indícios de sua possível aplicabilidade em Medicina. Desde então, tem sido aplicada em defeitos ósseos, em modelo animal, com alguns trabalhos relatando a sua habilidade em promover

atividade osteogênica e angiogênese (MUZZARELLI e outros, 1994; LEE e outros, 2002). Também, na forma de matrizes 2 e 3D, promoveram o crescimento de tipos celulares ancoragem-dependente, incluindo os osteoblastos (CHUPA e outros, 2000; LAHIJI e outros, 2000).

Para a caracterização desse promissor polímero, dois importantes aspectos devem ser considerados, a saber: peso molecular e grau de N-acetilação (DA). O DA, cuja abreviatura refere-se à sua denominação proveniente da língua inglesa, *Degree of N-Acetylation*, diz respeito a intensidade de recorrência do radical acetil na sua fórmula estrutural. Tal recorrência tem importância significativa, visto influenciar na densidade de carga superficial, cristalinidade, solubilidade e no acesso à degradação enzimática (TOMIHATA e IKADA, 1997).

O processo de deacetilação da quitina pode se dar por meio da participação de substâncias ácidas ou básicas. No entanto, condições de alcalinidade são preferíveis, visto que as ligações glicosídicas presentes na estrutura molecular do polímero podem sofrer hidrólise ácida. Para se obter quitosana com um DA entre 5 e 30%, a quitina deve ser submetida a tratamento químico com bases fortes, a temperaturas entre 90° C - 150° C, por algumas horas. Esse controle da temperatura se faz importante para que seja evitada a clivagem molecular durante a deacetilação alcalina (KURITA, 2001).

Dentre as análises que respaldam a interferência dos diferentes DA's sobre o comportamento do biomaterial, está a de Hidaka e colaboradores (1999). Esses pesquisadores implantaram membranas de quitosana obtidas a partir da deacetilação estrutural de 65, 70, 80, 94, e 100% da quitina, em calvárias de 100 ratos, com preservação do periósteo. Os pontos biológicos

estabelecidos foram de 1, 2, 4, e 8 semanas após as cirurgias. Membranas preparadas a partir da deacetilação estrutural de 65, 70, e 80% da quitina, inicialmente, promoveram uma marcante resposta inflamatória, associada a sítios de ocorrência de osteogênese e à presença de tecido de granulação, o qual apresentou marcação imunohistoquímica positiva para a OCN, importante marcador da atividade osteoblástica. Em contrapartida, membranas obtidas pela deacetilação estrutural de 94% da quitina apresentaram áreas com resposta inflamatória branda e mínima osteogênese. Os resultados, portanto, indicaram que as intensidades de deacetilação da quitina em 65, 70, e 80% foram mais adequadas à promoção da osteogênese nos sítios subperiósteos, muito embora, a manutenção perióstica *per se* mascare o papel do biomaterial, especialmente no que tange a sua habilidade em recrutar células para o referido propósito. Ainda, ficou demonstrado que quanto menor a frequência de radicais acetil na composição do biomaterial, tanto menor, a intensidade da resposta inflamatória.

Em continuidade às análises relativas a utilização da quitosana como matriz estrutural não protéica, para a adesão e proliferação de células ancoragem dependente, incluindo condrócitos e células do tecido ósseo, Amaral e colaboradores, em 2005, avaliaram a interferência de diferentes graus de acetilação (4 a 49%) de filmes de quitosana, no comportamento *in vitro* de osteoblastos humanos (linhagem MG-63). Tais filmes foram caracterizados quanto a sua morfologia superficial, como também, em termos de sua densidade de carga, também superficial. A adesão celular foi avaliada após 3 e 24 horas de cultura celular. Depois do segundo período, ou seja, das 24 horas de incubação, um claro efeito do DA foi notado. Menores DA's promoveram

uma maior intensidade de adesão celular. No que diz respeito à proliferação celular, quanto menor o DA, maiores foram as taxas de crescimento celular, quando comparada com DA's maiores. Filmes com DA de 49% não promoveram proliferação celular. Ademais, os achados demonstraram que diferenças tão pequenas quanto 9% podem ser críticas para o perfil funcional dessa linhagem de osteoblastos em matrizes 2D de quitosana.

Em outra investigação, os mesmos autores avaliaram os aspectos aludidos anteriormente em membranas de quitosana, porém, foram utilizadas rBMSC's. A superfície do biomaterial foi caracterizada quanto a morfologia, rugosidade e capacidade de hidratação, e também pela adsorção de uma proteína adesiva específica, a fibronectina. A mesma faixa de DA foi utilizada, ou seja, de 4 a 49%. Entre as amostras de quitosana avaliadas, aquela de DA de 4% promoveu a maior adsorção superficial de fibronectina. Ainda, as culturas de rBMSCs, nesse DA, proliferaram e se diferenciaram de forma adequada, atingindo um maior grau de diferenciação osteogênica do que o grupo controle. Em razão desses achados, os autores sugeriram que a adesão, proliferação e diferenciação osteogênica das rBMSCs deve ter sido mediada pela camada de fibronectina adsorvida sobre as matrizes de quitosana, sendo, portanto, este um aspecto essencial a ser observado.

Com o mesmo propósito, Gumusderelioglu e Karakeçili (2007), mas, no entanto, estudando outro tipo celular, avaliaram *in vitro* a influência da composição e do DA de matrizes 3D de quitosana em culturas de células fibroblásticas. Seus resultados demonstraram que na cultura de células estudadas, a adesão e a proliferação de fibroblastos foram também afetadas pelo DA da biomatriz. Por fim, verificaram que as biomatrizes com alto DA

mostraram-se mais favoráveis à adesão e à proliferação desse tipo celular do que as biomatrizes com baixo DA.

Vande Vord e colaboradores, em 2002, já com o escopo de avaliar, não mais a interferência de diferentes DA's no reparo tecidual e, unicamente, a biocompatibilidade da quitosana, implantaram matrizes porosas de DA de 92% em tecido subcutâneo de 20 camundongos. Os animais foram sacrificados depois de 1, 2, 4, 8 e 12 semanas. A análise histológica evidenciou elevada densidade de neutrófilos no interior da área do implante, o que diminuiu progressivamente em intensidade nos pontos biológicos mais distantes a partir da data de implantação. Foram observados depósitos de fibras colágenas, o que indicou a formação de matriz conjuntiva no sítio operado. Atividade angiogênica também foi observada e mínima indução antigênica foi notada em razão da presença da quitosana. Muito embora, tenha havido uma migração intensa de neutrófilos para a região do implante, houve apenas branda reação inflamatória resultante da presença do material, o que reforça, além da sua biocompatibilidade, a sua baixa imunogenicidade quando implantada em modelo animal e sob as condições experimentais apontadas.

Pouco antes desses autores, Borah e colaboradores, em 1992, foram os primeiros a relatar o potencial da quitosana em promover osteogênese em defeitos críticos localizados em ossos longos de coelhos, quando comparados com o grupo controle, após 12 semanas de implantação. Embora o seu tempo de análise tenha sido, relativamente, exíguo, todos os defeitos críticos foram preenchidos por tecido ósseo regenerado, reforçando o interesse da comunidade científica pela aplicabilidade da quitosana como biomaterial na regeneração óssea. A partir de então, muitos trabalhos

passaram a ser delineados com o objetivo de avaliar o seu potencial osteocondutor e osteoindutivo. Muitos deles, fizeram-no, associando-a com outras substâncias, por vezes, com fatores de crescimento, por se entender que, de forma isolada, o polímero não seria capaz de eliciar regeneração óssea e, tantos outros, aliaram-no com outros biomateriais, na tentativa de que fossem conjugadas as vantagens isoladas de cada um e com isso, os seus resultados, incrementados.

Assim, Lee e colaboradores (2001) avaliaram o potencial osteogênico de matrizes porosas de quitosana associadas ao ácido poli-lático (PLA), ao PDGF-BB (*Platelet-derived growth factor-BB*), como agente indutivo, e ainda, a células osteoblásticas oriundas da calvária de rato. Concluíram que estratégias combinadas, tanto pela utilização da quitosana como agente liberador de fármacos, quanto pela sua associação a outros biomateriais e, mais, como carreador de células, constitui uma alternativa a ser considerada dentro do arsenal de manobras que compõem as terapias reconstrutivas.

Durante o processo de regeneração óssea é necessário que a biomatriz permaneça em posição, a fim de favorecer a formação do tecido neoformado. Neste mesmo contexto, com o objetivo de aumentar a resistência e estabilidade da biomatriz, Jung e outros (2007) avaliaram *in vivo* o efeito do tratamento de membranas de quitosana com o PLGA sobre o processo de regeneração óssea em defeitos críticos criados em calvária de rato. Três concentrações diferentes de PLGA (0,5%, 1,0%, 3,0%) foram estudadas. Os pontos biológicos compreendiam períodos de 2 e 8 semanas, do pós-cirúrgico. Os autores demonstraram que no grupo controle, preenchido apenas com coágulo sanguíneo, ocorreu uma leve formação de tecido conjuntivo e uma

pequena neoformação óssea reparativa nas margens do defeito. Nos grupos que tiveram apenas a inserção da quitosana, sem adição do PLGA, no período de 2 semanas, foi encontrado um número residual de fibras envolvido por tecido conjuntivo. No grupo avaliado após 8 semanas, não unicamente havia osso, como este encontrava-se em franco estágio de maturação. Os seus achados, assim, evidenciaram que a quitosana, mesmo que de forma isolada, ou seja, sem a incorporação, por exemplo do PLGA à sua estrutura, contribuiu para a formação de tecido ósseo, não havendo diferenças significantes entre os grupos tratados com PLGA e entre os não tratados.

Tuzlakoglu e Reis (2007) aplicaram sobre biomatrizes de quitosana com DA de 87%, um spray de biovidro (*Bioglass*[®]) mantido em suspensão aquosa. Uma linhagem de células osteoblásticas humanas (SaOs-2) foi selecionada para avaliar a morfologia, adesão e proliferação celular sobre a superfície condicionada da matriz. Após 7 dias de observação foi encontrado um grande número de células aderidas à biomatriz tratada com spray e na biomatriz sem tratamento (grupo controle), observou-se a presença de diferentes tipos celulares com diferentes morfologias. Segundo os autores, o tratamento da quitosana com o biovidro, por si, em razão das alterações ocorridas na sua superfície e topografia afetaram diretamente na quantidade de células aderidas à estrutura. Ressalta-se, portanto, que os parâmetros microestruturais de materiais utilizados como arcabouço celular devem ser observados em razão do propósito de sua utilização. Esse preceito é reforçado pelo trabalho de Webb, Hlady e Tresco (2000) os quais atestaram que a adesão e proliferação de células osteoblásticas estão implicitamente relacionadas às características químicas da superfície do substrato.

Dentre os vários aspectos físico-químicos, a porosidade e a resistência mecânica são propriedades intensamente estudadas na literatura, por interferirem no desempenho da matriz no sítio de implantação, assim como, a topografia e textura superficial (DI MARTINO; SITTINGER; RISBUD, 2005; WAN e outros, 2005; REIS, 2007; ZHANG e outros, 2007).

Um estudo *in vivo* elaborado por Kong e outros (2007) analisou o desempenho de uma biomatriz porosa composta de quitosana e nano-hidroxiapatita implantada em fíbula de coelhos. Uma porção de 5 mm de extensão linear foi removida cirurgicamente do osso do animal e uma matriz tubular com arquitetura multilaminar semelhante ao osso, foi interposta no local. Sua estrutura era composta de uma membrana externa densa de quitosana, uma camada intermediária de quitosana e nano-hidroxiapatita com pequena porosidade (20-40 μ m) e uma zona medular altamente porosa (100-150 μ m), infiltradas com a linhagem de células osteogênicas MC3T3-E1, derivadas da calvária de rato. Diante deste desenho de biomatriz 3D delineado pelos autores, os resultados demonstraram que o comportamento da membrana de quitosana foi eficiente na prevenção de invaginação de tecido fibroso, e a biomatriz celular composta de quitosana-nanohidroxiapatita apresentou biocompatibilidade e osteocondutividade *in vivo*.

Também, recentemente, Cunha-Reis e colaboradores (2007), avaliaram a influência dos parâmetros físicos da quitosana (DA=89%) na sua degradação e adesão celular. As células utilizadas foram as MG- 63, as mesmas utilizadas no trabalho de Amaral e colaboradores (2005). O tempo de cultivo foi de 3 dias. Quatro tipos diferentes de arcabouços cilíndricos (5mm X 4 mm) foram utilizados com densidade e diâmetro de poros distintos. Os mesmos

foram expostos a soluções de lisozima por 5 semanas. A extensão da degradação foi avaliada pela percentagem de perda de massa quando liofilizados após a exposição enzimática em 7, 21, 35 e 49 dias. Os resultados demonstraram que as matrizes que continham poros com diâmetros maiores (800 μm), tiveram taxa de degradação acelerada em comparação com as fibras que apresentavam poros com diâmetros menores (450 μm) e, ainda, que as diferenças nos tamanhos dos poros não interferiram na adesão celular, verificada pela utilização do *PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit* em análise de microscópio confocal.

Avançando-se nas estratégias combinadas, salienta-se que o transplante autógeno de células, combinado com a inserção de biomateriais, reconhecidamente, biocompatíveis e biodegradáveis, parece ser um dos mais prósperos conceitos em desenvolvimento quando são delineados procedimentos terapêuticos com mínima morbidade ao paciente e máxima resposta tecidual (VACANTI e outros, 1998) como evidenciado pelos trabalhos descritos nos parágrafos anteriores. Desta forma, as células mesenquimais extraídas da medula óssea (*Bone Marrow Stem Cells*) proporcionam, ao menos teoricamente, essa inesgotável fonte celular, a qual a depender do microambiente e dos fatores indutivos para a sua diferenciação, podem originar um tipo específico de tecido (CANCEDDA e outros, 2002).

Sabe-se que há aproximadamente 4 décadas, descobriu-se a potencialidade das células mesenquimais em se diferenciarem em múltiplos tipos celulares distintos. Não mais que há duas décadas, as primeiras células embrionárias murinas foram isoladas e submetidas a proliferação *in vitro* o que fez com que, desde então, o poder científico oriundo da manipulação de células

mesenquimais tenha se tornado ilimitado, na medida em que as suas características fenotípicas são adequadamente mapeadas, configurando a Bioengenharia Tecidual numa área sem fim aparente, onde os maiores percalços talvez residam na aplicação clínica em humanos dos seus achados *in vitro*.

Em bases teóricas, tais células podem ser retiradas de um determinado paciente, incorporadas a uma matriz tecidual *ex vivo* e, implantadas no mesmo indivíduo quando o reparo tecidual se tornar premente, evitando-se medidas protocolares de imunossupressão.

Uma descrição extremamente simplista pode resumir o procedimento de reconstrução óssea desejado e otimizado a partir da utilização de células mesenquimais e uma matriz biomimética: a) isolamento das células, b) expansão e diferenciação *ex vivo* das mesmas, c) semeadura das matrizes com as células, expandidas e caracterizadas fenotipicamente, d) implantação local, e) degradação do biomaterial em compasso com a neoformação óssea.

Vislumbrando essa possibilidade terapêutica, e com o objetivo de não unicamente mapear as interferências físico-químicas dos filmes e/ou matrizes de quitosana sobre as células presentes no microambiente de implantação, Seol e colaboradores (2004), com o escopo de desenvolver matrizes porosas de quitosana capazes de promover o crescimento *in vitro* de células osteoblásticas de calvária de rato, realizaram um experimento onde associavam a utilização dessas matrizes à semeadura de tais células. O biomaterial apresentava poros interconectados na faixa de 100 a 200 μm , e os seus resultados indicaram a adesão e proliferação osteoblástica, além da típica morfologia após 56 dias de cultivo celular, indicados pela atividade elevada da

ALP e depósitos de cálcio. Muito embora, não tenham considerado o grau de acetilação utilizado, os achados levaram-nos a concluir que a quitosana pode ser utilizada como matriz para inserção e suporte celulares, em modelo *in vitro*, e como agente carreador de células osteoblásticas na regeneração de tecido ósseo *in vivo*.

Como sabido, a maior parte dos trabalhos que utilizam protocolos de cultivo *in vitro* de células mesenquimais, mais especificamente, ao utilizarem rBMSC's, fazem-no pela adição, aos meios de cultura, de 10% de FBS, como fonte de fatores de crescimento específicos para a sua expansão e proliferação. Poucos trabalhos, até então, avaliaram a substituição do FBS pelo RS para o desempenho celular, o que constitui uma alternativa importante para tais manobras, visto ter um custo financeiro menor, isentar os microambientes de possíveis reações de imunogenicidade, ser de rápida obtenção e, certamente, conferir às células do próprio rato, proteínas adequadas e fatores de crescimento prontamente identificáveis pelas mesmas, sem mencionar, ainda, a forma questionável como é obtido o FBS, pela morte prematura dos fetos bovinos.

Dentre os trabalhos identificados, encontra-se o de Masaki e colaboradores (2001) que procederam a troca do FBS pelo soro autólogo de rato em adição ao meio de cultura, o que acarretou num marcante incremento da formação de nódulos de mineralização em culturas primárias de células extraídas a partir da calvária de rato. Esse efeito foi visualizado ainda nos estágios iniciais da cultura celular, o que indica que os fatores inerentes ao mesmo atuam sobre as células, especialmente, na fase de proliferação. A intensidade da ocorrência dos nódulos de mineralização pareceu ser

dependente da concentração do soro no meio, tendo sido demonstrada a mais alta intensidade quando o mesmo representava ao menos 10% de todo o conteúdo. Também, houve incrementos da atividade da ALP, síntese de colágeno e síntese de DNA nas células sob análise. Os autores relataram haver uma relação direta entre a atividade da ALP e níveis de corticosterona, principal hormônio encontrado no soro de roedores. Os resultados demonstraram que na medida em que a concentração sérica de corticosterona diminuía com a senilidade, diminuía, em paralelo, a intensidade de formação dos núcleos de mineralização, o que sugere que níveis fisiológicos de tal hormônio tenha um papel regulatório na função osteoblástica nesse modelo animal de estudo.

Em resumo, inúmeras investigações já foram realizadas, outras tantas estão sendo procedidas e inúmeras outras se impõem, no sentido de que se tornem exeqüíveis, regimes protocolares inseridos na Bioengenharia de Tecidos, que envolvam menor custo biológico e financeiro, e que culminem com a regeneração do tecido ósseo (BISHOP; LEE; POLAK, 2002).

Problemas de acessibilidade às células mesenquimais, assim como, a sua baixa freqüência na medula óssea (cerca de 1 célula aderente para cada 100.000 células constituintes), além da arquitetura 3D do osso, com todas as suas peculiaridades, e dos eventos moleculares que envolvem a osteogênese, muitos deles ainda por elucidar, podem se constituir em aspectos que retardem o estabelecimento de manobras inerentes à Medicina Regenerativa (VOGEL, 2001), reforçado, ainda pelo fato da necessidade de se desenvolver biomateriais que reúnam o máximo de atributos possível, a maior parte deles, listada acima, e que possam ser empregados em situações de extensa perda

de substância óssea, contornando o avanço fibroblástico, e a deposição de matriz colagênica, o que, inviabiliza a regeneração tecidual e, por vezes, impõem ao sítio específico, déficit anátomo-funcional. Em tais cenários, os defeitos extensos a ponto de inviabilizarem o crescimento ósseo são essenciais na avaliação do tipo de estratégia utilizada na reconstrução do tecido (SAADEH e outros, 2001) e a inserção de arcabouços matriciais biocompatíveis, em especial quando semeados previamente com células de linhagem osteogênica, devidamente expandidas e caracterizadas *in vitro*, delinea-se como alvo ideal a ser atingido na regeneração óssea *in vivo*.

Hipóteses

3 HIPÓTESES

3.1 A matriz 3D de quitosana a 4%, em razão de seus parâmetros microestruturais, deve eliciar adesão, migração e proliferação das rBMSC's quando analisadas em modelo *in vitro*;

3.2 O soro autólogo de rato não deve interferir de forma negativa no comportamento biológico das rBMSC's quando cultivadas em modelo *in vitro*;

3.3 A matriz 3D de quitosana a 15%, em razão do seu grau de acetilação e do impacto decorrente deste, não deve possibilitar que as rBMSC's apresentem comportamento biológico similar ou superior àquele apresentado quando da utilização da matriz 3D de quitosana a 4%;

3.4 As matrizes 3D de quitosana a 4% e 15%, quando implantadas em defeito crítico transfixado em calvária de rato, devem promover osteocondução de maneira que, ainda que o defeito não seja completamente regenerado, possibilite neoformação óssea além da região de borda óssea, na sua interface, como também, formação e proliferação vascular na região do defeito e de entremeio à sua estrutura.

3.5 Ainda que a osteocondução seja esperada para ambas as matrizes 3D, acredita-se que devam existir diferenças nos seus comportamentos biológicos

quando as mesmas forem implantadas *in vivo* e em defeitos ósseos críticos, em função da variação no grau de acetilação de 4% e 15%.

Objetivos

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivos gerais

4.1.1 Avaliação de matrizes 3D de quitosana, em dois diferentes DA's, 4 e 15%, quando semeadas por rBMSC's em modelo *in vitro* e quando implantadas *in vivo* em defeitos críticos criados em calvária de rato.

4.1.2 Avaliação do comportamento biológico das rBMSC's em modelo *in vitro* quando cultivadas em soro autólogo de rato e em soro fetal bovino.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Análise *in vitro* da viabilidade celular de rBMSC's quando cultivadas sobre matrizes 3D de quitosana, em dois DA's, 4 e 15%, e expostas a meio de cultura suplementado com 10% de FBS e 10% de RS;

4.2.2 Análise *in vitro* da adesão e proliferação celular de rBMSC's quando cultivadas sobre matrizes 3D de quitosana, em dois DA's, 4 e 15%, e expostas a meio de cultura suplementado com 10% de FBS e 10% de RS;

4.2.3 Análise histomorfológica, por microscopia óptica e ensaio imunohistoquímico, da resposta tecidual, em especial da neoformação óssea e da angiogênese, resultantes da implantação de matrizes 3D de quitosana, em dois DA's, 4 e 15%, em defeitos ósseos circulares transfixados, com morfologia e dimensões críticas, medindo 8,5 mm, criados cirurgicamente na calvária de rato.

Desenho Experimental e Métodos

5 DESENHO EXPERIMENTAL E MÉTODOS

Este experimento em animais seguiu as normas de conduta de experimentação animal da Universidade Federal da Bahia (UFBA-BA), tendo sido submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM) / FIOCRUZ (Anexo A).

5.1 Amostra

Para a experimentação *in vitro*, foram selecionados 10 ratos *Wistar albinus*, isogênicos, machos, adultos, com 4 semanas de vida, clinicamente saudáveis, fornecidos e manipulados no Biotério do INEB, Universidade do Porto, Portugal.

Para a segunda parte do experimento, foram selecionados 80 ratos *Wistar albinus*, isogênicos, machos, adultos, com massa corpórea entre 250 a 400g e, três a quatro meses de idade, clinicamente saudáveis, fornecidos pelo Biotério Central da FEJAL e operados no centro cirúrgico do mesmo. Estes animais foram mantidos em gaiolas individuais convencionais por 15 dias após o procedimento cirúrgico, em espaço climatizado, com ração sólida (Purina

LabinaTM), água *ad libitum* e condições ideais de temperatura e luminosidade, sem a utilização de medicação pós-operatória. Em adição, foi realizada troca diária de maravalha estéril.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente para composição de 4 grupos, avaliados em 4 pontos biológicos pós-operatórios, conforme demonstrado na tabela 1, a seguir:

Pontos Biológicos (Dias) / Grupos	07	15	45	120	Total
I	5	5	5	5	20
II	5	5	5	5	20
III	5	5	5	5	20
IV	5	5	5	5	20
TOTAL	20	20	20	20	80

Tabela 1. Número de animais de acordo com os grupos e pontos biológicos (dias).

Grupo I – Defeito crítico sem preenchimento, controle negativo.

Grupo II – Defeito crítico preenchido com matriz 3D de quitosana 4%.

Grupo III - Defeito crítico preenchido com matriz 3D de quitosana 15%.

Grupo IV - Defeito crítico preenchido com matriz 3D de colágeno tipo I, controle positivo.

Os sacrifícios nos pontos biológicos acima determinados tiveram como principal propósito:

Aos 7 dias – Análise da formação vascular por imunohistoquímica

PECAM-1;

Aos 15 dias – Análise da intensidade da resposta inflamatória e qualidade celular, assim como, do início do reparo tecidual;

Aos 45 dias – Análise do reparo tecidual em curso;

Aos 120 dias – Análise do potencial osteocondutor dos biomateriais.

5.2 Fornecimento das Matrizes Tridimensionais

As matrizes 3D de quitosana e de colágeno, com 8,0 mm de diâmetro e 1,2 mm de espessura, foram preparadas, caracterizadas e fornecidas pelo Grupo de Biointerface, do Instituto de Engenharia Biomédica (INEB) da Universidade de Porto, Portugal.

5.2.1 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS MATRIZES

As matrizes de quitosana, nos seus dois graus de acetilação (4% e 15%) foram preparadas a partir da pena de lula (France-Chitine), depois de sua purificação e subsequente N-acetilação (Figura 3).

A quitosana obtida a partir da pena de lula é derivada da β -quitina, a qual apresenta uma estrutura química molecular menos condensada quando comparada a α -quitina, presente na carapaça do caranguejo e casca de camarão. Assim, durante a sua deacetilação, temperaturas muito brandas são requeridas em relação as requeridas para a deacetilação da α -quitina (KURITA, 2001).

As matrizes de colágeno tipo I, termorreticuladas e controle positivo desse estudo, foram preparadas a partir do colágeno tipo I de tendões de aquiles bovino (C-9879, Sigma-Aldrich) (Figura 4).

A caracterização dos biomateriais resultantes, antes da sua hidratação, em termos de porosidade, densidade e média de diâmetro de poros encontra-se discriminada no Quadro 1. A figura 2 revela a sua morfologia quando observada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Biomaterial	Porosidade (%) (<i>n</i> = 3)	Densidade (g·mL) (<i>n</i> = 3)	Diâmetro Médio dos Poros (µm)
Colágeno	0,938 ± 0,005	0,031 ± 0,003	173,53 ± 38,62 (<i>n</i> = 36)
Quitosana (DA 4%)	0,981 ± 0,001	0,033 ± 0,001	114,08 ± 38,28 (<i>n</i> = 50)
Quitosana (DA 15%)	0,939 ± 0,004	0,053 ± 0,005	96,16 ± 26,26 (<i>n</i> = 50)

Quadro 1. Caracterização das biomatrizes 3D planas, antes da hidratação, em termos de porosidade, densidade e diâmetro dos poros, determinadas pela análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e pelo *liquid displacement method*. DA: *Degree of acetylation* (Grau de acetilação).

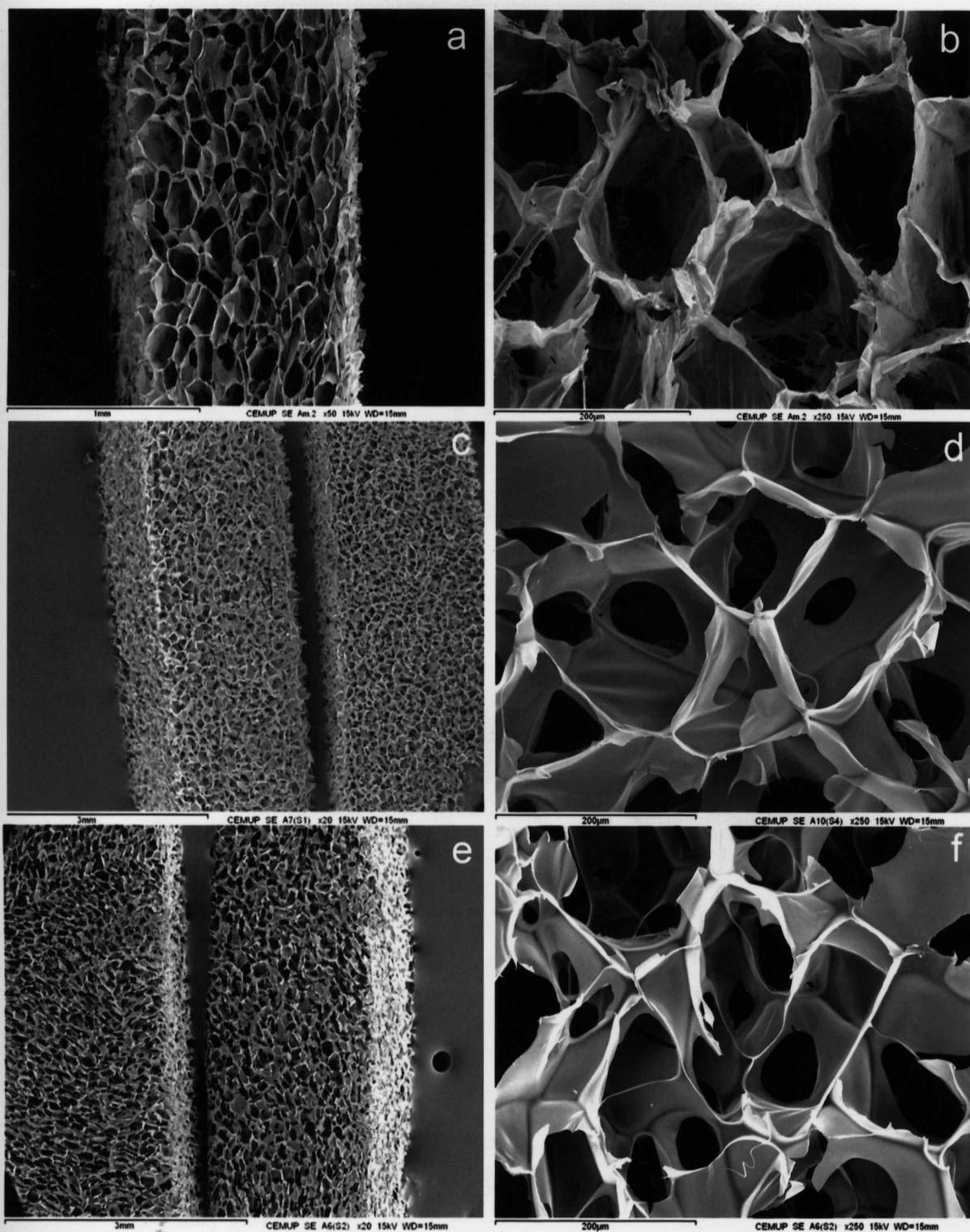


Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das biomatrizes 3D planas de quitosana e colágeno. Imagens correspondentes aos cortes seccionais transversais das biomatrizes preparadas: (a e b) quitosana 4%; (c e d) quitosana 5%; (e e f) colágeno tipo I.

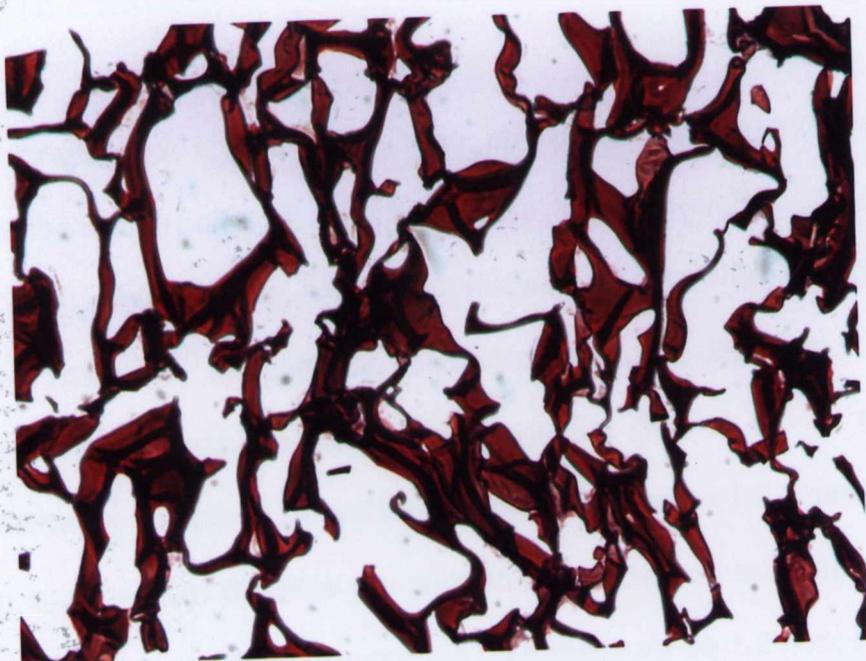


Figura 3. Matriz de Quitosana corada com Tricrômio de Masson (20x). Microscópio de Contraste de Fase. Leica, Alemanha.

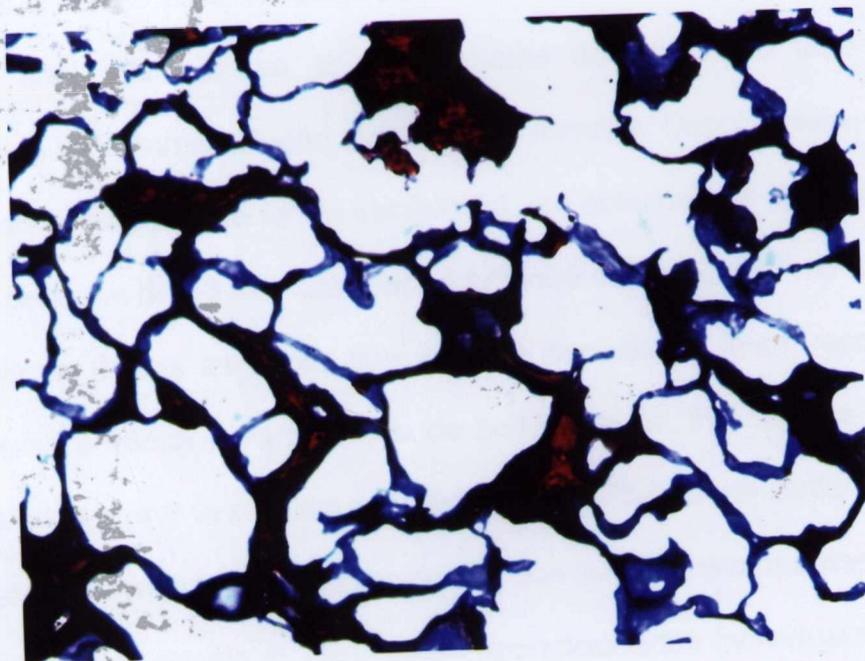


Figura 4. Matriz de Colágeno tipo I corada com Tricrômio de Masson (20x). Microscópio de Contraste de Fase. Leica, Alemanha.

5.2.2 RECORTE E ESTERILIZAÇÃO DAS MATRIZES

O preparo das matrizes 3D de quitosana e colágeno seguiu o protocolo estabelecido pelos pesquisadores do INEB (AMARAL; SAMPAIO; BARBOSA, 2005). Inicialmente, foram recortadas manualmente, nos diâmetro desejado, por meio de um artefato cilíndrico, em aço inox, de margens cortantes, desenhado exclusivamente para este fim (Figura 5). As matrizes foram posicionadas em placa de teflon e sobre as mesmas foi pressionado o cilindro com sua margem cortante em contato direto com as suas superfícies. Importante ressaltar, que foram preparadas na espessura de 1,2 mm, requerida para essa análise. Em seguida, foram imersas em álcool absoluto e submetidas à tratamento à vácuo para remover possíveis bolhas de ar contidas no seu interior. Ao final, as matrizes já posicionadas ao fundo do tubo falcon, permaneceram na mesma solução, por mais 10 minutos. Depois desse período de tempo, foram imersas, de forma seqüencial, em soluções de álcool a 70, 50 e 25%, por períodos de 30 minutos, para a primeira solução, e 10 minutos para as duas últimas. Todas as vezes que se fazia necessário, eram recolocadas sob tratamento à vácuo para remoção de bolhas de ar. Por fim, as matrizes foram hidratadas, por 2 vezes, em solução de PBS (*Phosphate Buffer Solution*) (P3813 Sigma), 10 minutos a cada tempo. As que se destinavam à implantação animal, portanto, ao ensaio *in vivo*, foram acondicionadas individualmente em eppendorfs estéreis, sem qualquer tratamento adicional. As demais esponjas, endereçadas à experimentação *in vitro*, foram imersas em meio de cultura α -MEM completo com FBS e RS, por 24 horas, antes de serem objeto da semeadura pelas rBMSC's.



Figura 5. Cortador metálico utilizado para recortar as matrizes 3D de quitosana e colágeno tipo I no diâmetro interno de 8 mm.

5.3 Ensaio *In Vitro*

5.3.1 EXTRAÇÃO DO SANGUE E PREPARO DO RS

Os animais foram anestesiados e por uma punção intra-cardíaca (Figuras 6 a,b), o seu sangue coletado em tubos falcon de vidro. Em seguida, os tubos foram deixados à temperatura ambiente por cerca de 60 minutos para a devida formação do coágulo. Em seqüência, colocados em câmara fria (4°C) por 12 horas para máxima contração do coágulo. Após esse período de tempo, a fração líquida foi decantada para outro tubo de vidro e centrifugada a 4° C, por 15 minutos, a 1500 rpm. Ao final, o soro obtido, foi alíquotado e armazenado a -20° C, e apenas adicionado ao meio de cultura imediatamente antes do seu uso.

Foi utilizado, para a cultura celular, meio de cultura α -MEM (11900-073 Gibco, Invitrogen) suplementado com fungizona (15290-026, Gibco, Invitrogen) (1%) e Penicilina / Estreptomicina (15140-122 Gibco, Invitrogen) (1%). Um grupo de células foi cultivado com o referido meio, tendo

sido ao mesmo, adicionado 10% de FBS (10270-106 Gibco, Invitrogen). Ao outro grupo de células, foi adicionado ao meio de cultura, o RS (10%), preparado como descrito acima.

5.3.2 EXTRAÇÃO DAS rBMSC

As células foram obtidas segundo o protocolo de Maniopoulos, Sodek e Melcher (1988), adaptado por AMARAL (2005). Os ratos foram mortos e os seus fêmures e tíbias retirados inteiros e transferidos para tubos falcon contendo solução de PBS suplementada com fungizona (10%) e Penicilina / Estreptomicina (10%). Após uma segunda lavagem na mesma solução, os ossos foram transferidos para uma placa de Petri contendo meio de cultura α -MEM suplementado com fungizona (10%) e Penicilina / Estreptomicina (10%). Logo em seguida, as epífises foram removidas com tesouras estéreis e, utilizando-se seringas com agulhas (0.6 gauge) descartáveis, contendo meio de cultura completo α -MEM (suplementado com soro fetal bovino a 10%), foi procedida a lavagem do canal medular dos referidos ossos em câmara de fluxo laminar (Figuras 7 a, b). A suspensão obtida foi coletada em tubo falcon e transferida, ao final, para frascos de cultura de 75 cm² e incubadas em estufa de 5% CO₂ a 37°C. Aos frascos foram adicionados meio de cultura complementar de forma que cada um contivesse ao final um conteúdo de 15 mL. Foi utilizado um frasco de cultura para cada rato. Após 24 horas, o meio de cultura foi trocado e a cada 3 dias até a obtenção da confluência celular observada ao microscópio óptico, o que ocorreu ao décimo dia de cultura.



Figura 6. Rato anestesiado previamente à extração do sangue (a) e durante a punção intracardíaca (b).



Figura 7. Lavagem do canal medular de fêmur e tibia de rato com meio de cultura α -MEM suplementado com FBS (10%), fungizona (10%) e Penicilina / Estreptomicina (10%) (a) e do precipitado celular (*pellet*) após centrifugação do meio com as rBMSC's (b).

5.3.3 EXPANSÃO E DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA *IN VITRO* DAS rBMSC's.

Após obtenção da suspensão celular como descrito acima, e quando da sua confluência, as células foram submetidas à tripsinização (Trypsin; T-0646 Sigma), ou seja, suas moléculas de adesão intercelulares eliminadas por via enzimática, e transferidas (30 μ L) (5×10^5 cels./matriz) para as matrizes tridimensionais de quitosana e colágeno (0,57 cm^2), onde permaneceram até a sua diferenciação osteogênica, aos 14 dias, proporcionada pela adição de meio de cultura contendo elementos indutores, tais como, β -glicerofosfato 1% (G9891 Sigma), ácido ascórbico 1% (A-4034) e dexametasona 1% (D1756 Sigma). Após as primeiras 24 horas de semeadura das esponjas (2×10^5 células / matriz), foram estabelecidos 2 grupos experimentais. As placas de cultura de 24 poços, foram virtualmente divididas ao meio, e as suas 2 metades, as quais continham, cada uma, 12 matrizes, 4 de cada biomaterial, semeadas com as rBMSC's. No entanto, uma metade foi suplementada com FBS (10%) mais a adição dos indutores, e a outra metade, recebeu meio de cultura suplementado com RS (10%), além, obviamente, da adição dos mesmos indutores mencionados anteriormente. O mesmo protocolo foi realizado semeando-se as rBMSC's (2×10^4 cels. / poço) em TCPS (*Tissue Culture Polystyren - TPP®*), sem a presença das matrizes 3D.

5.3.4 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

Aos 14 dias de cultura celular, foi realizado o ensaio (*Live/Dead Assay*) utilizando-se a calceína (*Calcein AM*, C-1430; *Invitrogen Molecular Probes*) (1mg / mL) e iodeto de propídio (*Propidium Iodide*, P4170-10mg; *Sigma*) (1mg / mL) para verificação da viabilidade celular, tanto para as células que foram cultivadas em meio suplementado com o FBS quanto para aquelas cultivadas em RS. Tal protocolo consistiu na lavagem dos poços da placa de cultura, contendo matrizes e células, com PBS, por duas vezes, e em seguida, na adição de solução de calceína em PBS, por 10 minutos. Após, este período de incubação, os poços foram novamente lavados e aos mesmos adicionados iodeto de propídio em PBS, por 5 minutos. Ao final deste tempo, as matrizes celularizadas foram levadas ao Microscópio Confocal (*Laser Scanning Confocal Microscope – Leica Microsystems, Germany*). A calceína foi visualizada pela utilização de luz azul, sendo excitada num espectro de 488 a 530 nm. O iodeto de propídio foi visualizado pela utilização da luz verde, sendo excitado num espectro de luz de 561 nm. As células viáveis tiveram o seu citoplasma marcado em verde e as não-viáveis tiveram o seu DNA nuclear marcado em vermelho.

5.3.5 AVALIAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO DO CITOESQUELETO

Também, aos 14 dias de cultura, foi realizada a marcação por fluorescência para a f-actina / DNA, utilizando-se, para tanto, microscópio óptico de contraste de fase, para visualização da morfologia celular, assim como, para a avaliação da organização do citoesqueleto. Em placa específica para tal ensaio, as esponjas foram lavadas em PBS e fixadas em 3.7% de formaldeído (Sigma P-6148). Em seguida, as células foram permeabilizadas com Triton X-100 (Sigma T-8787) em PBS (0,1%) por 5 minutos e somente então, incubadas em solução de RNase (19101; QIAGEN) (3µg/mL) por 60 minutos. Logo depois, foram incubadas em *Alexa Fluor 488 phalloidin* (Molecular Probes A-12379) (1:40 em solução de BSA (*Bovine Serum Albumin*) (Merck 1.12018.0025) / PBS) também por 60 minutos. Após lavagem com PBS, as amostras foram, por fim, incubadas por 5 minutos, com iodeto de propídio (P4170-10mg; Sigma) (10 µg/mL) e levadas ao Microscópio Confocal (*Laser Scanning Confocal Microscope – Leica Microsystems, Germany*). A f-actina foi visualizada pela utilização de luz azul, sendo excitada num espectro de 488 a 530 nm. O iodeto de propídio foi visualizado pela utilização da luz verde, sendo excitado num espectro de luz de 561 nm.

5.3.6 ENSAIO PARA QUANTIFICAÇÃO DE DNA

A quantificação de DNA foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido por Teixeira e colaboradores, em 1995. Foram utilizadas 4 placas

de cultura de 24 poços (SARSTEDT), cada uma com 24 esponjas semeadas com células. Doze esponjas, 4 de cada biomaterial, tiveram suas células cultivadas com meio de cultura suplementado com FBS (10%). As doze restantes, tiveram suas células cultivadas com meio de cultura suplementado com 10% de RS. Ainda, foram utilizadas matrizes sem células e com os diferentes suplementos, as quais funcionaram como branco do teste. Foram selecionados 4 tempos de análise, a saber, dias 1, 4, 7 e 14, o que contabilizou 96 matrizes semeadas. Em cada um desses tempos de cultura das células, as esponjas foram lavadas em PBS e, em seguida, congeladas a -80° C. Apenas, quando todos os tempos foram atingidos, a quantificação do DNA foi efetivamente realizada, estabelecendo-se, portanto, uma curva de proliferação celular que ao final foi comparada a uma curva de calibração, construída a partir de concentrações de DNA previamente determinadas. Ao final, as esponjas ainda congeladas foram maceradas e às mesmas adicionado o triton X-100 (Sigma T-8787) (0,1% em PBS). As amostras foram novamente congeladas a -80° C por 12 horas. Em seguida, foram centrifugadas a 3000 rpm (rotações por minuto) durante 3 minutos. Aos cento e cinqüenta microlitros do sobrenadante obtidos de cada eppendorf, foram adicionados 75 μ L de solução de acetato de sódio (106268, Merck) e submetidos a homogeneização. Em continuidade, adicionou-se 1250 μ L de etanol absoluto a cada tubo. Mais uma vez, todos os frascos foram congelados a -80° C por 12 horas. Após esse período, os extratos celulares foram centrifugados a 11242 rpm por 10 minutos. O sobrenadante de cada tubo foi aspirado e descartado, remanescendo apenas o precipitado ao fundo dos mesmos. Esse conteúdo, então, foi levado a estufa à vácuo por 24 horas a temperatura ambiente. Ao fim das 24 horas, o

precipitado foi solubilizado em EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 10 mM (ED2SS, Sigma). Foram retirados 70 μ L de cada amostra, em seu tempo de análise, e 70 μ L de cada concentração de solução padrão de DNA, obtida a partir de células do timo de bezerro, com 4 réplicas cada, e inseridas numa placa preta de 96 poços. Em cada poço, adicionalmente, foram pipetados 5 μ L de fosfato de potássio 1M (P5655, Sigma) para neutralização do pH, e 75 μ L de Hoechst 33258 diluído em solução TNE (100mM Tris; 2M NaCl; 10 mM EDTA; pH 7.4) (DNAQF-1KT, Sigma) (1mg / mL). Protegida a placa da luz, foi levada ao fluorímetro com ponto de excitação em 365 nM e emissão em 460 nM. Obtidos os resultados, em planilha excel, foi construída a curva de calibração com os padrões de DNA (Figura 8) e os gráficos referentes aos seus resultados.

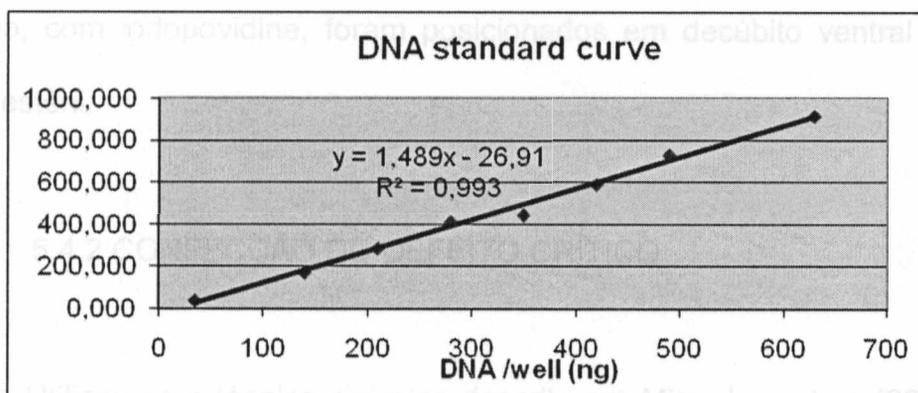


Figura 8. Curva padrão para a quantificação de DNA a partir de células extraídas do timo de bezerro.

5.4 Ensaio *In Vivo* – Implante das matrizes 3D de quitosana e colágeno na calvária de ratos *Wistar Albinus*

5.4.1 ANESTESIA E PREPARO DOS ANIMAIS

Os animais foram submetidos à anestesia geral, com injeção intramuscular de cloridrato de quetamina (Vetaset 1g[®] – VIRBAC do BRASIL IND. COM. LTDA) , na proporção de 0,12mL/100g de massa corpórea, e a sedação e analgesia, com dose única de uma injeção intramuscular de cloridrato de xilazina(Copazine[®] 2% - VIRBAC do BRASIL IND. COM. LTDA), na proporção de 0,06mL/100g de massa corpórea. Em seguida, os animais foram tricotomizados na calvária e, depois de realizada a anti-sepsia do campo operatório, com iodopovidine, foram posicionados em decúbito ventral sobre prancha estéril.

5.4.2 CONFECÇÃO DO DEFEITO CRÍTICO

Utilizou-se a técnica cirúrgica descrita em Miguel e outros (2006), a qual consiste na elevação de retalho bicoronal cutâneo na porção posterior da calvária.

Na porção mediana do crânio foi realizada uma incisão periosteal linear transversal, com bisturi de lâmina intercambiável n^o-15 (Figura 9a). O retalho muco-periosteal foi divulsionado com uma tesoura de extremidade reta

e romba, elevado com a extremidade maior da espátula nº7 e mantido afastado com pinças hemostáticas do tipo mosquito.

Em seguida, o defeito ósseo circular transfixado foi confeccionado na porção mediana da calvária, a partir do vértice da sutura craniana posterior, medindo aproximadamente 8,5 mm de diâmetro e 1,2 mm de espessura, em razão da espessura média da calvária do animal (Figura 9b). Quando da remoção do bloco ósseo, foram removidos, em adição a dura-máter e o perióstio (Figura 10a). Foi utilizada para esse fim, uma fresa trefina (Dentoflex Comércio e Indústria de Materiais Odontológicos Ltda. São Paulo – SP) com diâmetro interno de 8,0 mm, montada em contra-ângulo (Dabi Atlante® Brasil) com redução de 1:16, acoplado em motor cirúrgico (BML 600 Plus Driller, Driller® Bras) com 1500 rpm. Todas as manobras cirúrgicas foram realizadas sob irrigação constante de solução fisiológica estéril.

5.4.3 IMPLANTAÇÃO DAS MATRIZES 3D DE QUITOSANA E COLÁGENO

Os defeitos ósseos foram preenchidos da seguinte forma (Figura 10b):

- a) No grupo I, não foi feita inserção de biomaterial sendo o defeito preenchido apenas por coágulo sangüíneo, caracterizando-o como grupo controle negativo;

- b) No grupo II, as matrizes de quitosana 4% foram implantadas, tendo sido embebidas previamente em PBS estéril, e acomodadas em toda a extensão do defeito, com ajuda de uma espátula nº 7;
- c) No grupo III, as matrizes de quitosana 15 % foram implantadas, tendo sido, de igual forma, embebidas previamente em PBS estéril, e acomodadas em toda a extensão do defeito, com ajuda de uma espátula nº 7;
- d) No grupo IV, controle positivo, as matrizes de colágeno tipo I foram implantadas, sendo objeto dos mesmos procedimentos descritos para as matrizes de quitosana.
-



Figura 9. Incisão bicoronal na calvária do animal (a) e posicionamento da trefina circular, durante a realização do procedimento de transfixação da calvária do animal (b).

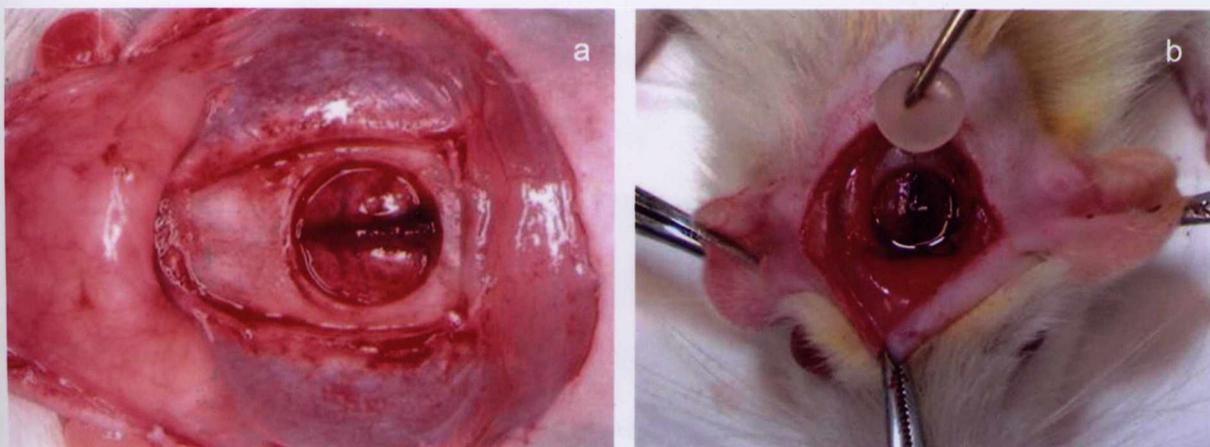


Figura 10. Vista superior do defeito crítico após remoção do bloco ósseo (a) e Implantação da biomatriz 3D no defeito crítico criado na calvária do animal (b).

5.4.4 OBTENÇÃO DAS PEÇAS

Após os pontos biológicos correspondentes aos 7, 15, 45 e 120 dias de pós-operatório, os animais foram sacrificados pela injeção peritoneal de dose letal do anestésico cloridrato de quetamina. Em seguida, foi removida toda a porção superior da calvária, retirando-se todo o tecido mole circunjacente, com exceção da dura-máter e do periósteo. Utilizou-se, para tanto, alicate de corte, e tesoura de extremidade reta e romba.

5.4.5 CLIVAGEM DAS PEÇAS

As peças foram clivadas por meio de discos de aço diamantados montados em contra-ângulo (Dabi Atlante[®] Brasil), em baixa rotação. O fragmento tissular obtido da porção posterior do defeito foi destinado ao processamento histotecnológico, conforme figura 11. O mesmo media 12,5 mm de comprimento, nos quais foram incluídos 2 mm de osso remanescente de cada lado. O corte na margem anterior se estendeu aproximadamente 1,5 mm além da região central do defeito, resultando num fragmento de 12,5 mm de comprimento por 8 mm de altura e aproximadamente 1,5 mm de espessura (Figuras 11 e 12).

Para a análise imunohistoquímica, foram selecionados fragmentos da região anterior ou remanescente do defeito, perfazendo um total de 16 peças, relativas a um espécime por grupo (I,II,III e IV) e, para cada grupo, isoladamente, um fragmento por tempo biológico (7,15,45 e 120 dias).

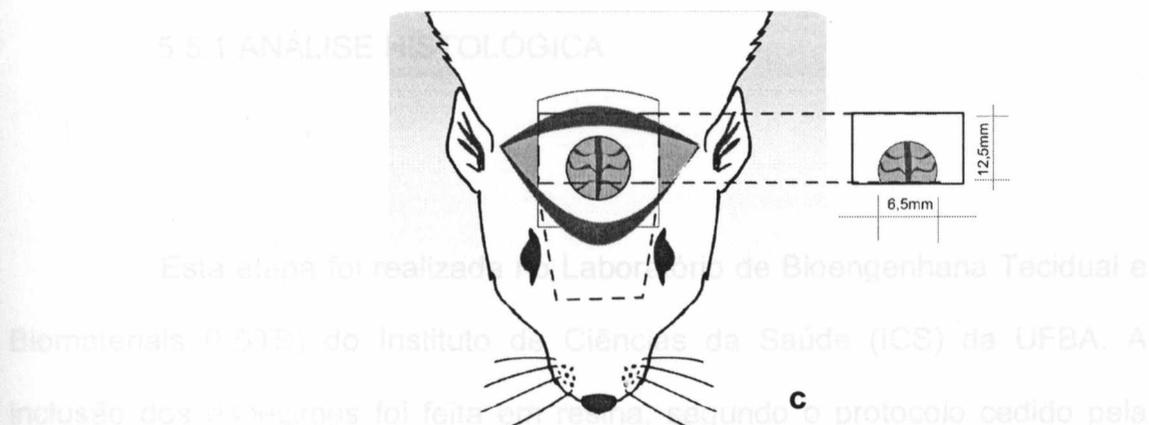
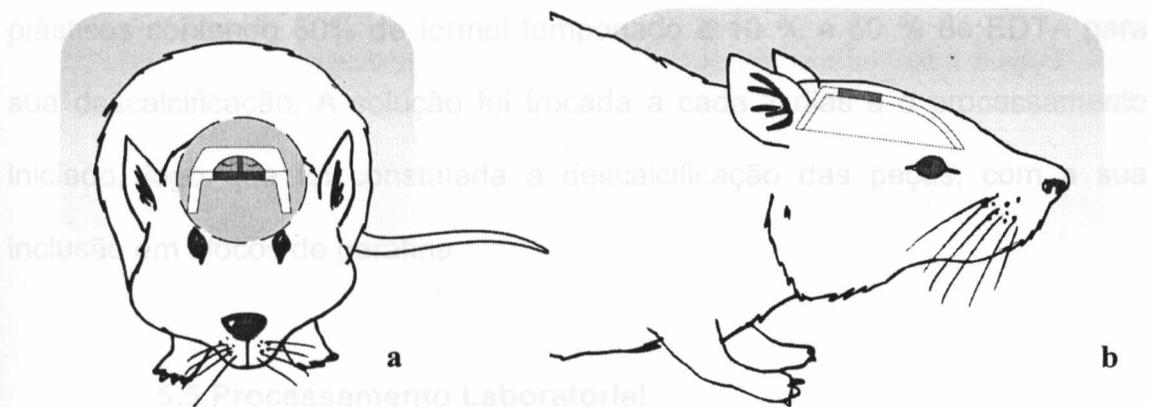


Figura 11. Desenho esquemático da vista frontal do defeito criado na calvária do animal (a), da vista lateral (b). Detalhe do recorte da peça e das linhas de referência utilizadas para o seu recorte (c).

5.4.6 FIXAÇÃO DAS PEÇAS

Para análise histológica, os espécimes obtidos foram colocados em recipientes plásticos contendo formol tamponado a 10 % para fixação (tempo mínimo de sete dias), identificados e acondicionados em geladeira, para posterior inclusão em resina polimetilmetacrilato.

Para marcação imunohistoquímica, os espécimes selecionados, após fixação de 24h em formol 10 %, foram transferidos para outros recipientes

plásticos contendo 50% de formol tamponado a 10 % e 50 % de EDTA para sua descalcificação. A solução foi trocada a cada 2 dias e o processamento iniciado, logo que foi constatada a descalcificação das peças, com a sua inclusão em blocos de parafina.

5.5 Processamento Laboratorial

5.5.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais (LBTB) do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da UFBA. A inclusão dos espécimes foi feita em resina, segundo o protocolo cedido pela Prof^a. Dr^a. Maria Eugênia Leite Duarte¹, do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Previamente à inclusão em resina, os espécimes foram reduzidos com discos de carborundum nº. 409², acoplados em motor elétrico rotativo³, nas partes látero-inferiores, posterior e anterior da calvária (Figura 12). Nesta última, o desbaste excluiu 3mm da região anterior ao defeito.

¹ Comunicação pessoal

² Dremel[®]

³ Dremel[®]

De acordo com a seqüência do protocolo descrito na tabela 2, logo após a fixação em álcool a 70% (etapa I), os espécimes foram desidratados (etapas II, III e IV), clarificados (etapa V) e infiltrados em três soluções diferentes (etapas VI, VII e VIII), descritas na tabela 3. Todas estas etapas foram feitas à temperatura de 4°C.

Etapas	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Solução	Álcool 70%	Álcool 95%	Álcool 100%	Álcool 100%	Xilol	Solução I	Solução II	Solução III
Dias	02	02	01	01	01	02	02	01

Tabela 2. Seqüência do protocolo de processamento histológico em resina metil-metacrilato. (BARRETO, 2006).

Substância	Solução I	Solução II	Solução III
Metil-Metacrilato	75mL	75mL	75mL
Di-Butil-ftalato	25mL	25mL	25mL
Peróxido de Benzoíla	-	1g	25g

Tabela 3. Composição das soluções I, II e III utilizadas nas etapas VI, VII e VIII durante o processamento histológico para inclusão dos espécimes em resina metil-metacrilato. (BARRETO, 2006).

Após estas etapas, os espécimes foram incluídos com a porção anterior do defeito voltado para baixo, em uma base semi-sólida de resina metil-metacrilato. Para isto, colocou-se 2 mL da solução III em frascos de vidro com tampa plástica rosqueável e levados à estufa com temperatura aproximada de 40°C, por no mínimo dois dias, para formar a base. Após a inclusão do espécime e o endurecimento da base, adicionou-se 5 mL da solução III para submergir toda a amostra e formar o bloco de resina. Em

seguida, os frascos foram fechados e colocados na estufa a 40°C por no mínimo três dias, para a completa polimerização da resina.

Posteriormente, os vidros foram quebrados e os blocos desbastados com uma fresa reta⁴, acoplada ao motor elétrico rotativo. Para realização dos cortes histológicos, os blocos recortados foram adaptados ao micrótomo⁵ para cortes de tecidos não descalcificados e desbastados até o diâmetro aproximado de 8,5mm do defeito, mensurado com um compasso de ponta seca e uma régua milimetrada. Em seqüência, realizaram-se os cortes histológicos seriados de 6µm de espessura, os quais foram corados por hematoxilina-eosina (HE), picrossírius-vermelho (PV) para identificação das fibras de colágenas e Tricrômio de Masson Goldner (TG) para observação do tecido ósseo neoformado, e examinados por microscopia de luz comum⁶.

⁴ Dremel®

⁵ Leica RM 2255®

⁶ Leica DM 1000

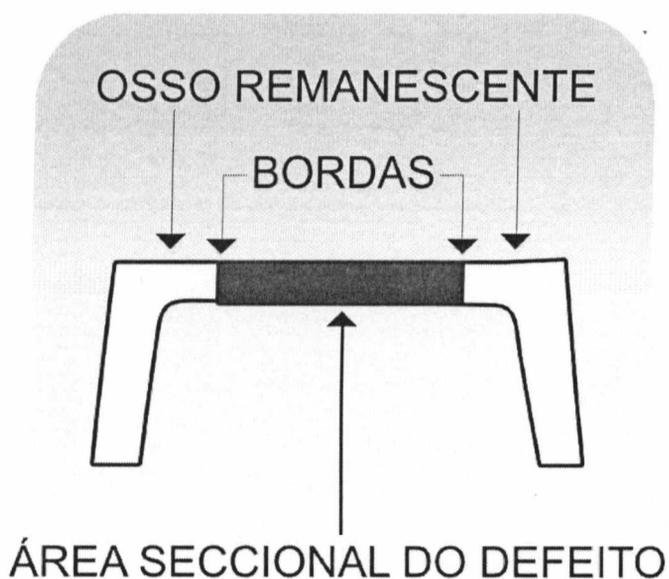


Figura 12. Desenho esquemático, da área seccional do de defeito, após corte no micrótomo.

5.5.2 IMUNOHISTOQUÍMICA

Os 16 blocos de parafina foram cortados na espessura de 8 μm . Após as etapas relativas a desparafinização e sucessivas imersões em álcool, os cortes foram imersos em peróxido de hidrogênio a 0,3% em metanol. Em seqüência, foram incubados no anticorpo primário PECAM -1 (*platelet/endothelial cell adhesion molecule-1*) (SC-1506 Santa Cruz Biotechnology, Inc Vector) por 24 horas. O anticorpo secundário utilizado foi o *Biotinylated Anti-goat IgG (H+L)* feito em soro de cavalo. Para revelação, foi utilizado o DAB (3,3'diaminobenzidina). As lâminas foram, então, visualizadas em microscópio de contraste de fase (*Leica*, Alemanha) e suas imagens capturadas.

Resultados

6 RESULTADOS

6.1 Análises *in vitro*

Como descrito na metodologia, após seu cultivo e expansão em frascos de cultura, mantidos em estufa 5% CO₂ a 37° C, as rBMSC`s foram tripsinizadas e, a partir de então, semeadas sobre as matrizes 3D de quitosana e colágeno, como também, sobre os poços do TCPS, com trocas de meio indutor para osteogênese, a cada dois dias. No décimo quarto dia de cultura, após a indução osteogênica (AMARAL e outros, 2005), visualizamos os achados que passarão a ser evidenciados doravante.

Quando observadas as micrografias ópticas das rBMSC`s cultivadas sobre placas de TCPS, notou-se um grande número de células aderidas à placa, confluentes, alongadas, com aspecto fusiforme típico de células fibroblásticas, como esperado para as rBMSC`s em fase proliferativa. Percebeu-se ainda, não haver diferenças marcantes no aspecto das rBMSC`s quando cultivadas com a adição do RS (Figura 13 a), quando comparada ao grupo controle (FBS), apesar da grande densidade de células presentes no controle (Figura 13 b). Em adição, nas placas que continham meio enriquecido

com RS, percebeu-se a presença de material aglutinado, de coloração escura, em vários pontos. Atribuiu-se a essa ocorrência o fato do soro do rato não ter sido filtrado, com o objetivo de que fossem preservadas ao máximo, as proteínas presentes no mesmo, essenciais para o comportamento celular quando em cultura, os quais podem ter influenciado negativamente no espalhamento celular, muito embora, tenha sido percebida uma grande densidade de células aderidas e em pré-confluência.

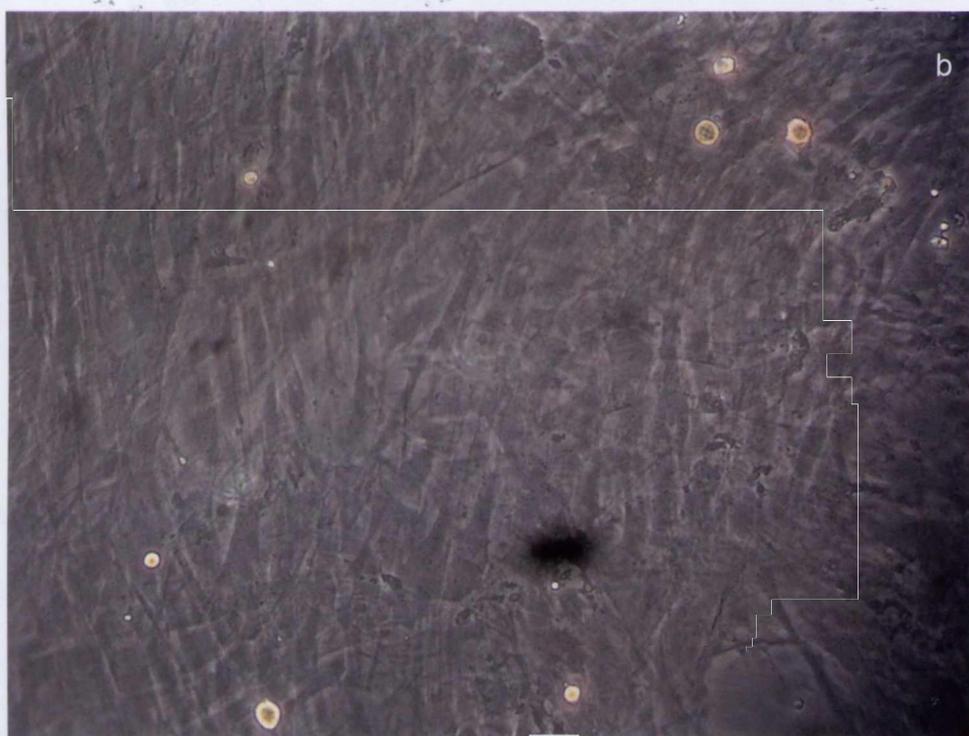
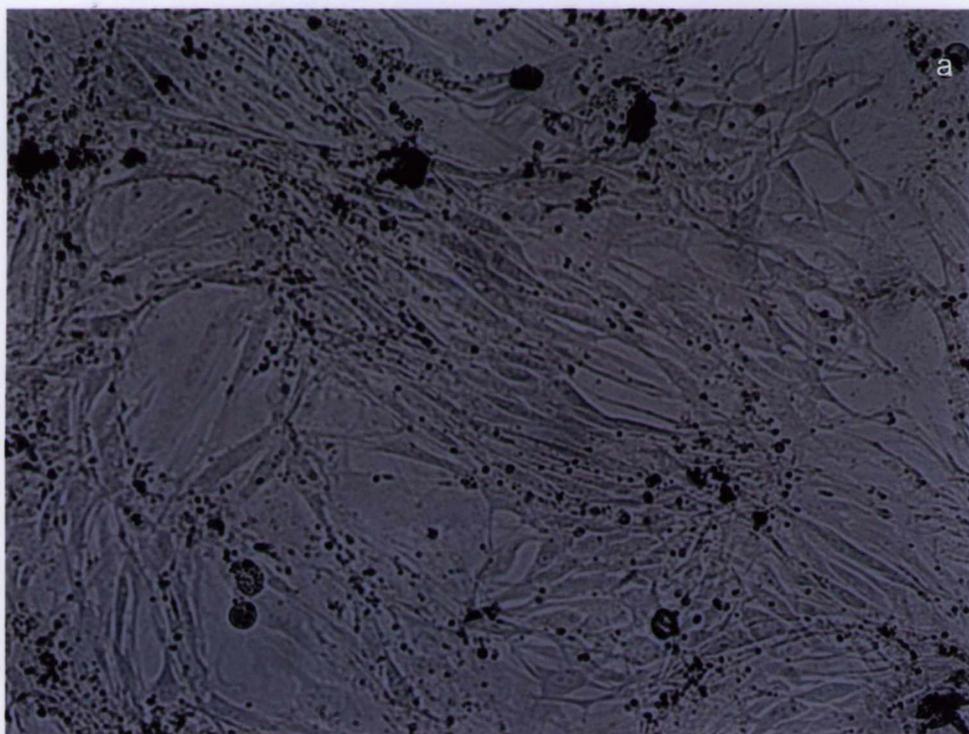


Figura 13. Morfologia das rBMSC's cultivadas em TCPS, 14 dias após a semeadura e cultivo com meio osteogênico enriquecido: a) RS b) FBS. Imagens obtidas a partir de Microscópio Óptico Invertido de Contraste de Fase, *Leica*, Alemanha.

6.1.1 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular das células semeadas nas matrizes, foi avaliada usando-se o substrato fluorogênico, calceína AM e o iodeto de propídio, um contra-corante. O fundamento para sua aplicação consiste no fato de que a calceína difunde-se facilmente para o interior celular, sendo hidrolisada por esterases a metabólitos fluorescentes, os quais permanecem no meio interno quando da existência de membranas plasmáticas íntegras, portanto, células viáveis. O iodeto de propídio, por sua vez, é utilizado como contra-corante para identificar células não viáveis, visto que, difunde-se rapidamente através de membranas estruturalmente comprometidas. Nesse ensaio, as células viáveis fluorescem verde e as células mortas fluorescem em vermelho. Para a quitosana 4%, as imagens correspondentes as rBMSC's cultivadas em RS (Figura 14 a), apresentaram pequena densidade celular, com poucos pontos fluorescendo em verde, sendo quase imperceptível, em adição, pontos vermelhos, indicativos de inviabilidade celular, quando observados na ampliação utilizada. Os achados nesse ensaio são corroborados, com os resultados oriundos do ensaio da f-actina, descritos mais a frente. Para as micrografias relativas ao cultivo das rBMSC's sobre a quitosana 15% (Figuras 14 c, d), percebeu-se, também uma pequena densidade celular, no que diz respeito à sua viabilidade, quando cultivadas nos dois tipos de soro, e um número considerável de pontos vermelhos, indicativos de morte celular, na micrografia das rBMSC's cultivadas com o meio enriquecido com o RS (Figura 14 c), quando comparada a micrografia ilustrativa do comportamento celular sobre a quitosana 4% (Figura 14 a). Quando comparadas as micrografias

relativas as rBMSC's cultivadas em meio enriquecido com o FBS (Figuras 14 b, d), percebeu-se de forma clara, que houve um maior número de células viáveis e aderidas à quitosana 4% (Figura 14 b) em relação a de 15% (Figura 14 d), o que sugeriu que o DA, independente do soro utilizado, deve ter interferido na adesão e conseqüente proliferação celular. Foi realizada também, a análise da viabilidade celular para as rBMSC cultivadas sobre a matriz tridimensional de colágeno, o qual funcionou como controle positivo nesse estudo. Ficou evidenciada intensa viabilidade celular, com presença de células no interior dos seus poros, em especial na borda do biomaterial, de forma muito semelhante aos achados relatados por Amaral e colaboradores (2005) com quase imperceptíveis pontos vermelhos, indicativos de inviabilidade celular (Figura 14 e).

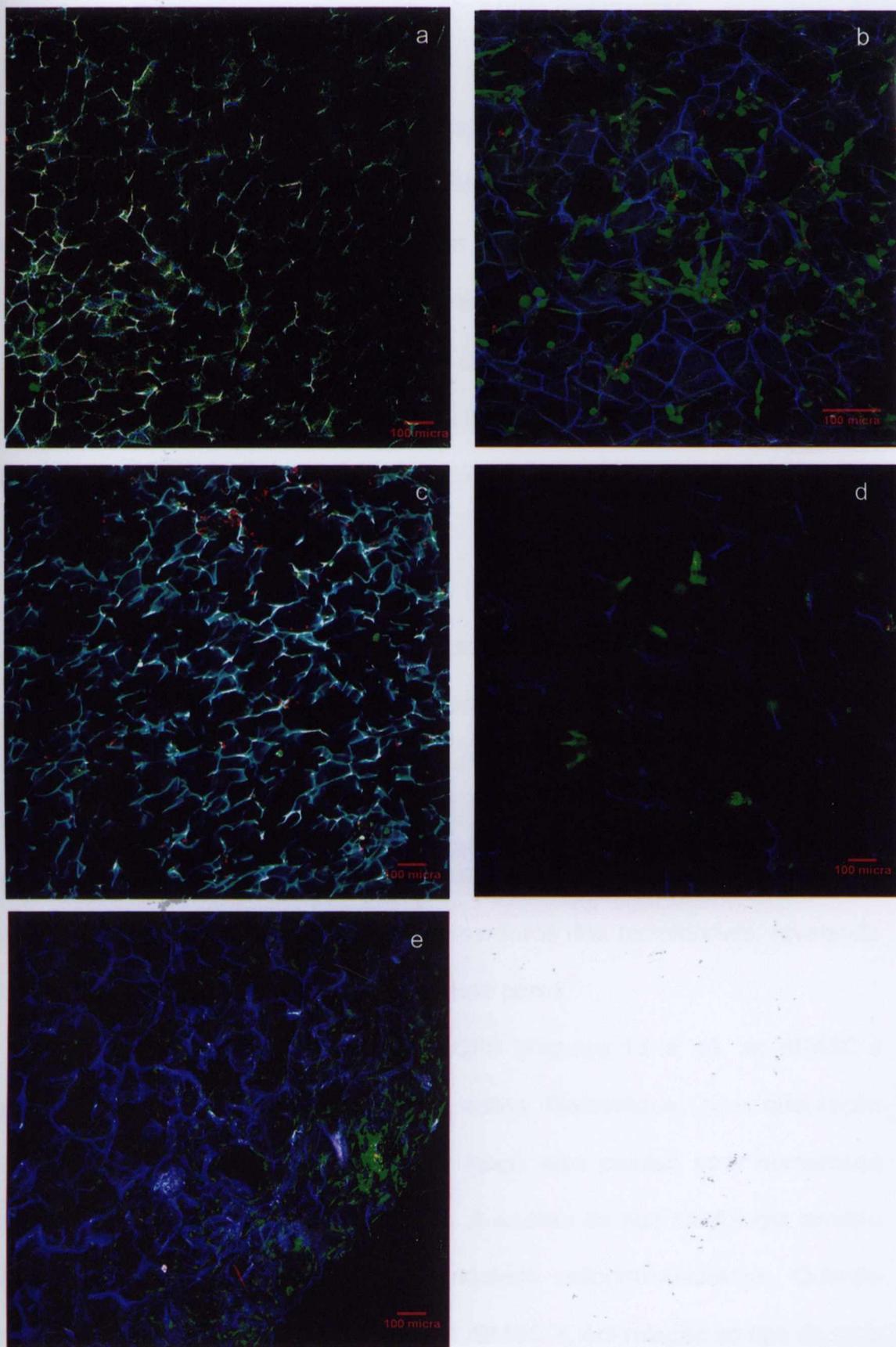


Figura 14. Análise da viabilidade das rBMSC's 14 dias após a semeadura e cultivo com meio osteogênico enriquecido com RS e FBS. Quitosana 4%: a) RS b) FBS; quitosana 15%: c) RS d) FBS; Colágeno: e) RS. Microscópio Confocal (Laser Scanning Confocal Microscope – Leica Microsystems, Germany). Retra de calibração=100µm.

6.1.2 AVALIAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO DO CITOESQUELETO

As figuras a seguir são micrografias obtidas por microscopia de fluorescência das matrizes 3D de quitosana, em seus 2 DA's, e colágeno, semeadas com rBMSC's, cultivadas em meio para cultura celular α -MEM suplementado com fungizona e penicilina/estreptomicina. Um grupo de células, como mencionado no capítulo que trata da metodologia, foi cultivado com o referido meio enriquecido com FBS. Ao outro grupo de células foi adicionado meio enriquecido com RS. Também, as rBMSC foram cultivadas em TCPS, nas mesmas condições descritas acima.

Foi possível visualizar o DNA, o qual fluoresce em vermelho, e os feixes filamentosos da actina, os quais fluorescem em verde, delimitando todo o citoplasma celular, assim como, numerosas extensões correspondentes a filopódios celulares. Ainda, tais micrografias revelaram células com aspecto estrelado e fusiforme, além de núcleos arredondados/ovalados. As células foram localizadas em diferentes profundidades nas matrizes, apresentando longos filamentos, inclusive penetrando nos poros dos biomateriais, revelando proliferação celular por cima e por dentro dos poros.

Quando cultivadas sobre o TCPS (Figuras 15 a, b), as rBMSC's apresentaram uma complexa rede de actina filamentosa, com orientação paralela uma em relação a outra e ao longo eixo celular, com numerosos filamentos delimitando todo o citoplasma. A análise de sua morfologia revelou células estreladas e fusiformes, com núcleos redondos/ovalados. Quando analisadas a morfologia e distribuição das rBMSC's, em relação ao tipo de soro adicionado ao meio, não foram percebidas discrepâncias, aos 14 dias após

semeadura, o que sugere que o RS apresenta, assim como, o FBS, as proteínas e fatores de crescimento necessárias para a adesão e proliferação celulares das rBMSC's.

Ao se analisar a morfologia e distribuição celulares das rBMSC's sobre a matriz de quitosana 4% (Figuras 15 c, d, e, f) notou-se que a sua morfologia poligonal e distribuição são muito semelhantes as das rBMSC's cultivadas sobre o TCPS, ou seja, na ausência de biomaterial, o que sugere que o DA de 4% não interferiu negativamente nesses dois aspectos. Com relação a adesão e proliferação, as células apresentaram-se bem aderidas, com os filamentos da f-actina bem tensionados, com extensões filamentosas localizadas nas regiões interporos e, também, com embricamento intercelular e com sua distribuição revestindo a parede interna das porosidades, além de, longas extensões correspondentes a filopódios. No que tange, a interferência do tipo de soro, na morfologia, distribuição, percebeu-se claramente uma maior densidade celular em vários pontos da matriz e nas micrografias selecionadas, naquelas matrizes cujas células tiveram meio enriquecido com RS (Figuras 15 c,d), muito embora, as rBMSC's cultivadas com a adição do FBS (Figuras 15 e, f), também, apresentaram aspecto similar as demais, embora os filamentos de f-actina apresentem-se menos tensionados, com extensões citoplasmáticas mais curtas, pouco embricamento intercelular e interporos. Em adição, não se percebeu, o arranjo característico das rBMSC's recobrimo internamente as porosidades como quando observada a micrografia correspondente ao RS (Figuras 15 c, d).

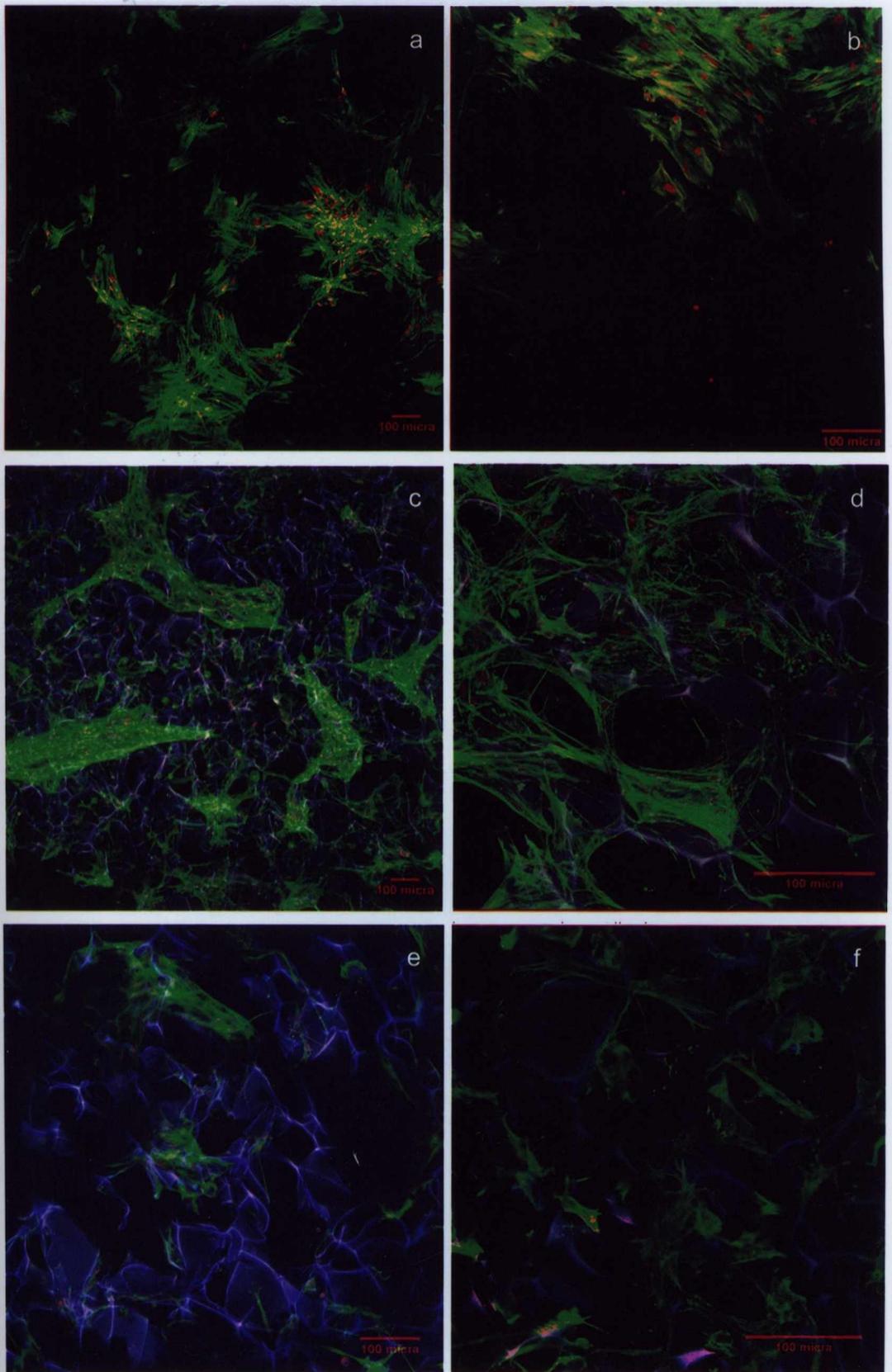


Figura 15. f-actina (verde) e DNA (vermelho) das rBMSC's, após 14 dias de cultivo em meio osteogênico sobre TCPS: a) RS b) FBS. Sobre matriz 3D de quitosana 4%: c) RS d) RS e) FBS f) FBS. Microscópio Confocal (Laser Scanning Confocal Microscope – Leica Microsystems, Germany). Reta de calibração=100µm.

Quando analisadas as rBMSC's sobre a quitosana a 15% (Figura 16), embora tenha sido possível a visualização de células aderidas, especialmente por sobre a matriz (Figura 16 a), suas extensões filamentosas citoplasmáticas apresentaram-se mais curtas (Figura 16 c), sendo notória também, uma grande intensidade de células arredondadas/ovaladas (Figuras 16 e, f), sugerindo assim, a possível interferência do DA da quitosana na adesão e proliferação celulares. Em adição, não é percebido o tensionamento dos filamentos de f-actina e nem o arranjo em feixes observado nas rBMSC's cultivadas sobre a quitosana 4%, especialmente, as que receberam RS como suplemento de cultura (Figuras 16 b, d, e) . E, na medida, em que são visualizadas regiões mais profundas da esponja, a morfologia das células se tornou mais esférica, acompanhando o formato dos seus núcleos (Figura 16 f).

Quando avaliados os papéis dos diferentes tipos de soro, RS e FBS, sobre o comportamento celular, mais uma vez, as rBMSC's, semeadas sobre a quitosana 15%, e cujo meio foi enriquecido com RS (Figuras 16 a, b, c, d), apresentaram extensões citoplasmáticas mais proeminentes, com extensões citoplasmáticas pronunciadas, com a presença de filopódios, aspectos mais fusiforme, no entanto, ainda, sem interconexões celulares, sem embricamento de prolongamentos filamentosos e com pequeno tensionamento das fibras da f-actina (Figura 16 c). Ressalta-se que quando as rBMSC's foram cultivadas em FBS, mesmo sobre a borda da matriz (Figura 16 e), o seu aspecto foi esferoidal, com ausência de arranjos filamentosos, filopódios, inexistência de tensionamento fibrilar e com menor densidade celular na medida em que cortes mais profundos eram visualizados, sugerindo-se de novo a possível interferência negativa do DA, especialmente na adesão celular.

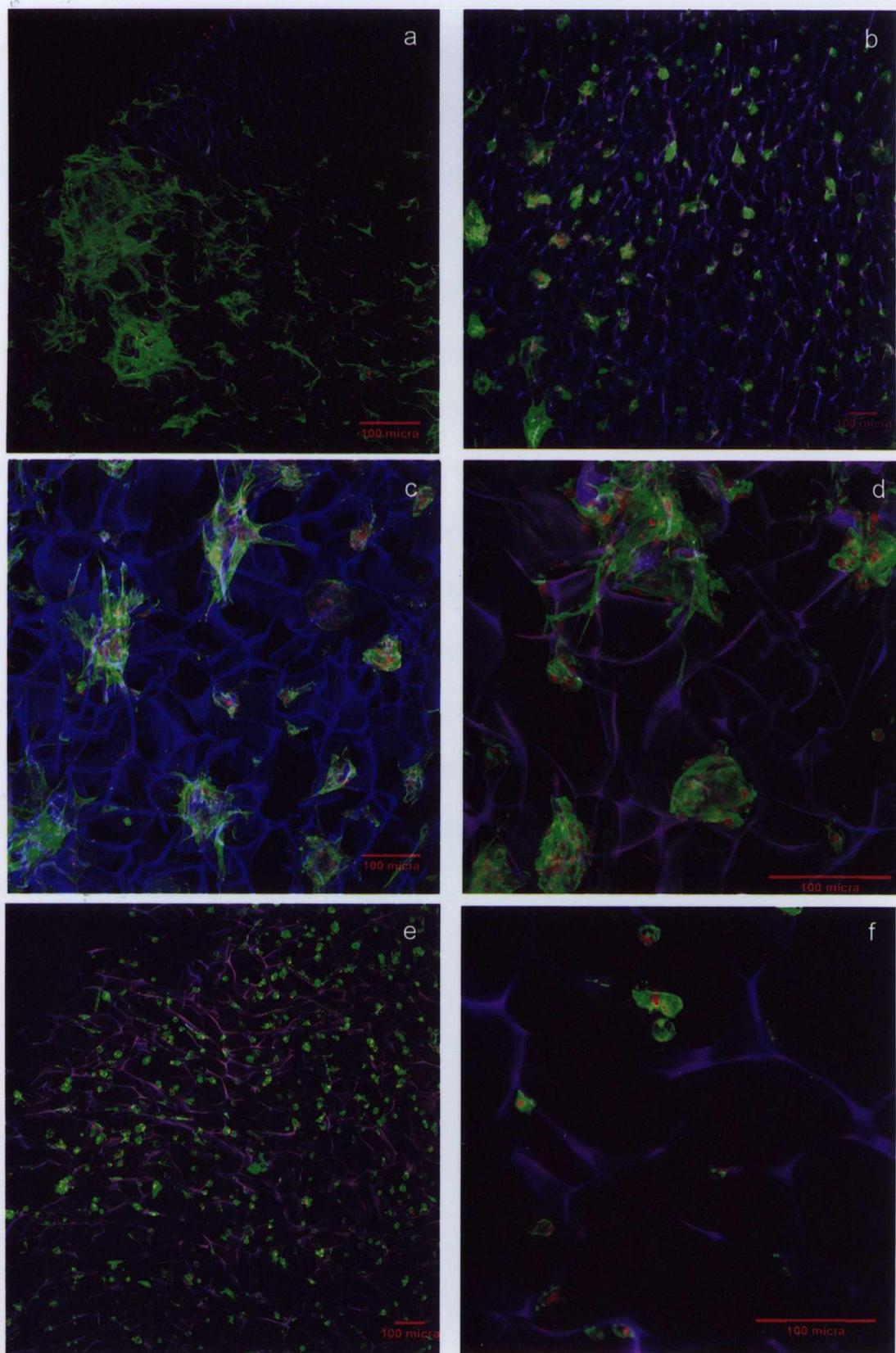


Figura 16. f-actina (verde) e DNA (vermelho) das rBMSC's, após 14 dias de cultivo em meio osteogênico sobre matriz 3D de quitosana 15% enriquecido com RS: a) Borda da matriz b) Centro da Matriz c) Centro da Matriz d) Centro da Matriz e enriquecido com FBS: e) Borda da matriz f) Centro da Matriz. Microscópio Confocal (*Laser Scanning Confocal Microscope – Leica Microsystems, Germany*). Reta de calibração=100µm.

Por fim, ao se esquadrihar a morfologia e distribuição celulares das rBMSC's sobre a matriz de colágeno, notou-se uma grande densidade celular desde a borda da matriz até os cortes de maior profundidade (Figura 17). A malha de f-actina apresentou-se extremamente marcante, com embricamento de seus prolongamentos em todos os sentidos, recobrando quase que totalmente toda a extensão superficial e interna das matriz tridimensional. O tensionamento dos bandos de feixes apresentou-se claramente visível, com morfologia celular fusiforme e estrelada, e núcleos redondos/ovalados. Os poros apresentaram-se quase que completamente revestidos por extensões celulares e, em adição, constatou-se a presença de material amorfo sugestivo de matriz colagênica (Figura 17 e). No que tange, a interferência do tipo de soro, na morfologia, distribuição, adesão e proliferação celulares, percebeu-se não ter havido diferenças marcantes na adesão e proliferação celulares, morfologia e distribuição das células, nos dois tipos de soro, muito embora, tenha sido notada uma maior densidade celular nas matrizes cujas células tiveram meio enriquecido com RS (Figuras 17 a, b,c, d).

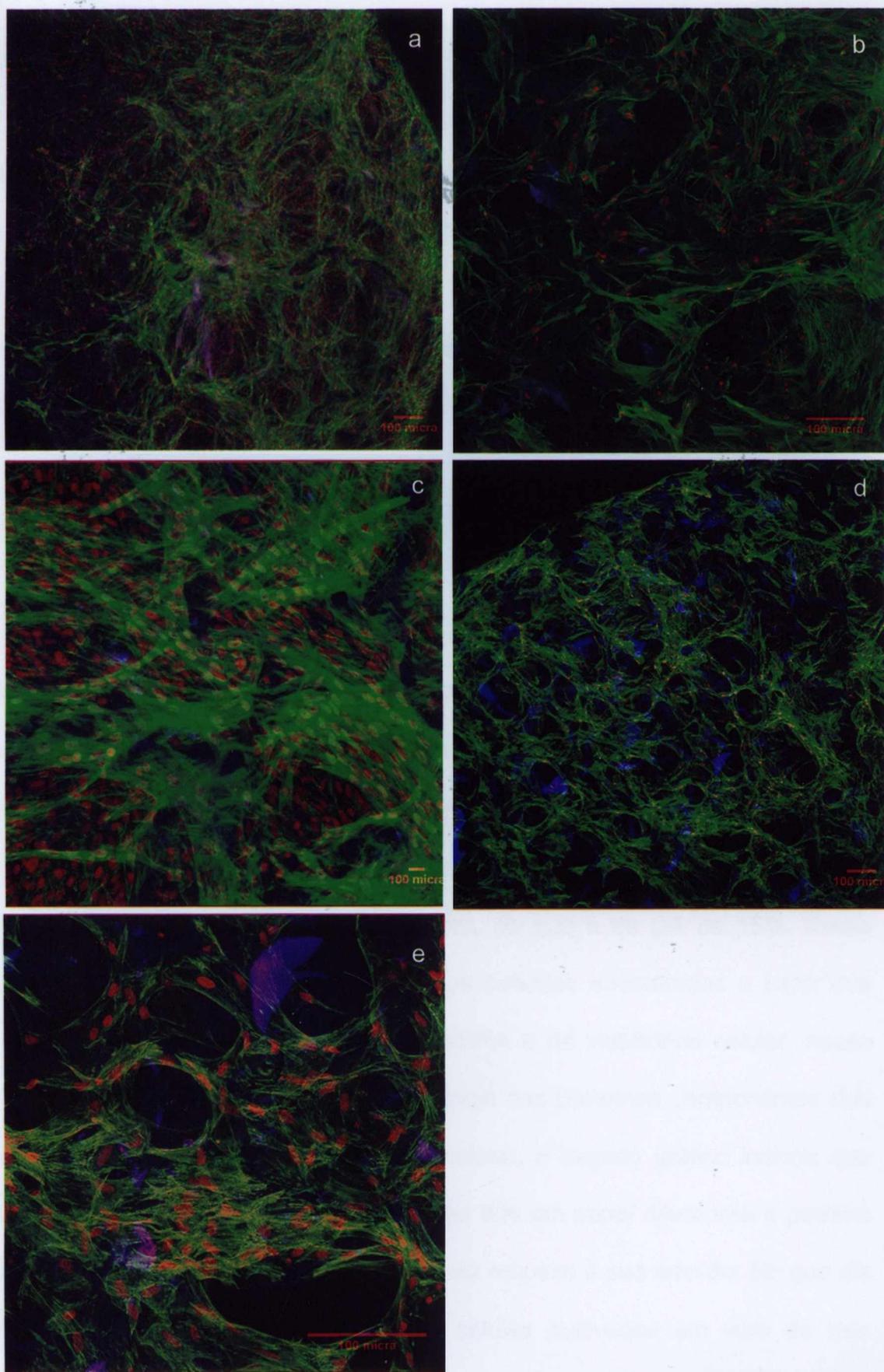


Figura 17. f-actina (verde) e DNA (vermelho) das rBMSC's, após 14 dias em meio osteogênico sobre matriz 3D de colágeno enriquecido com RS: a) Borda da matriz; b, c) Centro da Matriz; Centro da Matriz e enriquecido com FBS: e) Borda da matriz f) Centro da Matriz. Microscópio Confocal (*Laser Scanning Confocal Microscope – Leica Microsystems, Germany*). Retas de calibração=100µm.

6.1.3. ENSAIO PARA QUANTIFICAÇÃO DE DNA UTILIZANDO-SE *HOECHST* 33258

Para quantificar a adesão e proliferação celulares foi realizado o ensaio de quantificação de DNA. Utilizou-se um kit disponível comercialmente para este fim (DNA-QF, Sigma), o qual tem como fundamento a ligação de seqüências Adenina-Timina (AT) ao corante fluorescente bisBenzamida (*Hoechst* 33258, Sigma). A leitura dos resultados foi feita em fluorímetro com excitação máxima em 365 nm e emissão em 460 nm.

6.1.3.1 Avaliação da Adesão Celular

De acordo com o gráfico obtido a partir da quantificação do conteúdo de DNA das rBMSC's após 24 de incubação (Figura 18), houve uma maior adesão das rBMSC's à matriz do colágeno, quando comparadas à adesão das mesmas células às matrizes de quitosana, nos seus dois DA's. Quando avaliadas as matrizes de quitosana, isoladamente, a de DA de 4%, propiciou uma maior densidade de células aderidas, do que a de DA de 15%. Esses resultados estão em consonância com os achados encontrados a partir dos ensaios anteriormente descritos, f-actina/DNA e de viabilidade celular, nesse mesmo trabalho. Relativamente, a influência das proteínas componentes dos soros adicionados ao meio na adesão celular, o traçado gráfico indicou que para a matriz de colágeno, o FBS pode ter tido um papel diferencial e positivo no comportamento das rBMSC's no que diz respeito à sua adesão. No que diz respeito às matrizes de quitosana, as células cultivadas em soro de rato apresentaram melhores taxas de adesão do que aquelas cultivadas em FBS,

muito embora, a discrepância não tenha sido marcante. Esses achados, também, vêm corroborar os encontrados nos ensaios descritos anteriormente.

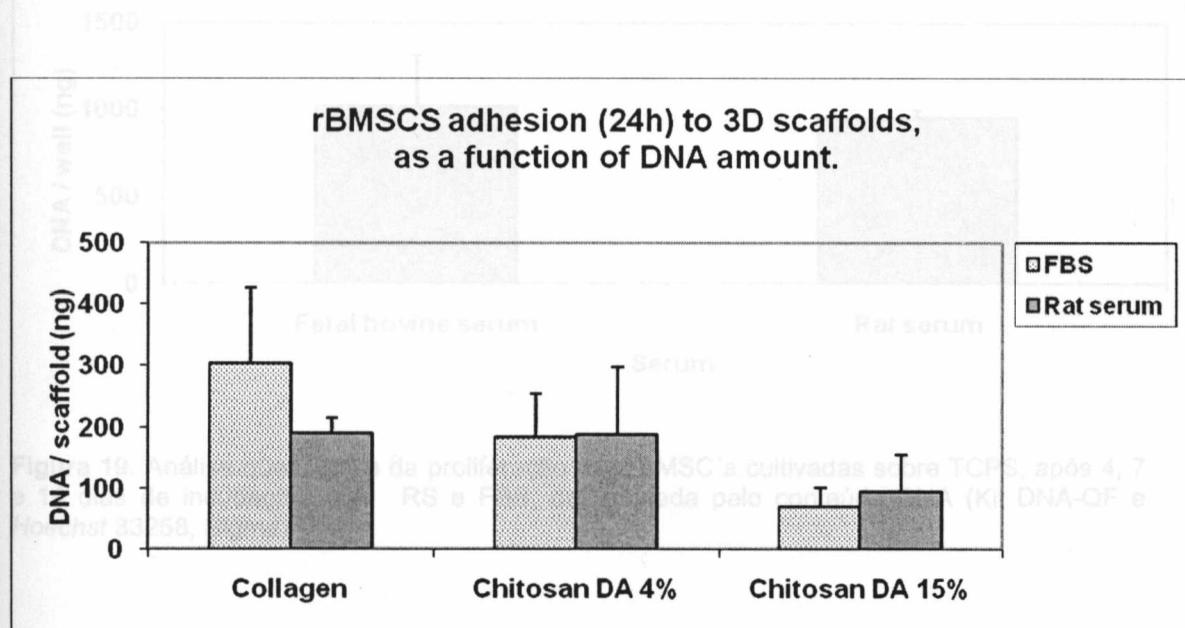


Figura 18. Análise quantitativa da adesão das rBMSC's cultivadas em diferentes matrizes 3D, após 24h de incubação, com RS e FBS, determinada pelo conteúdo de DNA (Kit DNA-QF e Hoechst 33258, Sigma).

6.1.3.2 Avaliação da Proliferação Celular

Quando avaliada a proliferação celular sobre o TCPS (Figura 19), diminuição do mesmo, certamente, em razão de morte celular. Nesse contexto, que funcionou como controle, percebeu-se um maior conteúdo de DNA, após 14 dias de cultivo celular, das rBMSC's cujo meio foi enriquecido com o FBS, muito embora, tal diferença não tenha sido expressiva. Esse achados também estão em consonância com o ensaio da f-actina, no qual se observou, distribuição e morfologia muito semelhantes das rBMSC's quando cultivadas nos dois tipos de soro.

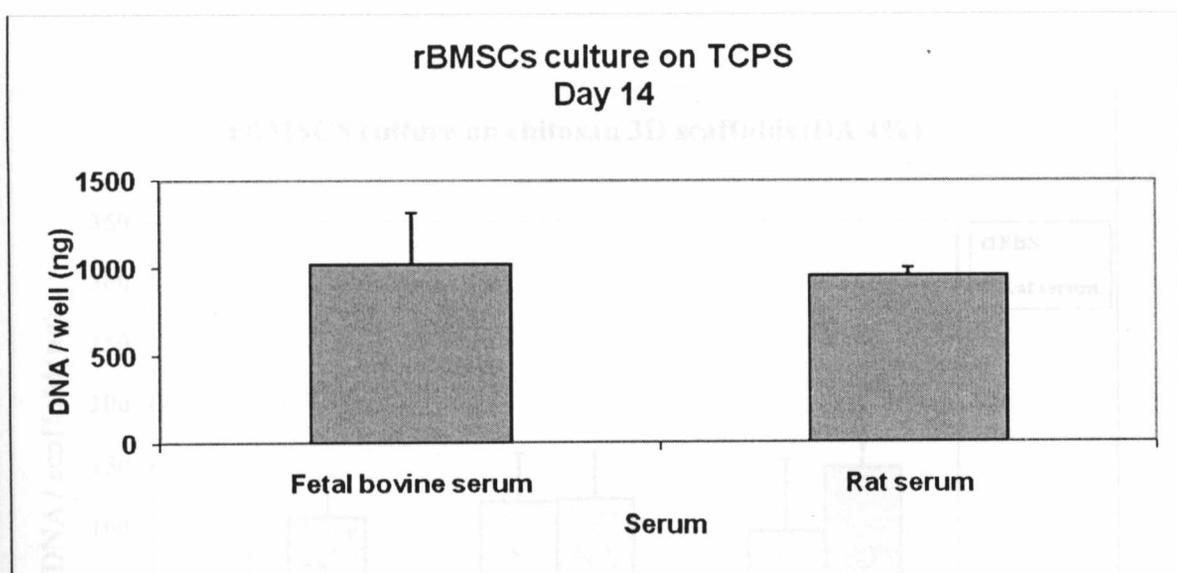


Figura 19. Análise quantitativa da proliferação das rBMSC's cultivadas sobre TCPS, após 4, 7 e 14 dias de incubação, com RS e FBS, determinada pelo conteúdo DNA (Kit DNA-QF e Hoechst 33258, Sigma).

Ao se apurar os resultados da proliferação celular, sobre as matrizes de quitosana 4%, quando cultivadas em RS, percebeu-se que o conteúdo de DNA foi incrementado paulatinamente do dia 4 para o dia 14, como esperado e notado nos demais ensaios. Ao serem cultivadas em FBS, no entanto, o conteúdo foi incrementado até o sétimo dia e aos 14 dias foi notada uma diminuição do mesmo, certamente, em razão de morte celular. Nesse contexto, o RS apresentou os melhores resultados no que tange a proliferação de rBMSC's sobre matriz 3D de quitosana 4% (Figura 20).

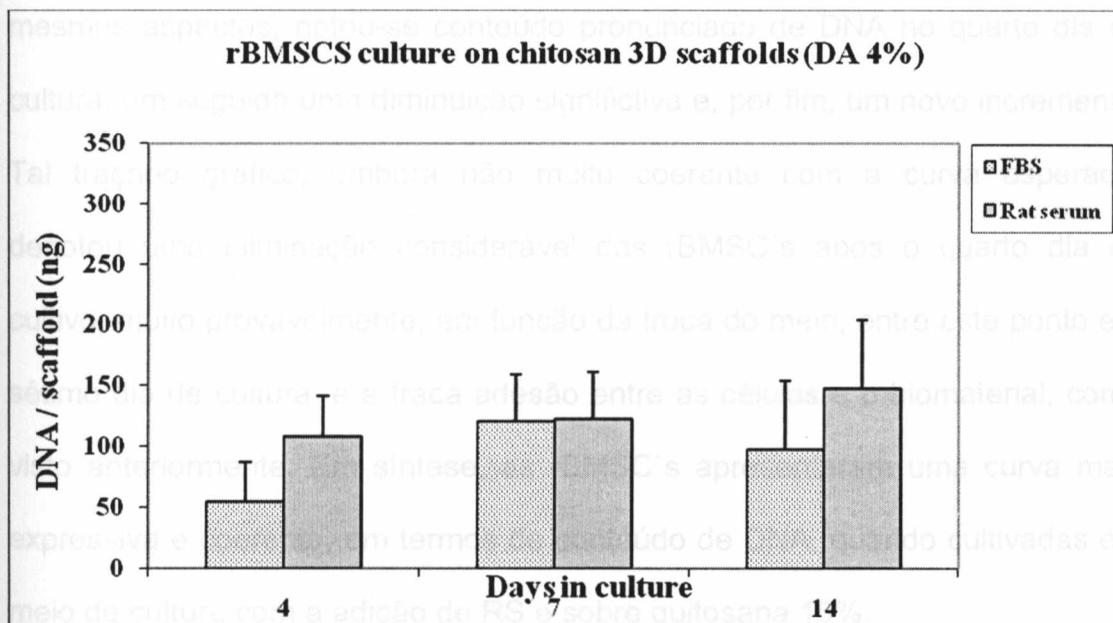


Figura 20. Análise quantitativa da proliferação das rBMSC's cultivadas sobre quitosana 4%, após 4, 7 e 14 dias de incubação, com RS e FBS, determinada pelo conteúdo DNA (Kit DNA-QF e Hoechst 33258, Sigma).

Quando esquadrihada a proliferação celular sobre as matrizes 3D de quitosana 15% (Figura 21), cultivadas em RS, notou-se que a proliferação das rBMSC's não foi tão expressiva quanto a que ocorreu sobre o TCPS e sobre as matrizes de quitosana 4%, mesmo que, ainda assim, tenha sido percebido o seu incremento desde o dia 4 até o dia 14. Este achado também está de acordo com o encontrado, em especial, no ensaio da f-actina, quando foi notável a pequena adesão celular ao biomaterial. As células apresentavam-se arredondadas e, por vezes, não foi visível a presença de prolongamentos citoplasmáticos correspondentes a filopódios. Ao longo desses 14 dias, durante as muitas trocas de meio, as células fracamente ou não aderidas, devem ter sido destacados, restando, assim, uma fração menos representativa de DNA correspondente às mesmas. Reforça-se, desta forma, a possível interferência do DA de 15% sobre a adesão celular e, em consequência, sobre o seu

comportamento proliferativo. Quando avaliada a interferência do FBS sobre os mesmos aspectos, notou-se conteúdo pronunciado de DNA no quarto dia de cultura, em seguida uma diminuição significativa e, por fim, um novo incremento. Tal traçado gráfico, embora não muito coerente com a curva esperada, denotou uma eliminação considerável das rBMSC's após o quarto dia de cultivo, muito provavelmente, em função da troca do meio, entre este ponto e o sétimo dia de cultura, e a fraca adesão entre as células e o biomaterial, como visto anteriormente. Em síntese, as rBMSC's apresentaram uma curva mais expressiva e coerente, em termos de conteúdo de DNA, quando cultivadas em meio de cultura com a adição de RS e sobre quitosana 15%.

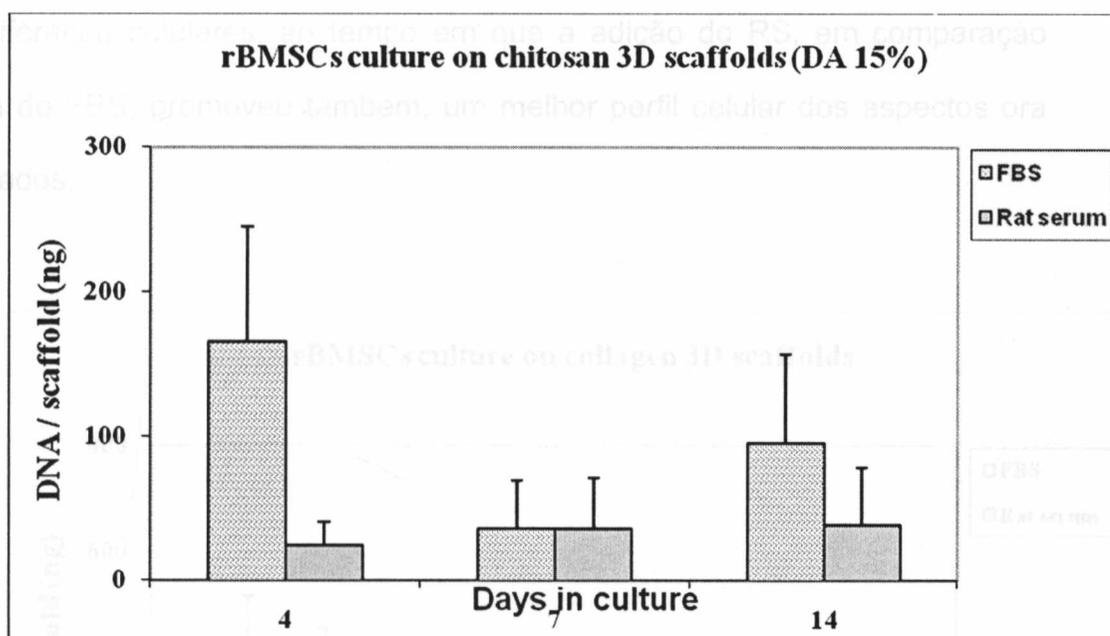


Figura 21. Análise quantitativa da proliferação das rBMSC's cultivadas sobre quitosana 15%, após 4, 7 e 14 dias de incubação, com RS e FBS, determinada pelo conteúdo DNA (Kit DNA-QF e *Hoechst* 33258, Sigma).

Ao se examinar a interação existente entre as matrizes 3D de colágeno e as rBMSC's, e, ainda ao RS, notou-se que o traçado ilustra adesão celular e proliferação entre o quarto e sétimo dia, com diminuição do conteúdo

de DNA no ponto representativo dos 14 dias (Figura 22). Em adição, quando se avaliou a mesma interação, mas com a inserção do FBS ao meio de cultura, percebeu-se que as células, embora tenham aderido bem inicialmente, como visto no dia 1 (Figura 18) e dia 4 (Figura 22), a partir de então, apresentaram um decréscimo acentuado do conteúdo de DNA, entre o quarto e sétimo dia e, sutil entre o sétimo e o décimo quarto dia de cultura, mesmo salientando-se que entre os dias do primeiro intervalo temporal, só houve uma troca de meio de cultura nos poços, e entre o segundo período, duas trocas de meio foram realizadas.

Em resumo, percebeu-se, nesse ensaio, que na medida em que o DA da matriz 3D de quitosana aumentou, diminuiu em contra-partida a adesão e proliferação celulares, ao tempo em que a adição do RS, em comparação com a do FBS, promoveu também, um melhor perfil celular dos aspectos ora analisados.

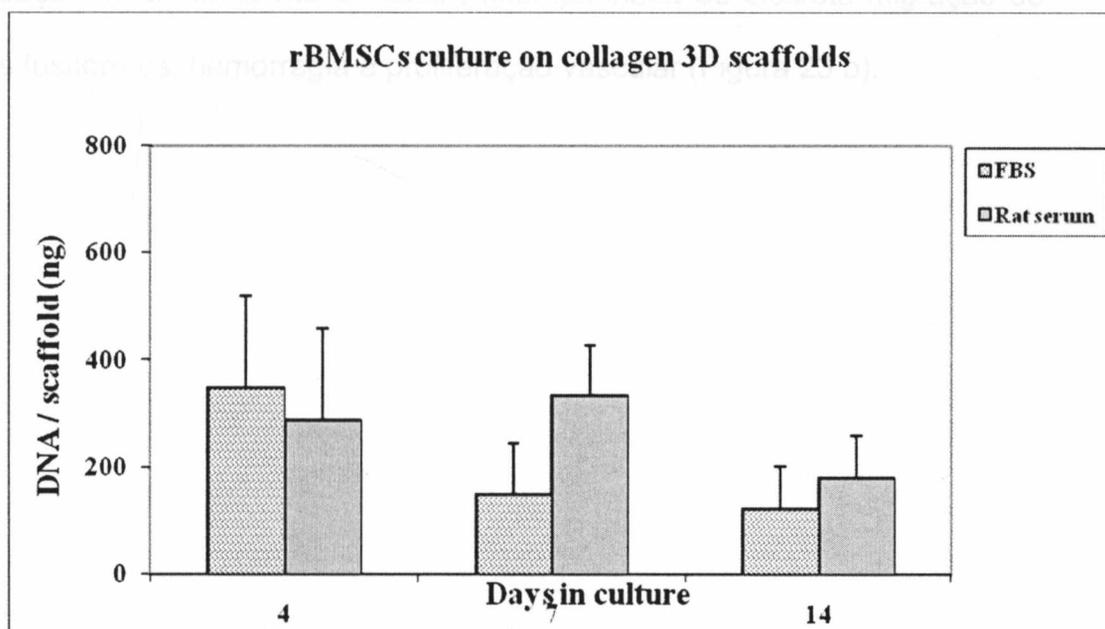


Figura 22. Análise quantitativa da proliferação das rBMSC's cultivadas sobre colágeno, após 4, 7 e 14 dias de incubação, com RS e FBS, determinada pelo conteúdo DNA (Kit DNA-QF e Hoechst 33258, Sigma).

6.2 Análise *in vivo*

6.2.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA

6.2.1.1 Grupo I em diferentes pontos biológicos:

GRUPO I - 7 dias

Observou-se discreta proliferação reativa nas bordas ósseas do defeito, mais concentrada na porção superior da borda voltada para o retalho, com a presença de poucos osteoblastos (Figura 23 a).

Toda a extensão do defeito esteve ocupada por um tecido fibroso delgado, sendo mais delgado ainda no centro da lesão (Figura 23 a).

Presença esporádica de fragmentos ósseos remanescentes, e uma leve reação inflamatória mononuclear, acompanhada de discreta migração de células fusiformes, hemorragia e proliferação vascular (Figura 23 b).

GRUPO I – 15 dias

As bordas ósseas do defeito apresentavam aspecto morfológico irregular, com a presença de tecido conjuntivo fibroso pouco denso, preenchendo toda extensão do defeito. Foi observada uma moderada proliferação de capilares sanguíneos, mais evidentes próximo às bordas ósseas (Figura 24 b).

Identificou-se inflamação crônica discreta, com proliferação moderada de células mesenquimais fusiformes e fibroblastos.

Observou-se ainda a presença de discreto pigmento castanho, a hemossiderina, em acúmulos focais.

A área central do defeito foi caracterizada pela presença de pequenos núcleos de mineralização (Figura 24 b).

GRUPO I - 45 dias

Presença de tecido fibroso com maior densidade. Comparativamente ao aspecto observado com 15 dias, houve uma redução em espessura de toda extensão linear do defeito (Figura 25 b).

Observou-se em toda extensão do defeito ausência de células inflamatórias. Visualizou-se vasos e proliferação de células fusiformes, com intensidade mais acentuada próxima às bordas ósseas (Figura 26b).

Na região das bordas do reparo foi identificada a presença de uma discreta ossificação reparativa. A área central do defeito foi caracterizada pela ausência de núcleos de mineralização (Figura 25 b).

Eventualmente, foi vista moderada quantidade de pigmento acastanhado na coloração HE, a hemossiderina, no interior de macrófagos. Neste caso havia, de forma concomitante, abundante proliferação de capilares e de células fusiformes, identificadas como fibroblastos (Figura 25 a).

GRUPO I - 120 dias

As bordas ósseas do defeito apresentavam ausência total de proliferação osteoblástica. Notou-se, na maior parte dos casos, presença de fibrose mais densa envolvendo toda extensão do defeito. Sua intensidade apresentava-se muito maior em relação aos outros pontos biológicos relacionados com o mesmo grupo-controle deste estudo. Mais próximo às bordas ósseas, foi possível identificar a presença de vasos, que se tornava discreta à proporção que se distanciava das bordas em direção ao centro do defeito.

Em toda a extensão do defeito notou-se ausência de células inflamatórias e, em alguns casos, na região central do defeito pôde-se visualizar núcleos de mineração focal (Figura 27).

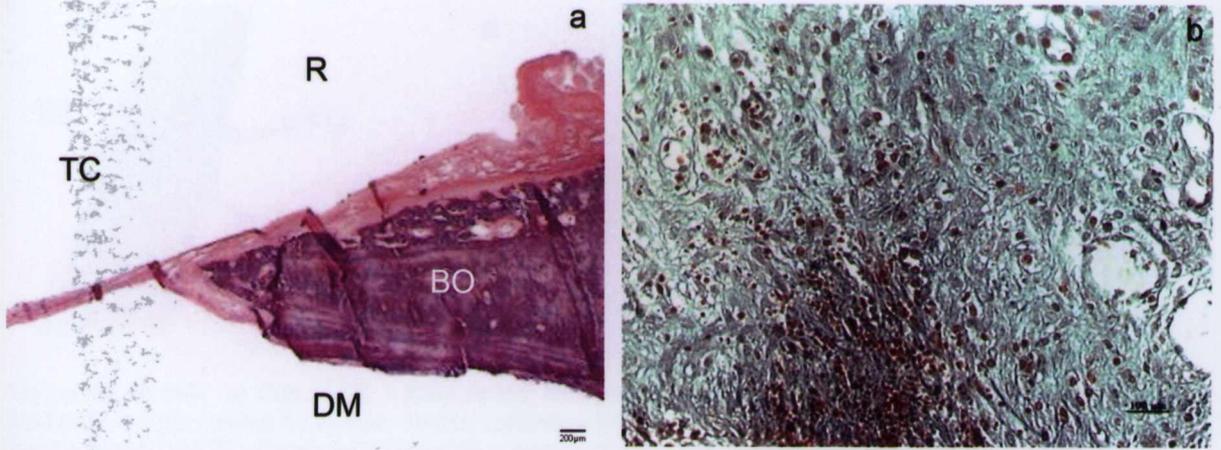


Figura 23. GI 7D. a) HE - Aspecto da borda do defeito, com proliferação óssea reparativa.; b) MASSON – Área central do defeito com hemorragia, edema e vasos sanguíneos. **Legenda:** Retalho (R); Tecido Conjuntivo (TC); Dura-máter (DM); Borda Óssea (BO).

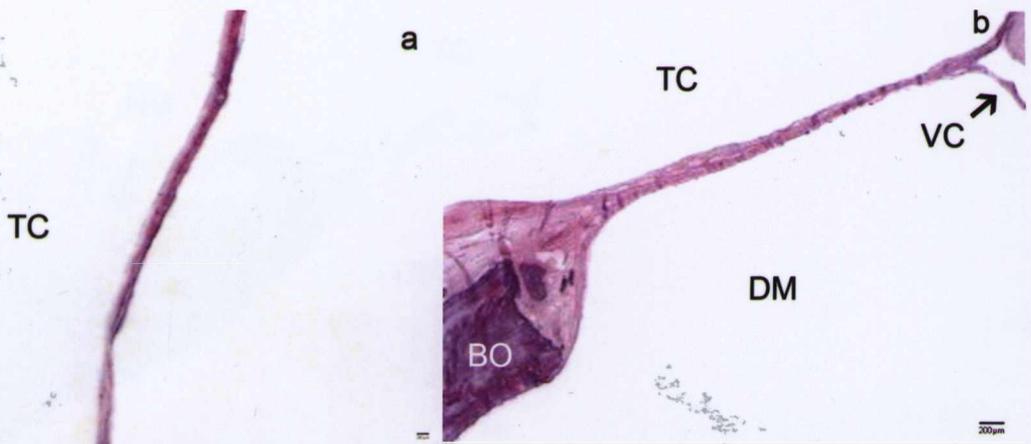


Figura 24. GI 15D HE. Área central do defeito, preenchida por tecido conjuntivo fibroso. **Legenda:** Tecido Conjuntivo (TC); Dura-máter (DM); Borda Óssea (BO); Veia central (VC).

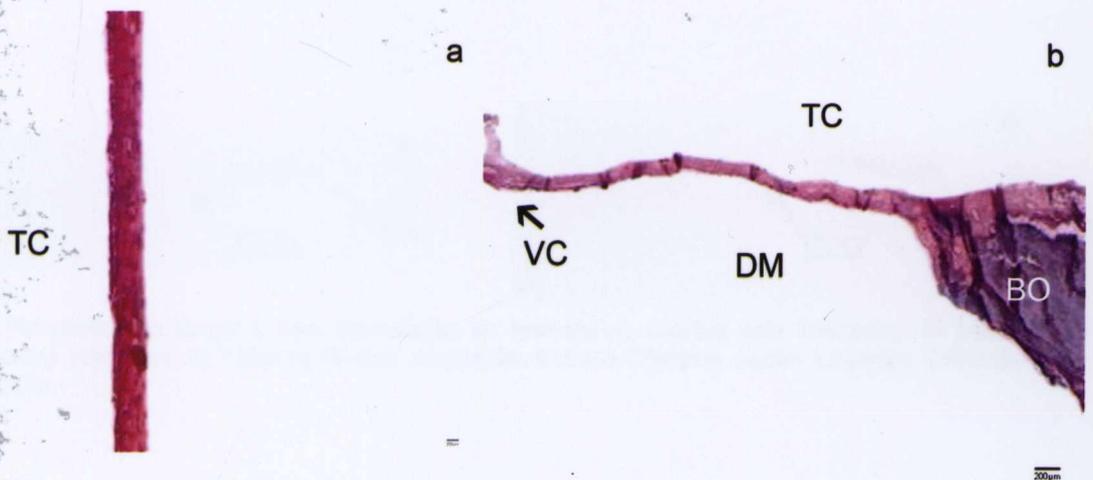


Figura 25. GI 45D HE. Aspecto da área central e da borda do defeito. Tecido fibroso com redução linear da espessura. **Legenda:** Tecido Conjuntivo (TC); Dura-máter (DM); Borda Óssea (BO); Veia central (VC).

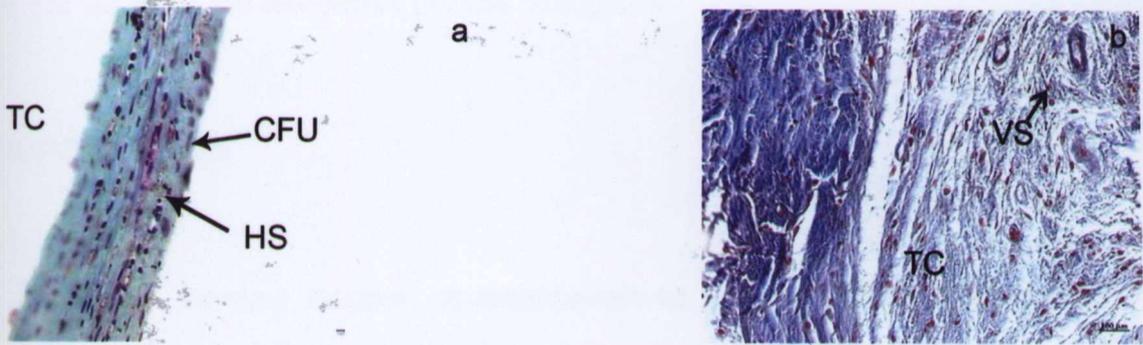


Figura 26. GI 45D. a) **GOLDNER** – Área central do defeito. Presença de células fusiformes e hemossiderina; b) **MASSON** – Área Central do defeito. Tecido conjuntivo frouxo, vasos sanguíneos e células fusiformes. **Legenda:** Tecido conjuntivo (TC); Célula fusiforme (CFU); Hemossiderina (HS); Vaso sanguíneo (VS).

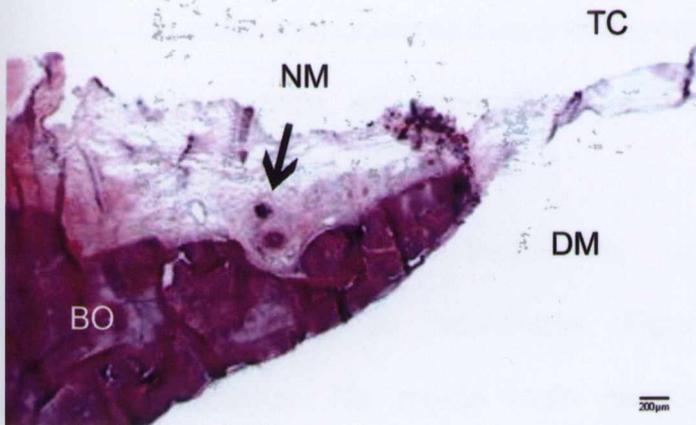


Figura 27. GI 120D HE. Borda óssea com proliferação óssea reparativa estável. **Legenda:** Tecido conjuntivo (TC); Dura-máter (DM); Borda óssea (BO); Núcleo de mineralização (NM).



Figura 28. Fotografias do Grupo I, sem implantação de biomaterial, coradas pelo Tricrômico de Masson, em diferentes pontos biológicos: a) 7 dias b) 45 dias. Ampliação: 8x. Lupa *Olympus*, Japão. **Legenda:** Extensão linear do defeito (ELD).

6. 2.1.2 Grupo II em diferentes pontos biológicos

GRUPO II - 7 dias

As bordas ósseas apresentavam-se com discreta proliferação reativa. A quitosana 4% implantada ocupou quase toda a extensão do defeito, circundada por tecido de granulação, constituído de edema, proliferação vascular e denso infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear (Figuras 29 a, b).

Os polimorfonucleares foram vistos em grande quantidade no interior do material implantado, em especial, na região voltada para o retalho, com migração centrípeta (Figura 29 b).

Observou-se com freqüência, uma reação gigante-celular, acentuada na periferia do biomaterial (Figura 30 b), acompanhada de proliferação vascular. Na região mais central do biomaterial, apesar da ausência de capilares, notou-se presença de exsudato e acentuada hemorragia (Figura 33 b).

Concomitante à proliferação vascular, existiu deposição de matriz colagênica, mais densa na periferia do material, e quase ausente no centro dele, acompanhada de proliferação fibroblástica (Figura 34 b).

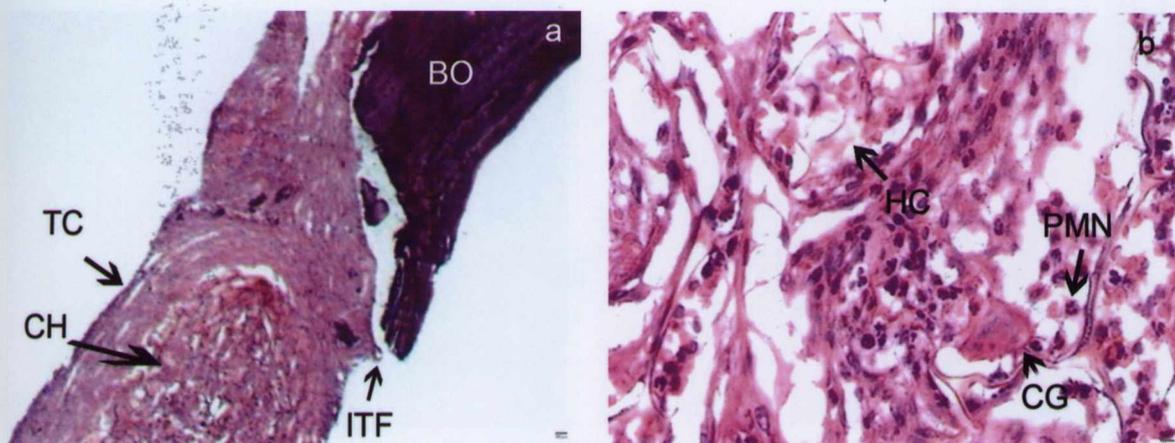


Figura 29. GII 7D HE. a) Região próxima à borda óssea, com deposição de tecido conjuntivo na interface borda-quitosana 4%; b) Reação inflamatória com mononucleares e polimorfonucleares, associada ao biomaterial. **Legenda:** Tecido conjuntivo (TC); Quitosana (CH); Interface (ITF); Borda óssea (BO); Hemácia (HG); Polimorfonuclear (PMN); Célula gigante (CG).

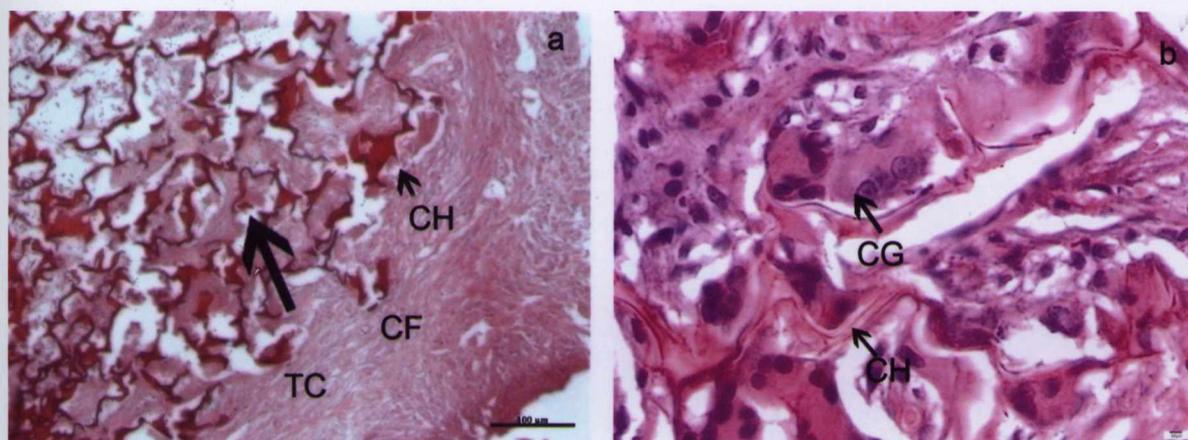


Figura 30. GII 7D HE. a) - Presença de cápsula fibrosa delimitando o biomaterial. Deposição de matriz de permeio à quitosana 4%; b) Células gigantes de permeio ao biomaterial. **Legenda:** Tecido conjuntivo (TC); Quitosana (CH); Cápsula Fibrosa (CF); Célula Gigante (CG).

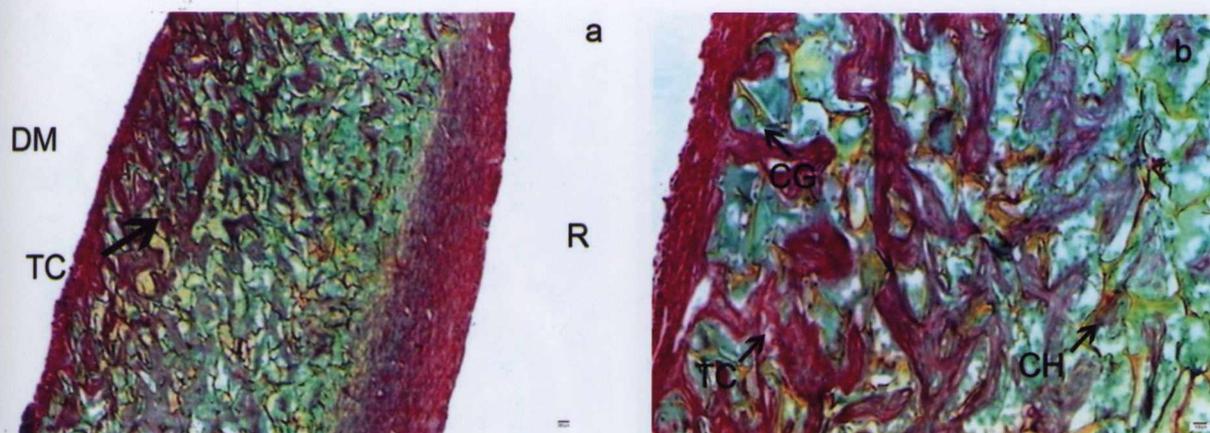


Figura 31. GII 7D. a) PIFIG - Reação inflamatória e tecido conjuntivo com migração centrípeta em resposta ao biomaterial; b) Ampliação da figura anterior. Destaque para a deposição centrípeta de tecido conjuntivo fibroso. **Legenda:** Retalho (R); Dura-máter (DM); Quitosana (CH); Cápsula Fibrosa (CF); Célula Gigante (CG).

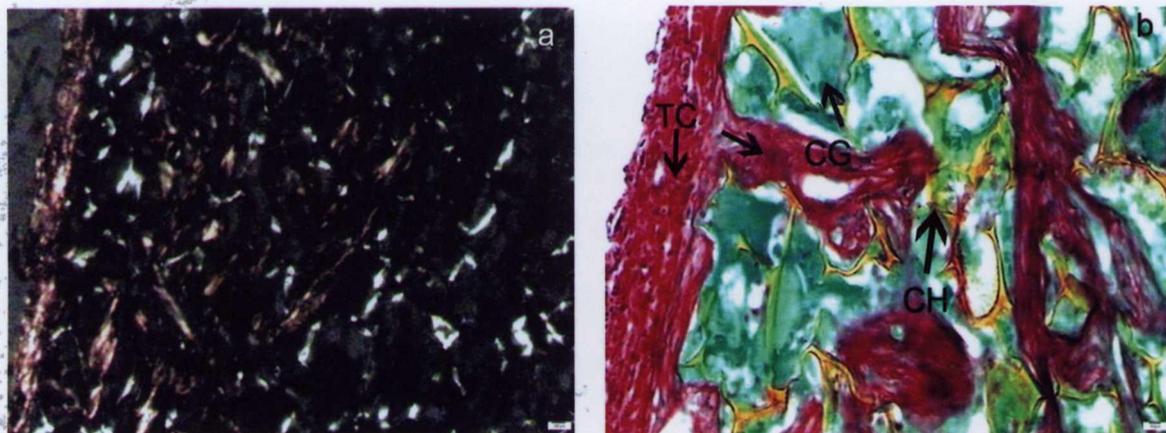


Figura 32. GII 7D. a) PIFG Luz Polarizada. Detalhe da figura anterior, em que a quitosana 4% aparece em branco e o colágeno em rosa, sob luz polarizada; b) PIFG – Ampliação da figura anterior. Fibras colagênicas de permeio à quitosana. Presença de reação granulomatosa. **Legenda:** Tecido conjuntivo (TC); Quitosana (CH); Célula gigante (CG).

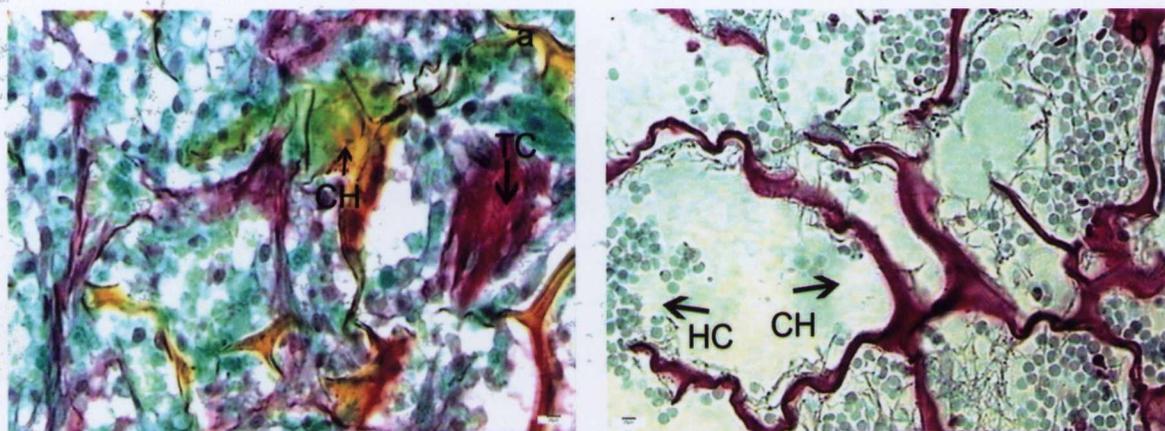


Figura 33. GII 7D. a) PIFG - Fragmentos da quitosana 4%. Presença de células mononucleares e deposição de fibras colagênicas; b) GOLDNER – Áreas de hemorragia de permeio à quitosana 4%. **Legenda:** Tecido conjuntivo (TC); Quitosana (CH); Célula gigante (CG); Hemácia (HC).

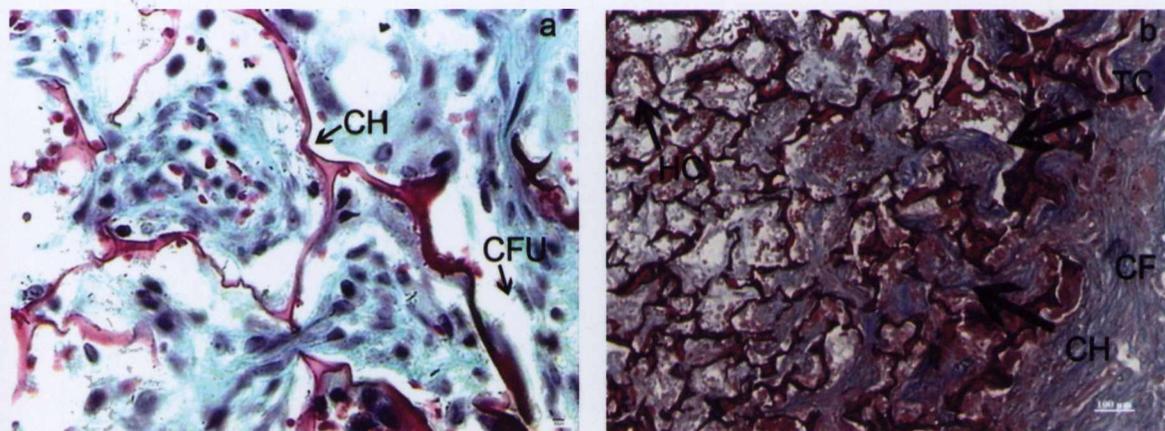


Figura 34. GII 7D. a) GOLDNER – Quitosana 4% associada a deposição de tecido conjuntivo, presença de células inflamatórias e fibroblástóides; b) MASSON – Deposição de fibras colágenas de permeio ao biomaterial, direção centripeta. **Legenda:** Tecido conjuntivo (TC); Quitosana (CH); Cápsula fibrosa (CF); Célula fusiforme (CF).

GRUPO II - 15 dias

Observou-se proliferação óssea reparativa muito discreta nas bordas ósseas do defeito. A quitosana 4%, implantada no defeito, induziu resposta granulomatosa que não se restringiu mais à periferia, mas também começou a ser vista na área central do biomaterial (Figuras 35 e 36 a). Também, notou-se presença de matriz colagênica permeando toda a extensão do biomaterial (Figura 35).

A proliferação vascular acompanhou a reação granulomatosa, a migração de fibroblastos e a deposição de matriz colagênica, de forma centrípeta (Figura 36 b).

Ausência de áreas de mineralização no sítio de implantação do biomaterial.

Figura 35. GII 15D. a) HE - Deposição de tecido conjuntivo fibroso de permeio à quitosana 4%; b) GOLDNER - Deposição de fibras colágenas em direção centrípeta associada à presença de osteócitos. Legenda: Tecido Conjuntivo (TC); Célula-gigante (CG); Cápsula fibrosa (CF).

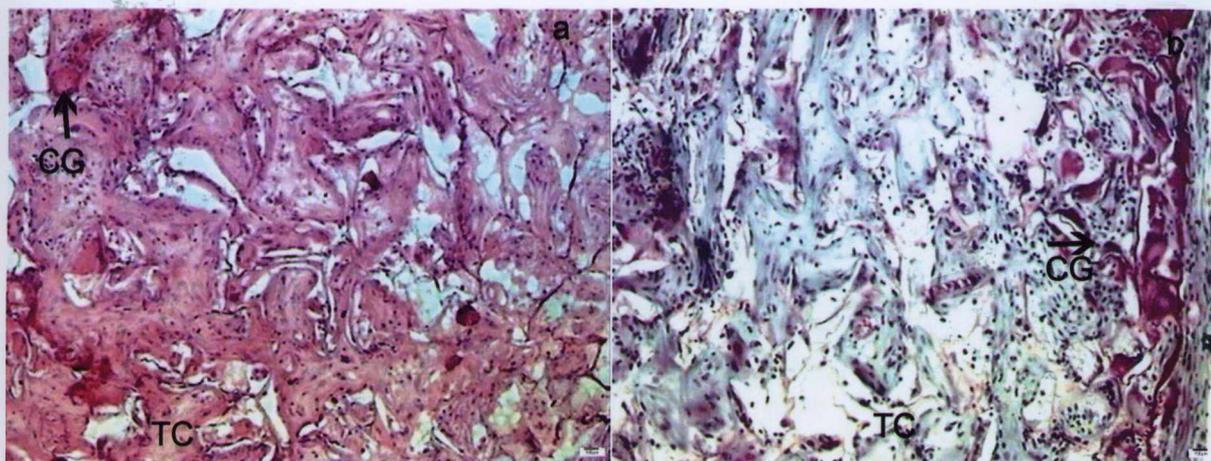


Figura 35. GII 15D. a) HE – Deposição de tecido conjuntivo fibroso de permeio à quitosana 4%; b) GOLDNER - Presença de tecido conjuntivo fibroso e reação granulomatosa na periferia, células fusiformes e capilares sanguíneos em resposta ao biomaterial. **Legenda:** Tecido Conjuntivo (TC); Célula-gigante (CG).

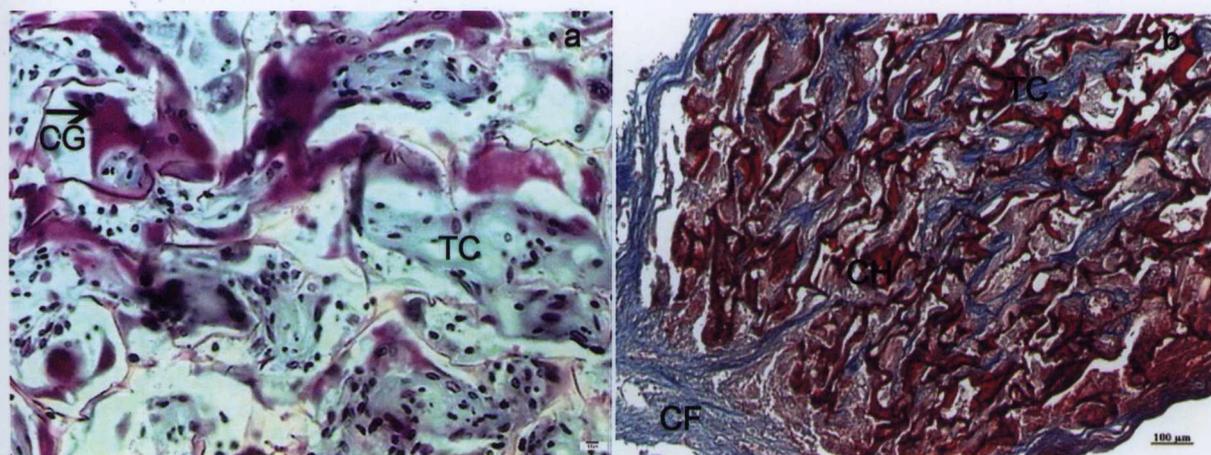


Figura 36. GII 15D. a) GOLDNER – Ampliação da figura anterior; posição de tecido conjuntivo fibroso de permeio à quitosana 4%; b) MASSON – Deposição de fibras colágenas em direção centrípeta associada à presença do biomaterial. **Legenda:** Tecido Conjuntivo (TC); Célula-gigante (CG); Cápsula fibrosa (CF).

GRUPO II – 45 dias

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

Foi observada também uma reação granulomatosa mais acentuada, vista em toda extensão da quitosana 4%, a qual se apresenta mais fragmentada do que nos pontos biológicos anteriores (Figuras 37, 38 b e 39).

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

Notou-se presença de matriz colagênica de permeio a região central do biomaterial (Figura 37).. Também, vasos (Figura 38 a) e células fusiformes.



Figura 38. GI 45D GOLDNER. a) Vasos sanguíneos, células fusiformes, células gigantes e tecido conjuntivo fibroso de permeio à quitosana 4% em fragmentação; b) Células gigantes e mononucleares associadas à quitosana, presença de células fusiformes e vasos sanguíneos. Legenda: Tecido conjuntivo (TC); Célula gigante (CG); Célula fusiforme (GPU); Vaso sanguíneo (VS); Quitosana (CH).

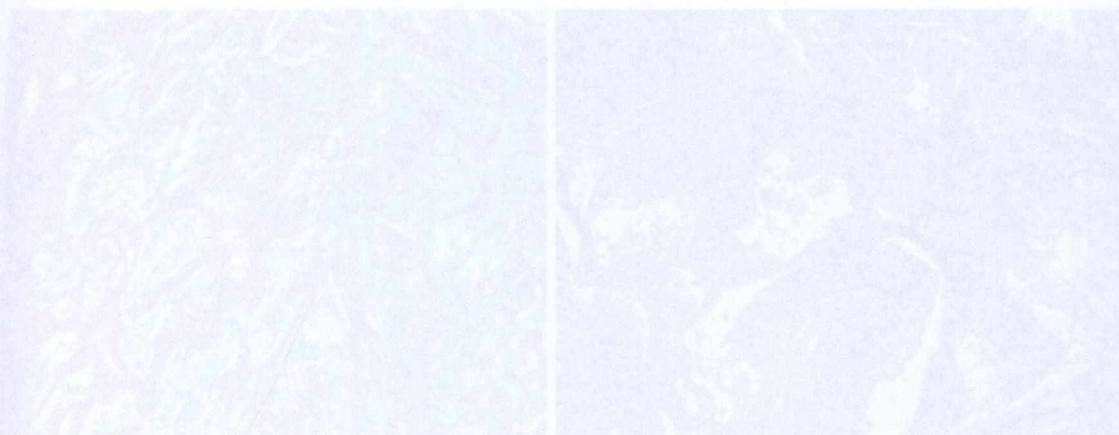


Figura 39. GI 45D. a) PIFIG – Migração centrípeta de tecido conjuntivo associado à quitosana 4%; ausência de migração de células gigantes. Biomaterial em fragmentação; b) MASSON – Área central do defeito. Presença de células gigantes e fibras colágenas. Legenda: Tecido conjuntivo (TC); Célula gigante (CG); Quitosana (CH); Capsula fibrosa (CF).

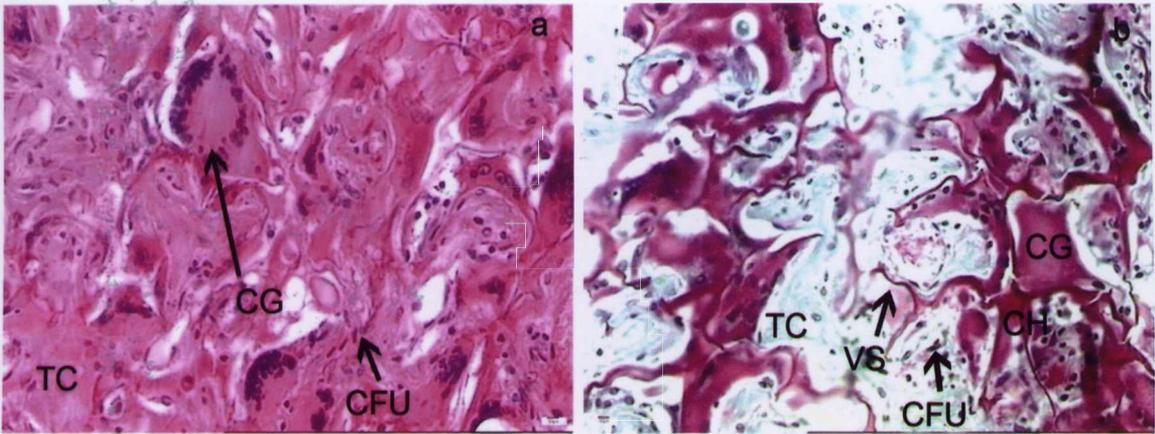


Figura 37. GII 45D. a) HE – Tecido conjuntivo fibroso de permeio ao biomaterial e células gigantes circundando os fragmentos da quitosana 4%; b) GOLDNER – Biomaterial fragmentado, reação granulomatosa e deposição de tecido conjuntivo. Presença de vasos sanguíneos. **Legenda:** Tecido conjuntivo (TC); Célula gigante (CG); Célula fusiforme (CFU); Vaso sanguíneo (VS); Quitosana (CH).

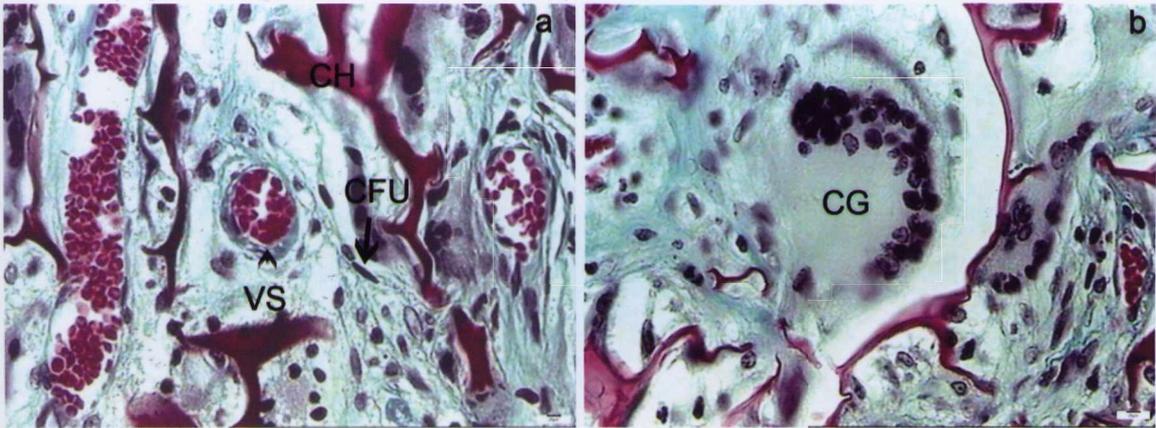


Figura 38. GII 45D GOLDNER. a) Vasos sanguíneos, células fusiformes, células gigantes e tecido conjuntivo fibroso de permeio à quitosana 4% em fragmentação; b) Células gigantes e mononucleares associadas à quitosana, presença de células fusiformes e vasos sanguíneos. **Legenda:** Tecido conjuntivo (TC); Célula gigante (CG); Célula fusiforme (CFU); Vaso sanguíneo (VS); Quitosana (CH).

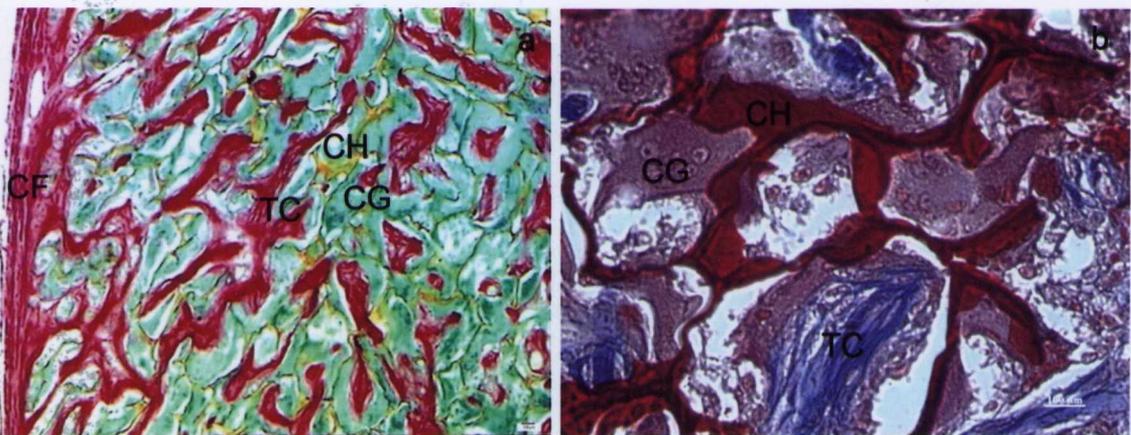


Figura 39. GII 45D. a) PIFIG – Migração centripeta de tecido conjuntivo associado à quitosana 4%; evidência de migração de células gigantes. Biomaterial em fragmentação; b) MASSON – Área central do defeito. Presença de células gigantes e fibras colágenas. **Legenda:** Tecido conjuntivo (TC); Célula gigante (CG); Quitosana (CH); Cápsula fibrosa (CF).

GRUPO II - 120 dias

As bordas ósseas apresentaram-se sem proliferação óssea reparativa. Presença de reação granulomatosa acentuada (Figuras 40, 41, 42). A quitosana 4% se apresentou bastante fragmentada, com presença de fibroblastos e deposição de tecido conjuntivo fibroso mais denso (Figuras 40 a, b).

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

Enfatiza-se a ausência de áreas de mineralização em toda a extensão do biomaterial, como também, de cápsula fibrosa, delimitando-o (Figura 42).

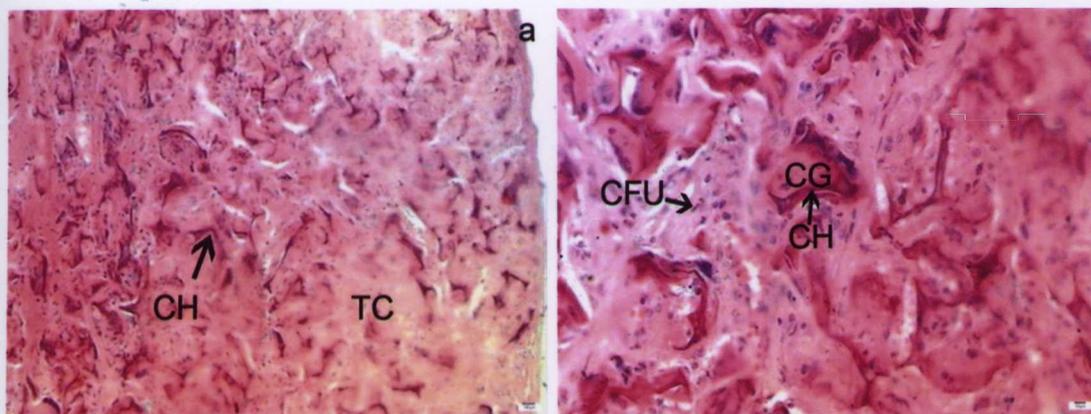


Figura 40. GII 120D HE. a) Extensa fragmentação da quitosana 4%, com grande deposição de tecido conjuntivo de permeio; b) Fragmentação da quitosana 4% com presença de células gigantes. **Legenda:** Tecido Conjuntivo (TC); Quitosana (CH); Célula gigante (CG); Célula fusiforme (CFU).

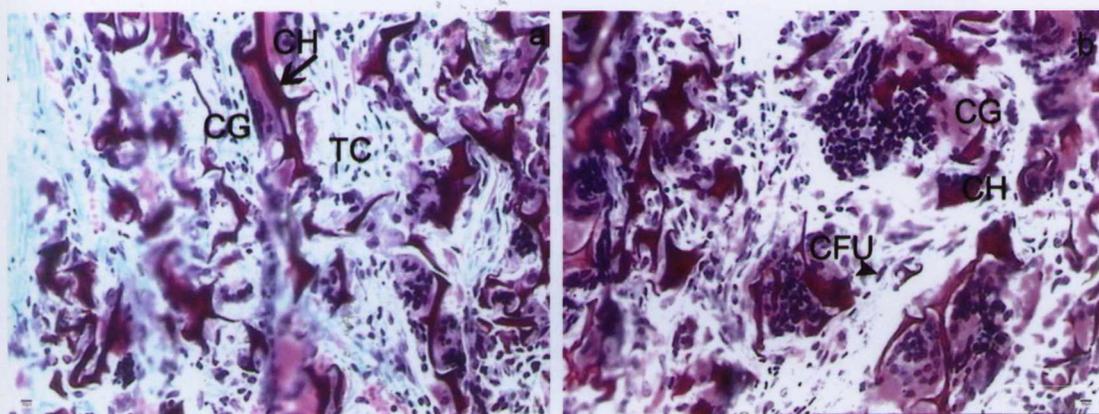


Figura 41. GII 120D GOLDNER. a e b) Quitosana 4% bem fragmentada, com deposição de tecido conjuntivo fibroso, e reação granulomatosa associada. **Legenda:** Tecido Conjuntivo (TC); Quitosana (CH); Célula gigante (CG); Célula fusiforme (CFU).

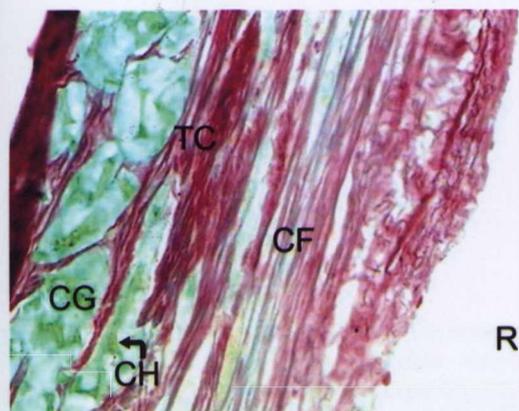
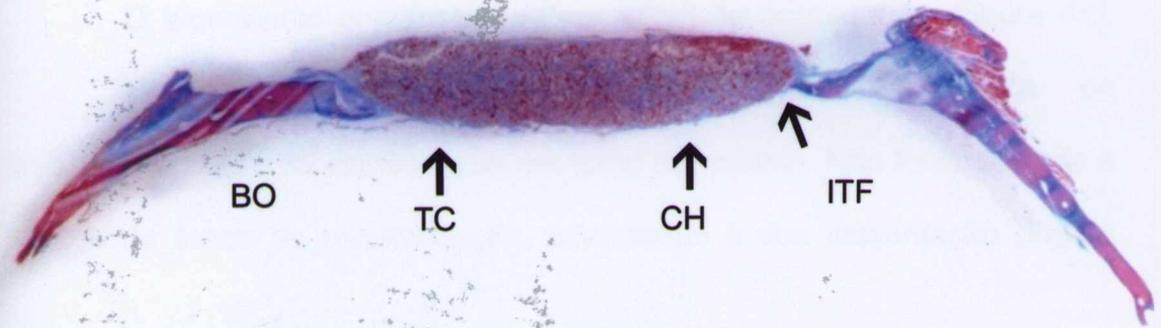


Figura 42. GII 120D PIFG. Deposição de tecido conjuntivo fibroso de forma a delimitar a quitosana 4%. **Legenda:** Tecido Conjuntivo (TC); Quitosana (CH); Célula gigante (CG); Cápsula fibrosa (CF); Retalho (R).

a



b



c

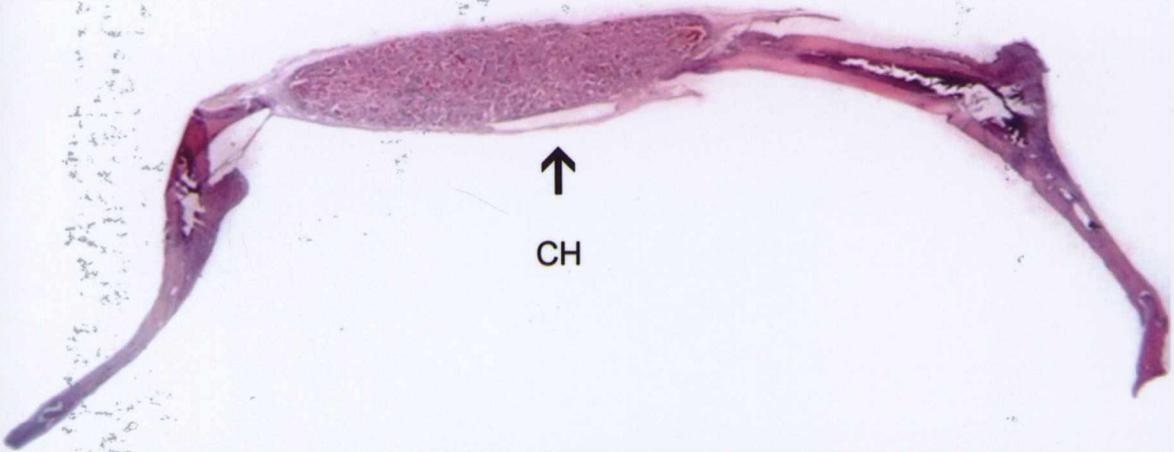


Figura 43. - GH 120: Fotografias do Grupo II, coradas em HE (c) e pelo Tricrômico de Masson, em diferentes pontos biológicos: a) 7 dias b) 15 dias c) 45 dias. Ampliação: 8x, exceto a ilustração (b): 6,3X. Lupa *Olympus*, Japão.
Legenda: Borda óssea (BO); Tecido conjuntivo (TC); Quitosana (CH); Interface (ITF).

6.2.1.3 Grupo III em diferentes pontos biológicos

GRUPO III - 7 dias

Observou-se uma proliferação óssea reativa discreta nas bordas ósseas do defeito. Notou-se a presença de tecido conjuntivo frouxo, com proliferação de células fusiformes, e proliferação vascular na interface entre quitosana 15% e bordas ósseas. Também, áreas de hemorragia (Figura 46).

O biomaterial apresentou-se em início de degradação (Figura 44).

Houve acentuada reação inflamatória com presença de polimorfonucleares e mononucleares em torno do mesmo. Não foi observada a presença de áreas de mineralização, associadas à sua implantação (Figura 45).

Figura 44. GIB TD GOLDNER. Intensa reação inflamatória associada à quitosana 15%. Legenda: Retalho (R); Dura-máter (DM); Vaso sanguíneo (VS); Quitosana (CH).



Figura 45. GIB TD MASSON. Presença de células inflamatórias e hemorragia de periósteo ao biomaterial. Legenda: Quitosana (CH); Hemácias (HC).

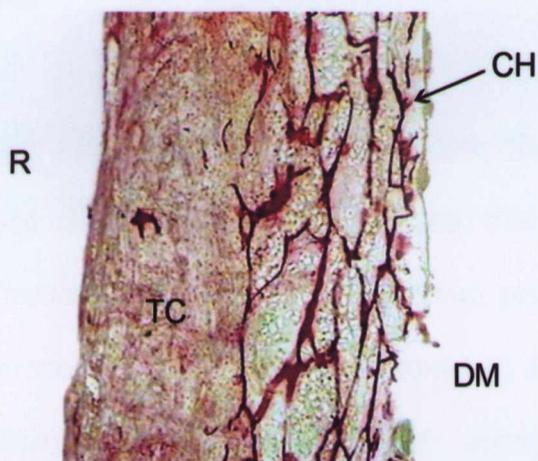


Figura 44. GIII 7D. PIFIG. Matriz 3D de quitosana 15% em início de degradação. **Legenda:** Retalho (R); Dura-máter (DM); Tecido conjuntivo (TC); Quitosana (CH).

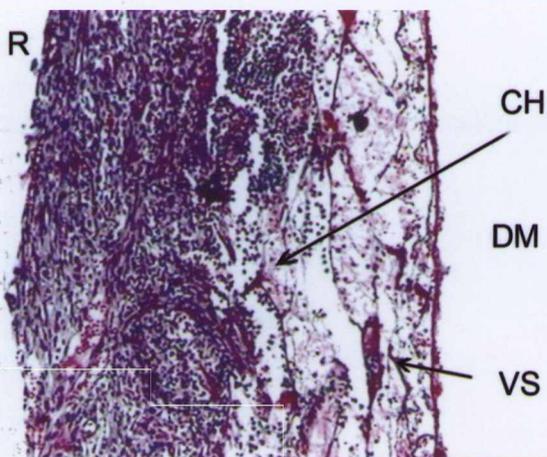


Figura 45. GIII 7D GOLDNER. Intensa reação inflamatória associada à quitosana 15%. **Legenda:** Retalho (R); Dura-máter (DM); Vaso sanguíneo (VS); Quitosana (CH).

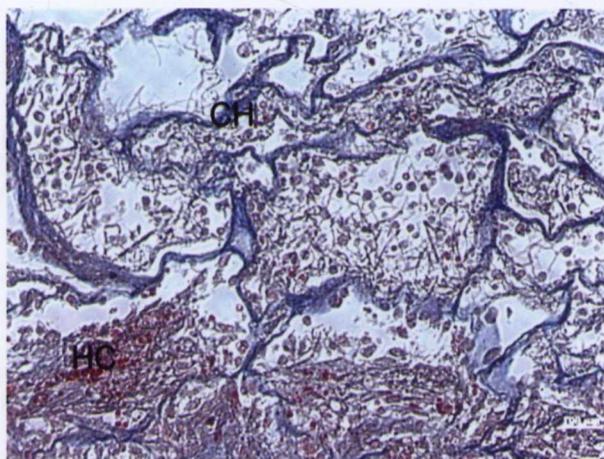


Figura 46. GIII 7D MASSON. Presença de células inflamatórias e hemorragia de permeio ao biomaterial. **Legenda:** Quitosana (CH); Hemácias (HC).

GRUPO III- 15 DIAS

As bordas ósseas apresentavam-se com discreta proliferação óssea reativa. Na interface quitosana 15%-borda óssea, observou-se a presença de tecido conjuntivo frouxo, com presença de edema, proliferação de capilares e moderado infiltrado mononuclear difuso (Figura 49 b). Em adição, foi percebida a proliferação fibroblástica. O biomaterial apresentou-se parcialmente fragmentado, circundado e permeado por reação granulomatosa (Figura 49 a). Além disso, marcante infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear de permeio (Figuras 47 e 48).

Não foram visualizadas áreas de mineralização.

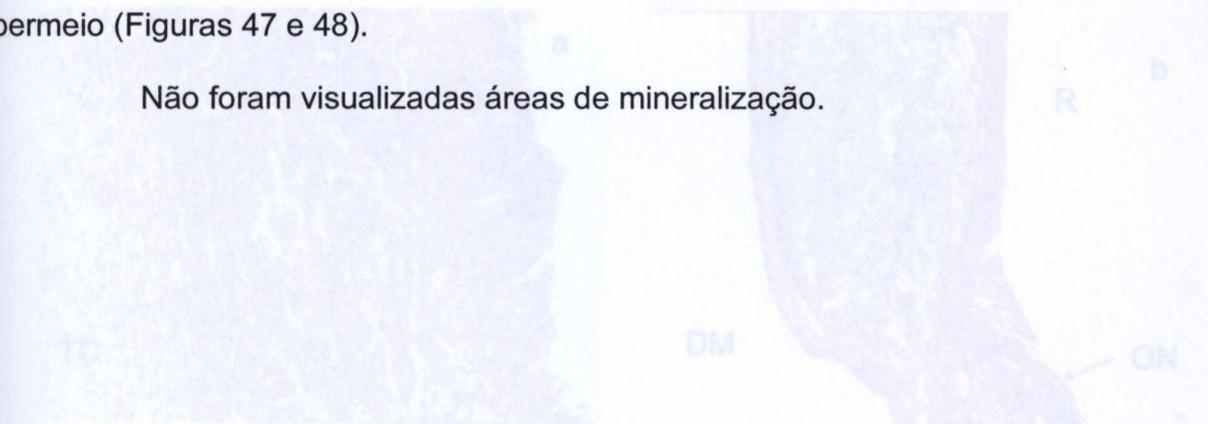


Figura 49. GHI 15D. a) HE - GHI 15D HE. Quitosana 15% em fragmentação progressiva, com infiltrado inflamatório por polimorfonucleares e mononucleares e reação granulomatosa; b) PIFIG - Tecido conjuntivo frouxo encapsulando a quitosana 15%. Legenda: Tecido conjuntivo (TC); Borda óssea (BO); Quitosana (CH); Cápsula fibrosa (CF); Relação (R); Dura-máter (DM); Osso novo (ON).



Figura 48. GHI 15D. a) PIFIG - Detalhe de figura anterior, com biomaterial bastante fragmentado, circundado na periferia por tecido conjuntivo fibroso e rara matriz colágena em direção ao centro do defeito; b) MASSON - Tecido conjuntivo frouxo encapsulando a quitosana 15%. Legenda: Tecido conjuntivo (TC); Quitosana (CH); Cápsula fibrosa (CF); Célula gigante (CG); Vaso sanguíneo (VS).

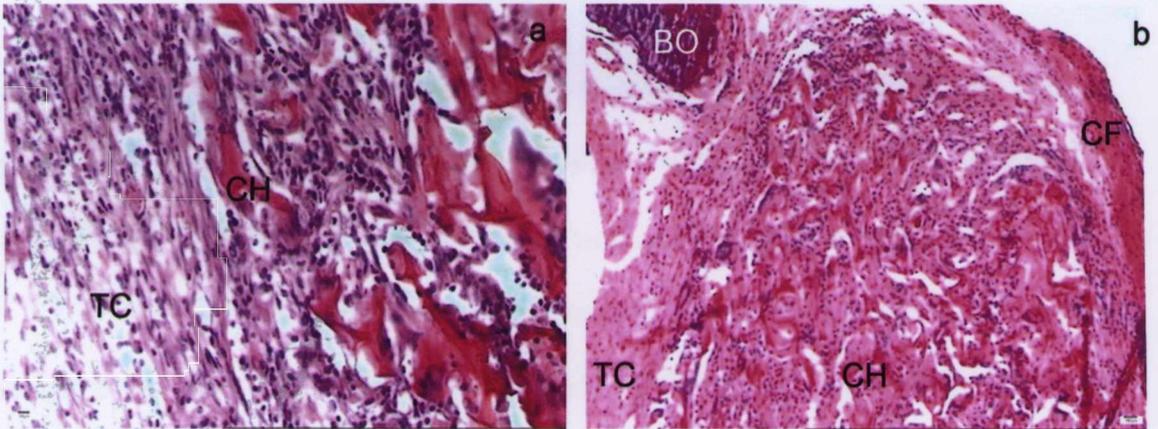


Figura 47. GIII 15D HE. a) Presença de tecido conjuntivo frouxo e vasos sangüíneos associados à superfície da quitosana 15%. Intensa atividade macrófagica ao redor do biomaterial; b) Presença de tecido conjuntivo na interface borda óssea reparativa e biomaterial. **Legenda:** Tecido conjuntivo (TC); Borda óssea (BO); Quitosana (CH); Cápsula fibrosa (CF).

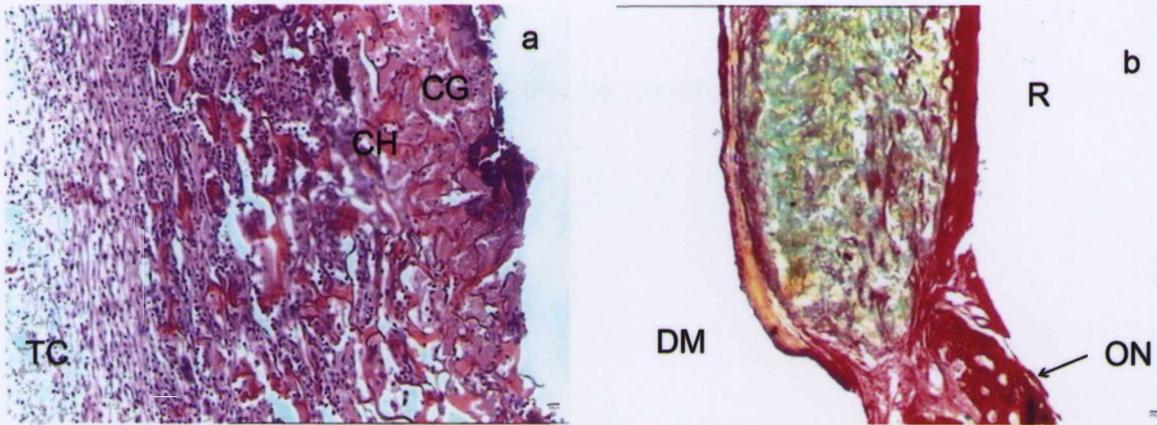


Figura 48. GIII 15D. a) HE - GIII 15D HE. Quitosana 15% em fragmentação progressiva, com infiltrado inflamatório por polimorfonucleares e mononucleares e reação granulomatosa; b) PIFIG - Tecido conjuntivo fibroso encapsulando a quitosana 15%. **Legenda:** Tecido conjuntivo (TC); Borda óssea (BO); Quitosana (CH); Cápsula fibrosa (CF); Retalho (R); Dura-máter (DM); Osso novo (ON).

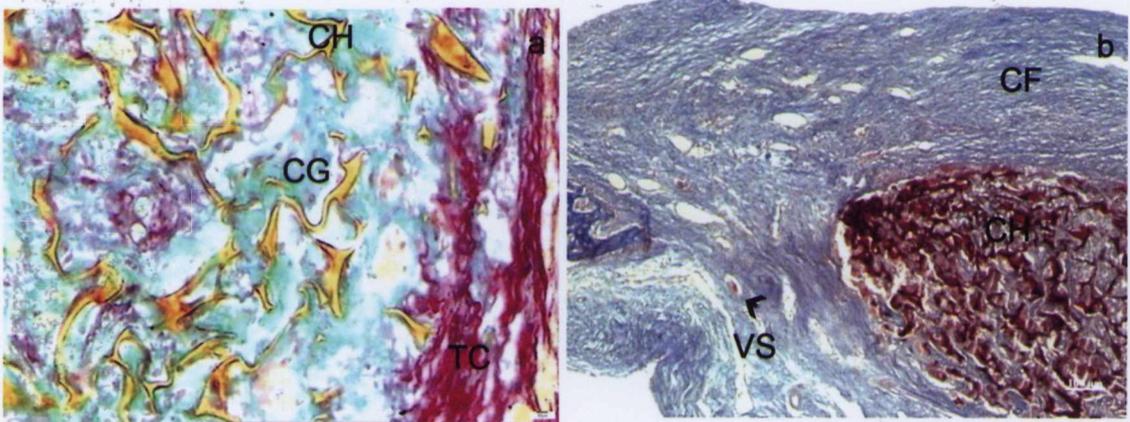


Figura 49. GIII 15D. a) PIFIG - Detalhe da figura anterior, com biomaterial bastante fragmentado, circundado na periferia por tecido conjuntivo fibroso e rara matriz colagênica em direção ao centro do defeito; b) MASSON - Tecido conjuntivo fibroso encapsulando a quitosana 15%. **Legenda:** Tecido conjuntivo (TC); Quitosana (CH); Cápsula fibrosa (CF); Célula gigante (CG); Vaso sangüíneo (VS).

GRUPO III - 45 dias

O biomaterial apresentou-se fragmentado, circundado por fibrose, com raras fibras colágenas de permeio ao biomaterial (Figura 50). A espessura e a extensão do biomaterial apresentaram-se com dimensões reduzidas.

As bordas ósseas apresentavam-se com neoformação óssea estabilizadas, com conformação arredondada. Notou-se a presença de tecido conjuntivo fibroso e espessado entre as bordas do defeito ósseo e o biomaterial (Figura 52). Também, células fusiformes e células gigantes de permeio ao biomaterial (Figura 51).

Observou-se ausência de áreas de mineralização.

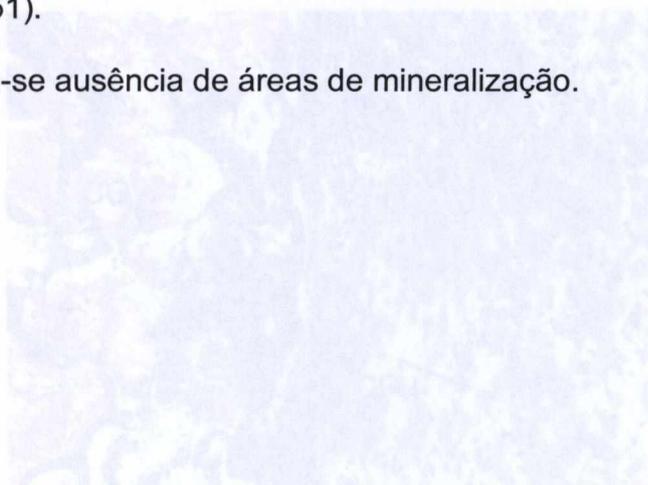


Figura 51. GIII 45D GOLDNER. Fragmentos da quitosana 15% com células inflamatórias de permeio, circundados na sua periferia, por tecido conjuntivo fibroso. Legenda: Tecido conjuntivo (TC); Quitosana (CH); Célula gigante (CG); Célula fusiforme (CFU).

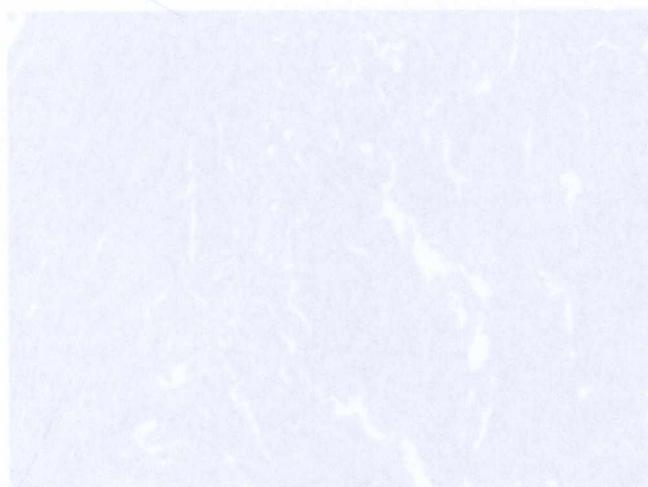


Figura 52. GIII 45D MASSON. Área central do defeito. Cápsula fibrosa definindo o biomaterial. Raras fibras colágenas de permeio à quitosana 15%. Legenda: Cápsula fibrosa (CF); Quitosana (CH).

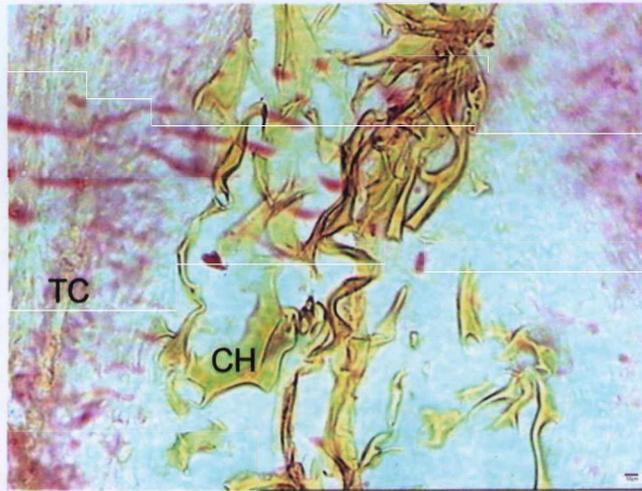


Figura 50. GIII 45D PIFIG. Fragmentação do biomaterial com raras fibras colágenas de permeio. **Legenda:** Tecido conjuntivo (TC); Quitosana (CH).

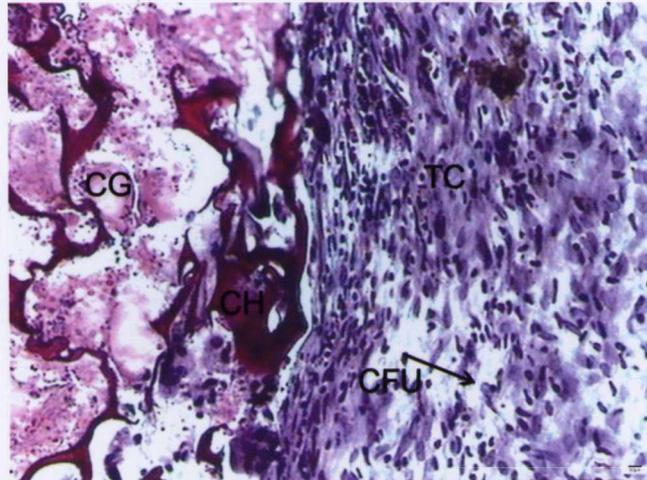


Figura 51. GIII 45D GOLDNER. Fragmentos da quitosana 15% com células inflamatórias de permeio, circundados, na sua periferia, por tecido conjuntivo fibroso. **Legenda:** Tecido conjuntivo (TC); Quitosana (CH); Célula gigante (CG); Célula fusiforme (CFU).

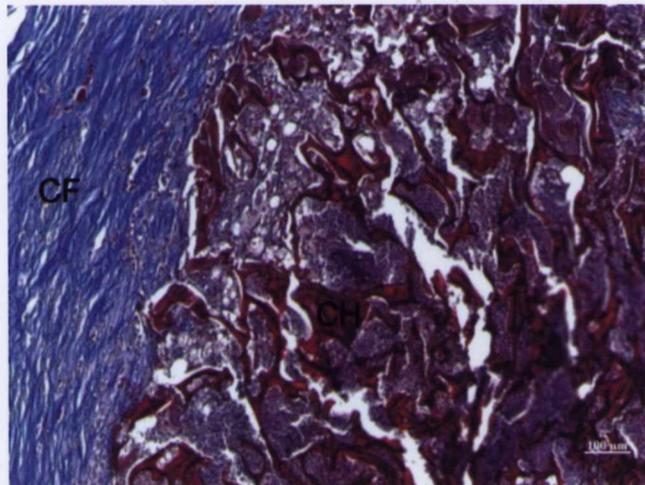


Figura 52. GIII 45D MASSON. Área central do defeito. Cápsula fibrosa delimitando o biomaterial. Raras fibras colágenas de permeio à quitosana 15%. **Legenda:** Cápsula fibrosa (CF); Quitosana (CH).

GRUPO III - 120 DIAS

As bordas ósseas apresentaram-se sem proliferação óssea, com aspecto similar visto aos 45 dias. Foi observada a presença de tecido conjuntivo formado entre a quitosana 15% e as bordas do defeito, com discreto infiltrado mononuclear, sem proliferação de capilares (Figura 53 a). Fragmentos do biomaterial foram observados esparsamente em meio ao tecido fibroso denso que os circunscreveu (Figuras 53 b, 54, 55). Foi notada, ainda, reação granulomatosa moderada, com acúmulos focais de mononucleares (Figura 54 b). Não foram observadas áreas de mineralização.

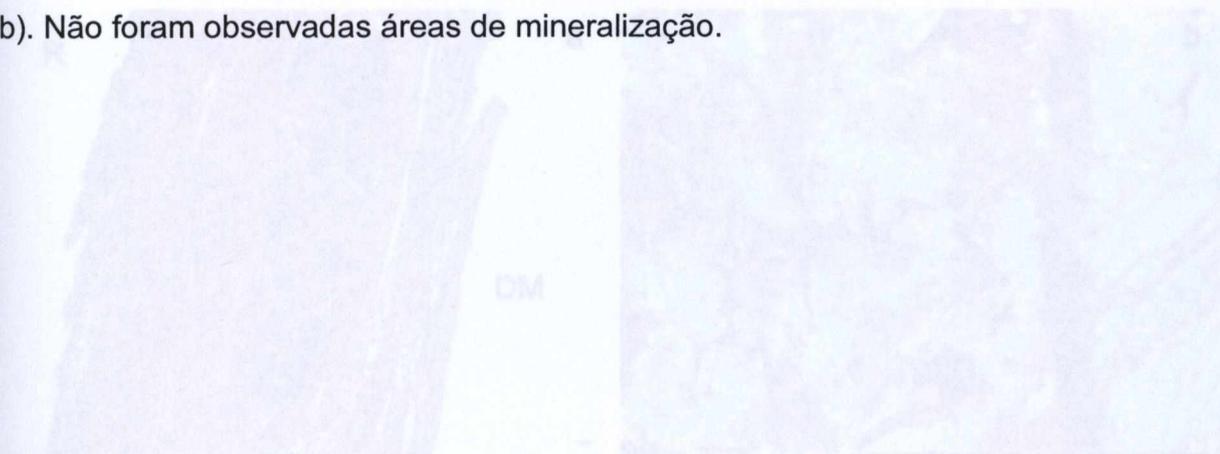


Figura 54. GIII 120D NE. a) Fragmentos da quitosana 15% na região central do defeito, circundados por tecido conjuntivo fibroso; b) Reação inflamatória gigante-celular ao redor dos fragmentos da quitosana 15%. Legenda: Tecido conjuntivo (TC); Retaço (R); Dura-máter (DM); Quitosana (CH); Célula gigante (CG).

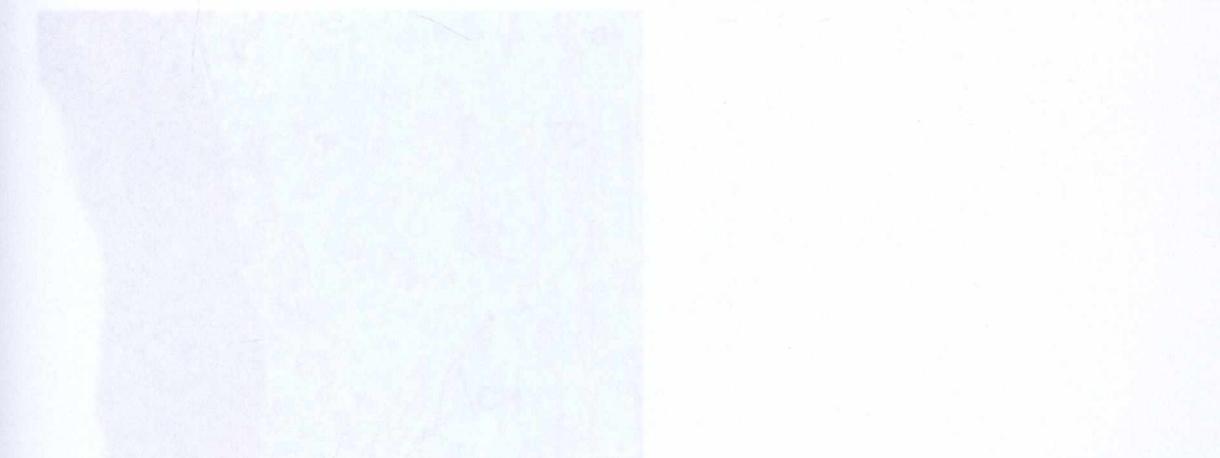


Figura 55. GIII 120D PIFG. Tecido conjuntivo fibroso denso delimitando fragmentos da quitosana 15%. Raras fibras colágenas de permeio a estes fragmentos. Legenda: Tecido conjuntivo (TC); Quitosana (CH); Cápsula fibrosa (CF).

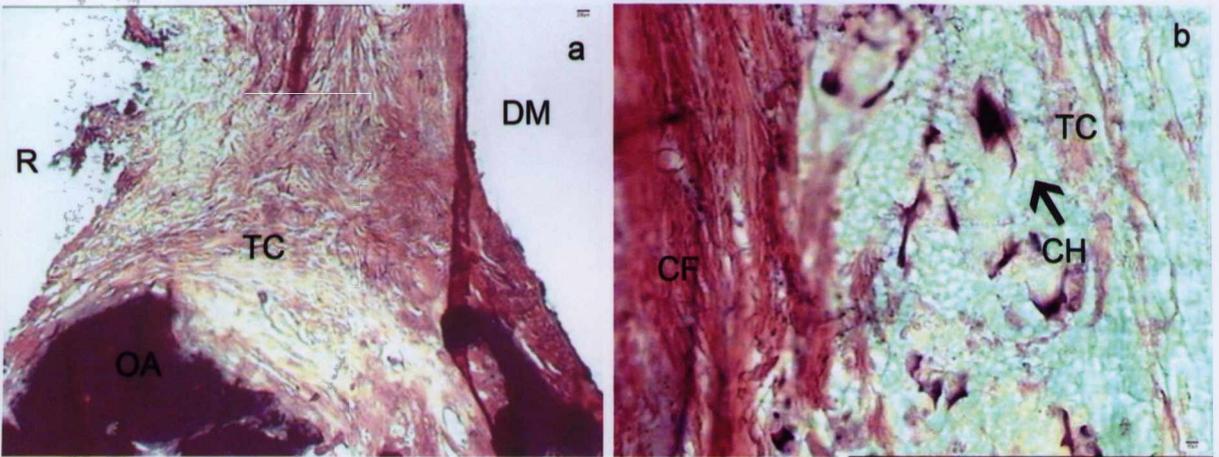


Figura 53. GIII 120D HE. a) Região de interface borda óssea-defeito, com interposição de tecido conjuntivo fibroso; b) Presença de fragmentos da quitosana 15% circundada por tecido conjuntivo fibroso. **Legenda:** Osso antigo (OA); Tecido conjuntivo (TC); Retalho (R); Dura-máter (DM); Cápsula fibrosa (CF).

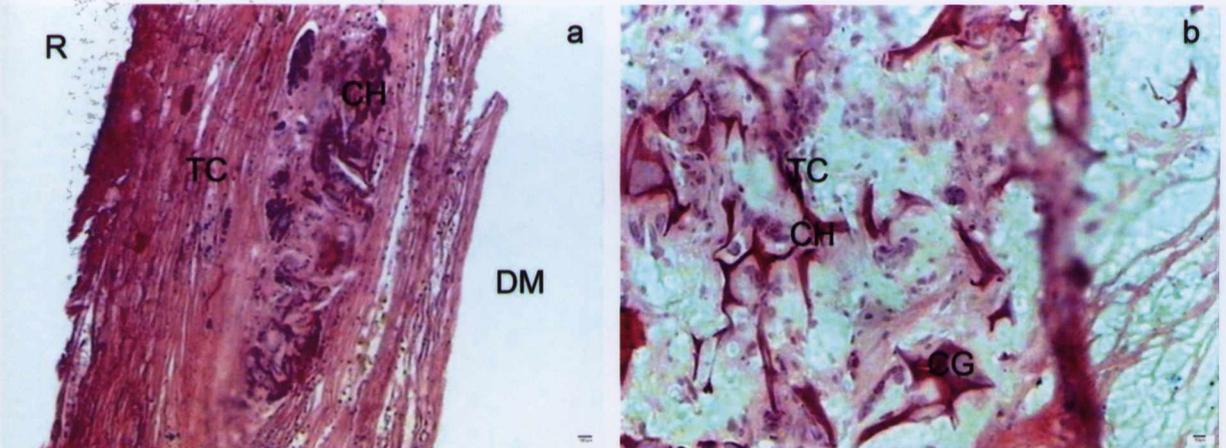


Figura 54. GIII 120D HE. a) Fragmentos da quitosana 15% na região central do defeito, circundados por tecido conjuntivo fibroso; b) Reação inflamatória gigante-celular ao redor dos fragmentos da quitosana 15%. **Legenda:** Tecido conjuntivo (TC); Retalho (R); Dura-máter (DM); Quitosana (CH); Célula gigante (CG).

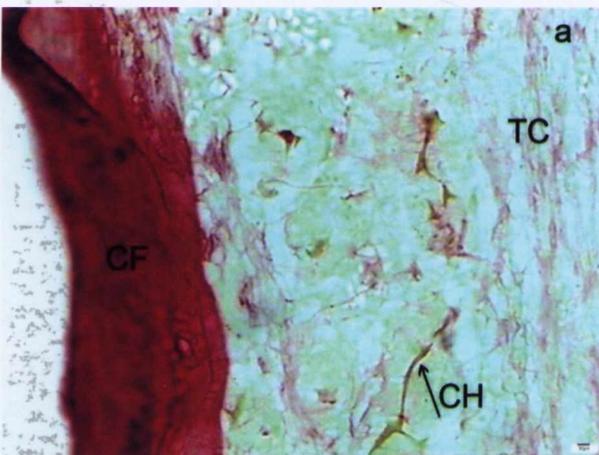


Figura 55. GIII 120D PIFG. Tecido conjuntivo fibroso denso delimitando fragmentos da quitosana 15%. Raras fibras colágenas de permeio a estes fragmentos. **Legenda:** Tecido conjuntivo (TC); Quitosana (CH); Cápsula fibrosa (CF).

6.2.1.4 Grupo IV em diferentes pontos biológicos

GIV - 7 DIAS

Bordas ósseas do defeito com neoformação óssea reparativa e com intensa proliferação vascular e infiltrado inflamatório mononuclear de incipiente. Presença de tecido conjuntivo frouxo edemaciado, permeado por

muitos mononucleares. Em adição, marcante exsudação e hemorragia, na interface matriz de colágeno tipo I e bordas ósseas. Biomaterial apresentou bordas fragmentadas. Nota-se, ainda, exacerbada reação inflamatória aguda, em torno da matriz e de permeio a esta (Figura 57).

Em quase toda a extensão e espessura do biomaterial houve reação granulomatosa, mais acentuada na periferia do biomaterial com notável presença de células gigantes, englobando-o. Percebeu-se fibrose em estágio inicial e de orientação centripeda, encapsulando a matriz de colágeno (Figura 58 b).

GRUPO IV - 15 DIAS

Bordas ósseas com neoformação reparativa e discreta presença de osteoblastos. Tecido conjuntivo frouxo entre o biomaterial e bordas ósseas, com intensa proliferação vascular e infiltrado inflamatório mononuclear de intensidade moderada e predomínio linfocitário (Figura 58).

Em quase toda a extensão e espessura do biomaterial houve reação granulomatosa, mais acentuada na periferia do biomaterial com notável presença de células gigantes, englobando-o. Percebeu-se fibrose em estágio inicial e de orientação centrípeta, encapsulando a matriz de colágeno (Figura 58 b).

GRUPO IV - 45 DIAS

Bordas ósseas estáveis. Matriz colagênica bastante fragmentada, circundada por fibrose. Presença de reação inflamatória com infiltrado mononuclear discreto e predomínio linfocitário.

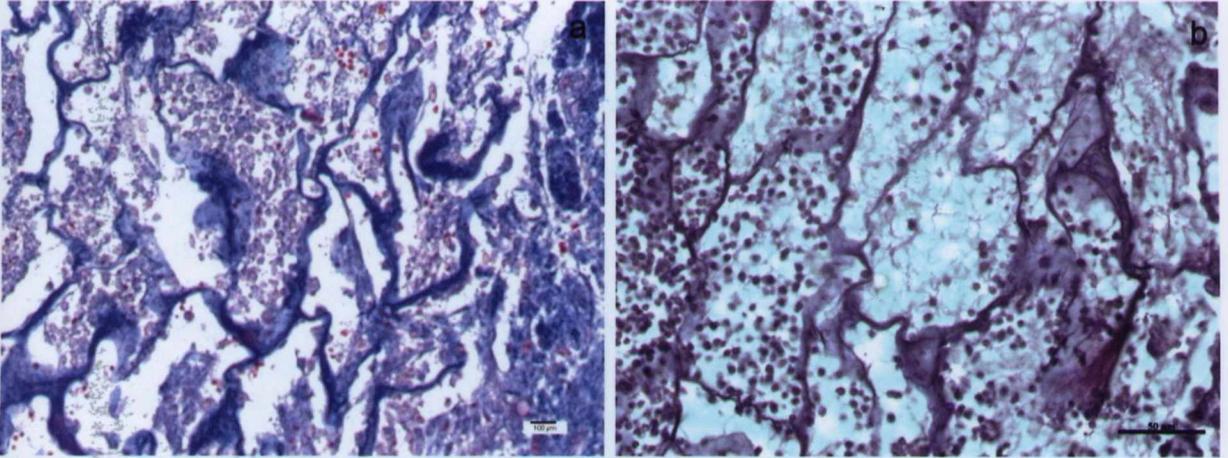


Figura 57. GIV 7D. a) MASSON – Reação inflamatória intensa associada a presença da matriz de colágeno; b) HE – Mononucleares de permeio à matriz de colágeno.

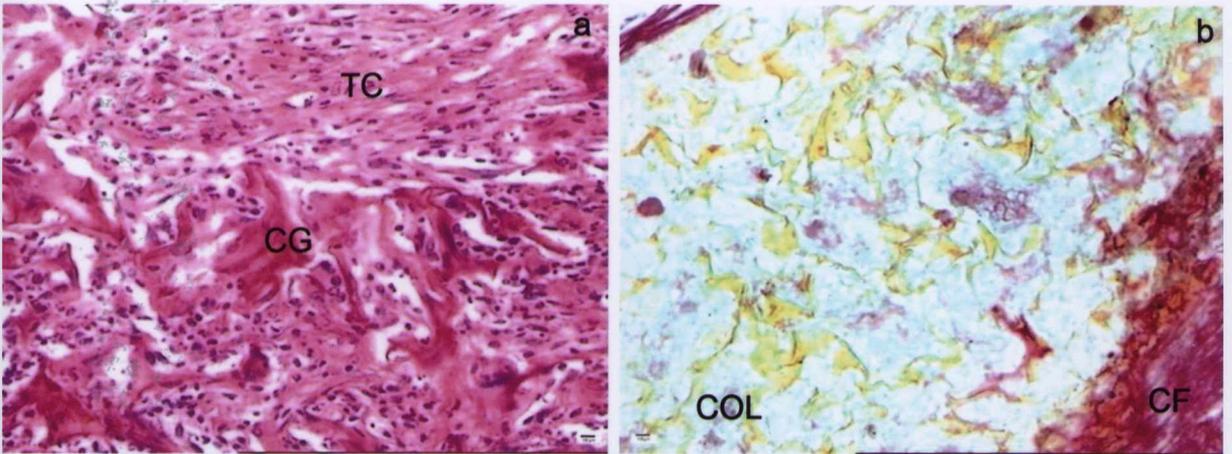


Figura 58. GIV 15D. a) HE – Presença de células gigantes de permeio ao colágeno; b) PIFIG - Fragmentação do biomaterial. **Legenda :** Matriz de colágeno (COL); Cápsula fibrosa (CF); Tecido conjuntivo (TC); Célula gigante (CG).

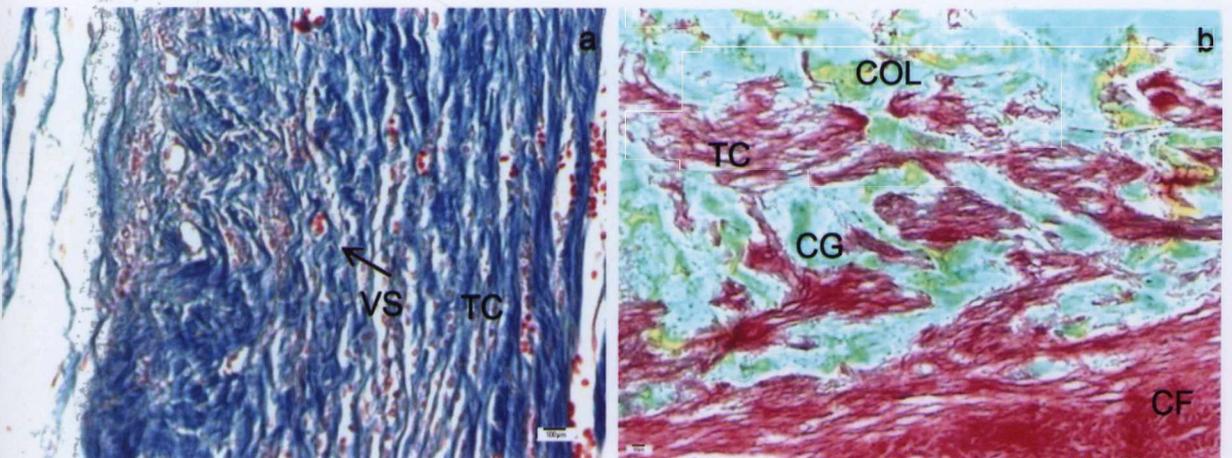


Figura 59. GIV 45D. a) MASSON – Presença de tecido conjuntivo e vasos sangüíneos; b) PIFIG - Tecido conjuntivo e células inflamatórias de permeio ao biomaterial. **Legenda :** Matriz de colágeno (COL); Cápsula fibrosa (CF); Tecido conjuntivo (TC); Célula gigante (CG).

GRUPO IV - 120 DIAS

Bordas ósseas estáveis, sem neoformação óssea. Biomaterial bastante fragmentado, circundado por fibrose, pouco espessa, com moderada quantidade de células fusiformes. Reação inflamatória branda.

Ausência de áreas de mineralização na região preenchida pelo biomaterial (Figura 60).

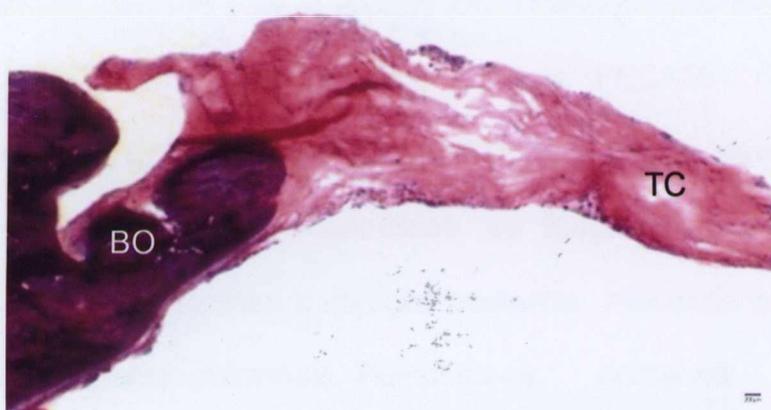


Figura 60. GIV 120D HE. Presença de tecido conjuntivo preenchendo o defeito. **Legenda:** Tecido conjuntivo (TC); Borda óssea (BO).

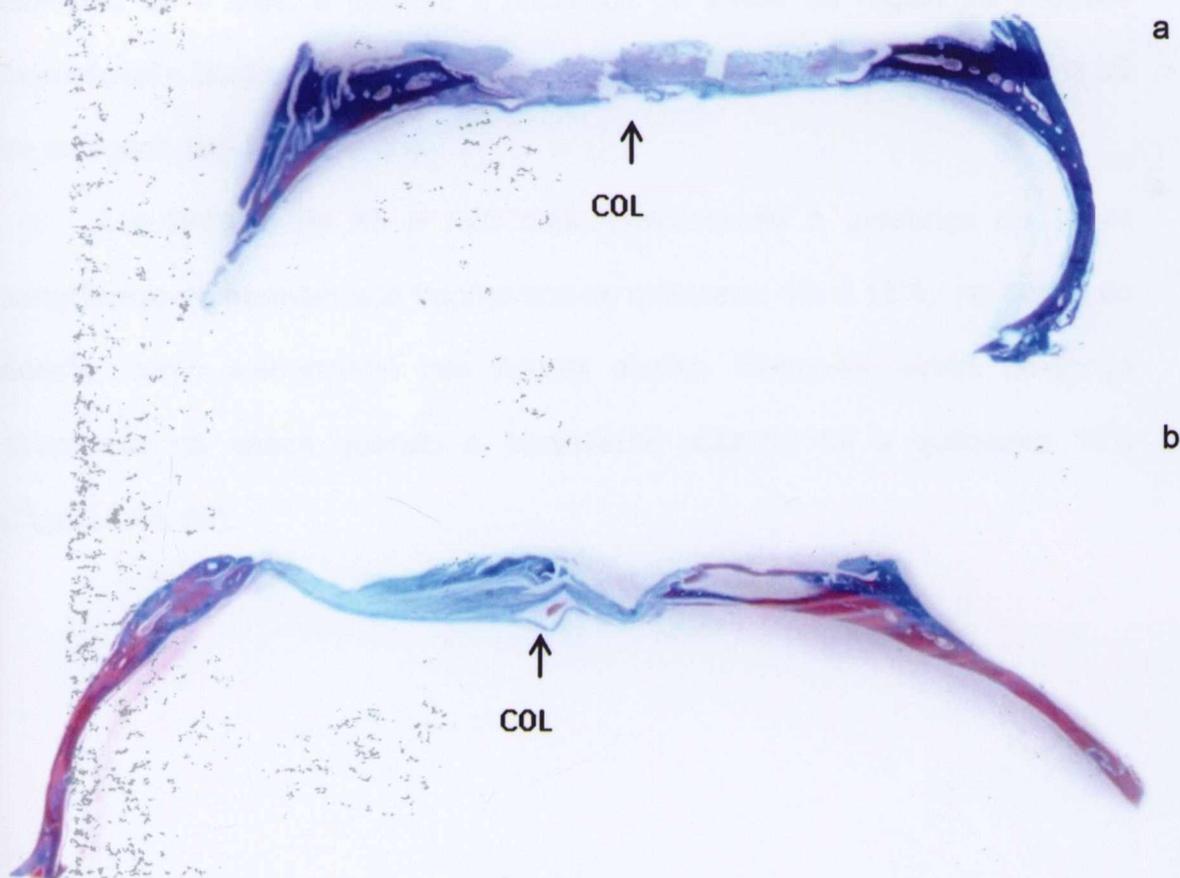


Figura 61. Fotografias do Grupo IV, coradas pelo Tricrômico de Masson, em diferentes pontos biológicos: a) 7 dias b) 45 dias. Ampliação: 8x. Lupa *Olympus*, Japão. **Legenda:** Matriz de colágeno (COL).

6.2.2 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

O método utilizado para a análise imunohistoquímica foi o indireto, ou seja, utilizou-se além de um anticorpo primário, PECAM-1 (M-20), um anticorpo secundário, o Biotinylated *Anti-goat* IgG. Após a revelação das lâminas com o DAB (3,3'diaminobenzidina), as ligações entre anticorpos primário e secundário, assumiram coloração castanha, indicando positividade para a presença de células endoteliais. Percebeu-se presença vascular, quando analisadas as micrografias relativas a todos os tempos biológicos, independentemente do tipo de biomaterial implantado (Figura 62). No tempo biológico de 7 dias, é patente a presença de vasos na região da interface biomaterial e bordas ósseas, em especial, quando da implantação da matriz 3D de colágeno tipo I (Figura 63).

Aos tempos de 45 e 120 dias, percebeu-se a presença de vasos sangüíneos de permeio aos fragmentos de quitosana 4% e 15%, no centro do defeito, como evidenciado nas figuras abaixo. Notou-se, ainda, presença acentuada de vasos quando o biomaterial utilizado foi a quitosana 15% (Figuras 64, 65).

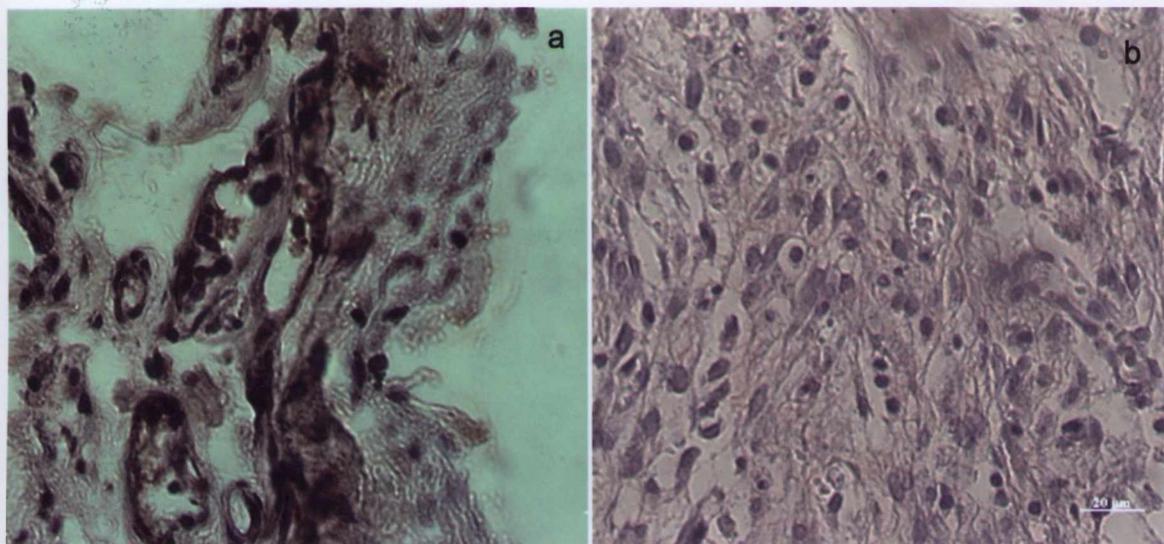


Figura 62. GI 7 dias. Vasos sanguíneos marcados com PECAM-1: a) Imagem da interface do defeito b) Controle Negativo para PECAM -1.

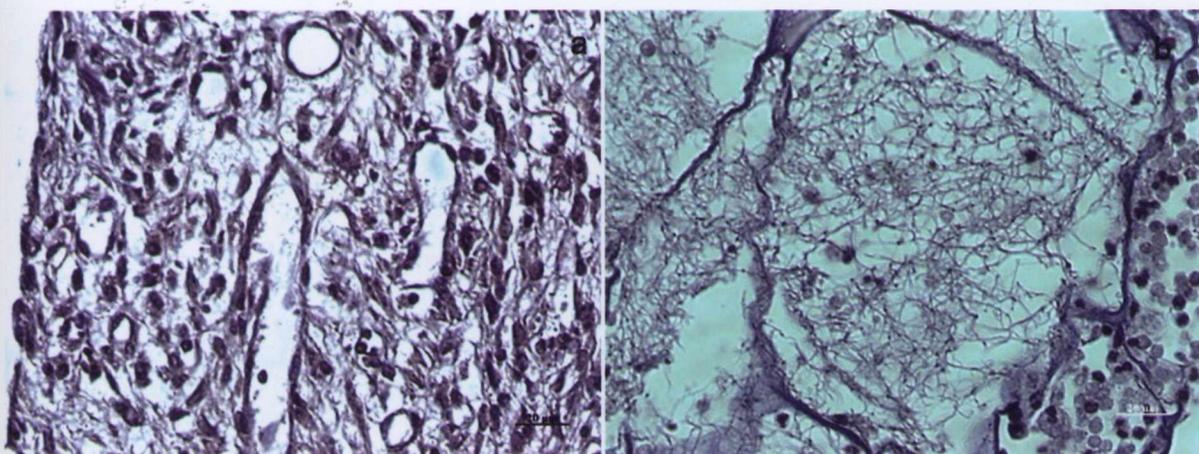


Figura 63. GIV 7 dias. Vasos sanguíneos marcados com PECAM-1: a) Área central do defeito; defeito; b) Controle Negativo.

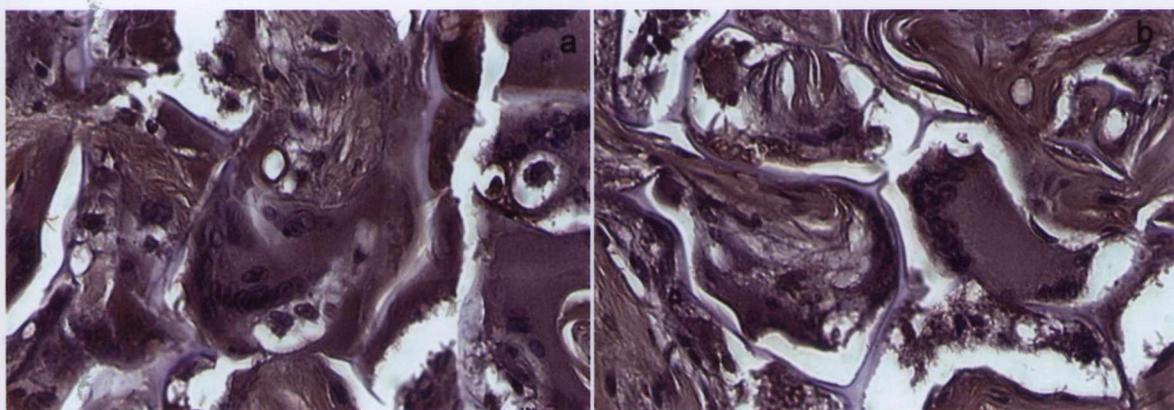


Figura 64. GII 45 dias. Fotografias da Matriz 3D de quitosana 4% permeada com vasos sanguíneos marcados com PECAM-1-na interface do defeito.

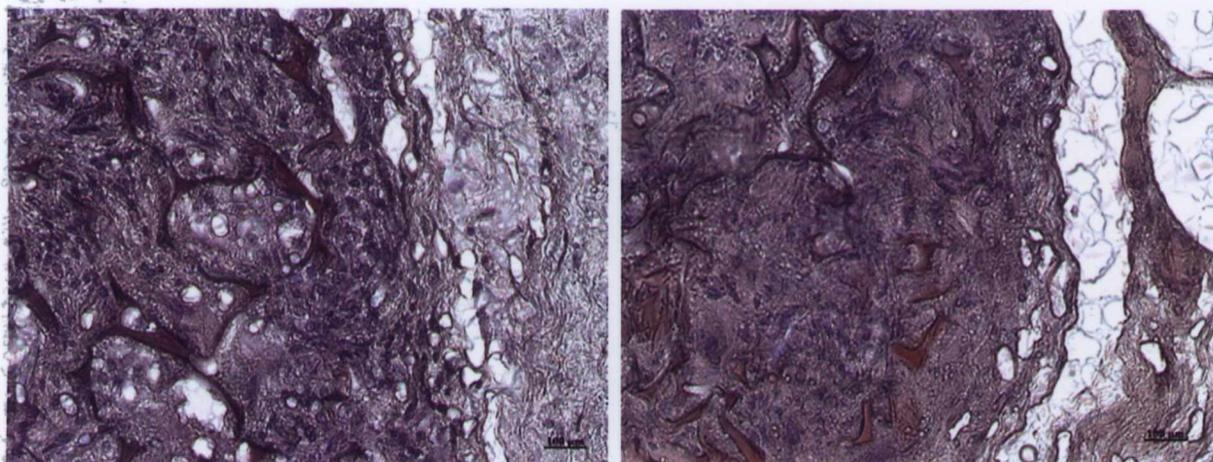


Figura 65. GIII 120 dias. Vasos sanguíneos permeando a matriz 3D de quitosana 15%. Marcação para PECAM-1. Imagens da interface do defeito.

Discussão

7 DISCUSSÃO

Um dos objetivos dessa investigação foi acessar o efeito do DA das matrizes de quitosana sobre a migração, adesão e proliferação celulares, além da sua viabilidade em arcabouços 3D nos ensaios *in vitro*.

As células utilizadas foram extraídas de medula óssea (*BMSC's* – *Bone Marrow Stromal Cells*), as quais têm sido alvo de muito interesse em terapias regenerativas ósseas, quando estas são baseadas em protocolos de replicação celular com o escopo de regenerar estruturas ausentes e / perdidas. Atualmente, constituem a principal fonte de células autólogas passíveis de indução e comprometimento com a linhagem osteogênica (AMARAL e outros, 2005).

No ensaio *in vivo*, a construção de defeitos críticos em calvária de rato constituiu uma manobra importante na avaliação da biocompatibilidade, osteogênese, e potencial angiogênico das matrizes 3D inseridas nos sítios de implantação, notadamente, quando observados os diferentes DA's da quitosana, e o seu impacto na qualidade e quantidade de células presentes, em especial, na região central do defeito.

Para a calvária de rato, o defeito de 8,5 mm é considerado crítico, ou seja, não ocorre reparo por neoformação óssea espontânea, conforme os conceitos estabelecidos por Schimitz e Hollinger (1998), fato este comprovado, neste estudo, em que os resultados do Grupo I (sem implantação de biomaterial), referentes aos tempos biológicos de 45 e 120 dias, demonstraram a presença de uma discreta ossificação reparativa, restrita à região das bordas do reparo, enquanto a área central do defeito foi caracterizada pela ausência de neoformação óssea. Houve deposição apenas de um tecido conjuntivo fibroso, em toda a extensão do defeito, sem área de neoformação óssea, muito embora, próximo às bordas ósseas, tenha ocorrido a presença de proliferação vascular, caracterizando um discreto processo de angiogênese, que se apresentava tênue à proporção que se distanciava em direção ao centro do defeito. Os resultados de Cardoso (2003), Miguel (2003) e Barreto (2006) confirmam as afirmações de Schimitz e Hollinger (1998) no que diz respeito à reparação tecidual em áreas consideradas de dimensões críticas, e reafirmam também os nossos achados. A formação vascular comentada acima, vista nos cortes histológicos, foi respaldada pela análise imunohistoquímica, em que houve marcação positiva para vasos, em especial, na região de interface bordas ósseas e defeito crítico, quando utilizado o PECAM-1.

Caracterizado, portanto, o defeito crítico e a necessidade regenerativa imposta pela demanda estrutural e funcional da região a ser reparada, não remanesce outra alternativa que não seja aquela representada pela inserção de um biomaterial, que além de preencher o defeito fisicamente, possa ter a funcionalidade de interagir com as células osteoprogenitoras, e que, mesmo não estando condicionado a induzir a sua diferenciação osteogênica, possa ter a habilidade microestrutural de conduzi-las, de forma

patente, às rotas metabólicas características da linhagem osteogênica (BURG; PORTER; KELLAM, 2000; DI MARTINO; SITTINGER; RISBUD, 2005; SHI e outros, 2005; WAN e outros, 2005; WU e outros, 2006, ZHANG e outros, 2007; POUND e outros, 2007).

Neste trabalho, a escolha da quitosana, como biomaterial central da análise, encontra justificativa em vários fatores, alguns deles já ventilados por outros autores aqui relacionados. Primeiro, o fato de ser extraído de fonte abundante e presente na natureza, e de dispor de uma estrutura construída sob a égide da seleção natural, ou seja, aprimorada no sentido de proteger estruturas orgânicas internas, ao tempo em que, também é resistente a estresses mecânicos, em especial, do meio externo. Segundo, de ser subproduto da indústria pesqueira, portanto, material considerado reciclável e de baixo custo. Fundamentalmente, por ser biomimético, ou seja, ter estrutura química compatível com as glicosaminoglicanas, presentes na matriz extracelular, inclusive as do tecido ósseo. Em adição, por ser um polímero, tem parâmetros microestruturais passíveis de serem manipulados, tornando-o um biomaterial com um número bastante heterogêneo de aplicações (CHUPA e outros, 2000; KHOR; LIM, 2003; MA e outros, 2003; SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006; CHEN e outros, 2006; GRENHA e outros, 2007; TAN e outros, 2007; XU e outros, 2007). E, por todas essas razões, tem sido relatado como um biomaterial biocompatível, que apresenta propriedades antitrombogênicas, antifúngicas e antibacterianas (SUH e MATTHEW, 2000; CHARTELET; DAMOUR; DOMARD, 2001; PRASHANT; KITTUR; THARANATHAN, 2002; KHOR; LIN, 2003; ASSIS e SILVA, 2003; MA e outros, 2004; HU e outros, 2004; SHI e outros, 2006; HSIEH; CHANG; LIN, 2007).

Muitos aspectos e análises prévias, em modelo *in vitro*, nortearam a eleição dos graus de acetilação da quitosana, de 4 e 15%, como elementos a serem avaliados, em especial, quando observados os resultados de Amaral e colaboradores (2005), os quais demonstraram que diferenças nos graus de acetilação das matrizes de quitosana na ordem de nove pontos percentuais podem ser críticas no desempenho das mesmas como arcabouço celular, em especial, no que se refere a adesão das células ao biomaterial.

Os diferentes DA's das matrizes 3D de quitosana constituem apenas umas das funcionalidades que pode interferir na inter-relação biomaterial e células osteoprogenitoras. Tantas outras, como resistência mecânica à carga, carga elétrica superficial, porosidade e interconexão entre os poros, devem também ser considerados no contexto da engenharia de materiais com aplicação na área biomédica (ANSELME; BURGUER; CAPLAN; HUTMACHER; KELLAM; PORTER, 2000; CHARULATHA e RAJARAM, 2003; CARVALHO; BASSI; VIOLIN, 2004; MAUNEY e outros, 2005; LIU e outros, 2007; REIS e outros, 2007; KARAKEÇILI e GUMUSDERELIOGLU; 2007).

Como controle positivo, matrizes 3D de colágeno tipo I foram utilizadas, sob condições experimentais similares, nos modelos *in vitro* e *in vivo*, visto serem, reconhecidamente, consideradas capazes de promover adesão, proliferação e diferenciação osteogênica *in vitro* (MASI e outros, 1992; WIESMANN e outros, 2003) e em razão de suas propriedades osteocondutoras, possibilitam regeneração tecidual *in vivo* (ROCHA; GOISSIS; ROSSI, 2002). Além disso, o colágeno possui em sua composição molecular domínios de reconhecimento celular (ANSELME, 2000), conhecidos como seqüência RGD, formada pelos aminoácidos arginina-glicina-ácido aspártico (COWLES e outros, 1998). Estes sítios interagem com a fibronectina presente

na MEC, que por sua vez reconhece glicolípídeos presentes na membrana plasmática celular (KLEINMAN; KLEBE; MARTIN, 1981) e estabelece, assim, adesões fibrilares (CUKIEMAN e outros, 2001) essenciais a ancoragem celular. E, por fim, apresenta como vantagem adicional a característica de poder ser moldado na forma 3D.

Relativamente a adesão celular, de acordo com os resultados obtidos a partir do ensaio de quantificação de DNA (dia 1), as rBMSC's aderiram de forma adequada a matriz colagênica, notadamente, numa intensidade maior quando comparadas às rBMSC's semeadas sobre as matrizes de quitosana de 4 e 15%. Quando avaliada a interferência do FBS e RS sobre a adesão celular na matriz de colágeno, o conteúdo de DNA apresentou-se em maior quantidade nas rBMSC's cultivadas com a adição de FBS, muito embora, com o RS, as rBMSC's tenham aderido na mesma intensidade que o fizeram para as matrizes de quitosana. Avaliando-se o seu comportamento na proliferação tecidual, portanto, aos 14 dias de semeadura, os traçados gráficos obtidos em função do conteúdo de DNA presente, em ambos os soros, e, em especial, no RS, insinuam o que os resultados do ensaio da f-actina evidenciaram, ou seja, uma grande densidade celular com intensa produção de matriz colagênica, notada também, no aspecto macroscópico, pela diminuição do diâmetro da matriz 3D, de 8,50 mm iniciais para 7,68 mm, o que pode ter sido conseqüência de grande embricamento intercelular e produção de matriz colagênica, com contração de toda a estrutura e, ulterior morte e eliminação das rBMSC's durante as sucessivas lavagens do meio de cultura. Os nossos achados *in vitro*, assim, reforçam os obtidos por MASI e colaboradores, e WIESMANN e colaboradores, em 1992 e 2003, respectivamente, comentados previamente.

No entanto, os resultados *in vivo*, contrariaram os encontrados pelos autores referenciados, Rocha, Goissi e Rossi (2002), na medida em que, nos sítios de implantação da matriz 3D de colágeno, nas condições estabelecidas para essa análise, não tenha sido notada a presença de tecido ósseo *de novo*, nem sequer, núcleos de mineralização nas regiões centrais do defeito, no ponto biológico mais distante, ou seja, de 120 dias. Há que ser ressaltado que os referidos autores, utilizaram em seu estudo, matriz de colágeno 3D aniônica.

Além da matriz de colágeno, no modelo *in vitro*, também foi utilizada o TCPS, sobre os quais as células foram semeadas, e tiveram o seu comportamento avaliado, sem a interferência do biomaterial, nos mesmos pontos biológicos de análise e com a adição ao meio de cultura de 10% de FBS no grupo considerado controle e igual concentração de RS, no grupo em teste. Logo, ao primeiro dia de cultura, as rBMSC's apresentaram-se aderidas à placa, e o longo dos 14 dias de cultura. Ao fim do período, apresentaram-se confluentes, alongadas, com aspecto fusiforme típico de células fibroblásticas, como esperado para as rBMSC's em fase proliferativa. Percebeu-se ainda, não ter havido diferenças marcantes na proliferação das rBMSC's quando cultivadas com a adição do RS, quando comparada ao grupo controle (FBS).

Todas as biomatrizes utilizadas nesse estudo foram preparadas e caracterizadas pela Divisão de Biomateriais do INEB, Porto – Portugal, observando-se a sua porosidade, densidade e diâmetro dos poros, visto serem tais atributos determinantes para eliciar a colonização celular, seja *in vitro* ou *in vivo* e, portanto, essenciais para a sua utilização como biomaterial de excelência na Bioengenharia Tecidual Óssea, cujos preceitos correntes lastreiam a necessidade de desenvolvimento de materiais de preenchimento, biocompatíveis e bioabsorvíveis, que, estruturalmente, mimetizem a matriz

extracelular, e que, por fim, sejam capazes de atuar como veículos condutores de substâncias sinalizadoras para as células autólogas osteoprogenitoras.

A biomatriz de quitosana aqui utilizada reuniu características de porosidade, densidade e diâmetro de poros com cerca de $96,16 \mu\text{m} \pm 26,26 \mu\text{m}$ para a biomatriz de quitosana 15%, e $114,08 \mu\text{m} \pm 38,28 \mu\text{m}$ para a biomatriz de DA de 4%. Muito embora, ainda não exista consenso na literatura no que tange ao tamanho ideal do diâmetro dos poros, uma vez que a diversidade de materiais é muito grande, acredita-se que diâmetros próximos a $\pm 150 \mu\text{m}$ sejam ideais para o trânsito de células e moléculas sinalizadoras inerentes à osteogênese, no interior dos arcabouços matriciais (EGGLI; MULLER; SCHENK, 1988).

Importante ressaltar a relação implícita entre grau de porosidade e propriedades mecânicas, sendo considerada de forma constante nos trabalhos relativos a materiais para formação óssea (REIS e outros, 2007). Embora a porosidade e a interconectividade dos poros no interior da biomatriz sejam propriedades importantes para a migração e proliferação celular, bem como, para o aporte vascular no interior do arcabouço matricial, quando tais aspectos fragilizam a capacidade de resistência à carga mecânica do biomaterial, pode comprometer a sua estabilidade física no sítio de implante e inviabilizar o seu papel como material bioativo de preenchimento (DI MARTINO; SITTINGER; RISBUD, 2005). Na nossa análise, o sítio de implante do biomaterial, a calvária do rato, é alvo de pouca ou quase nenhuma tensão mecânica, sendo, portanto, a intensidade do grau de porosidade das matrizes pouco relevante neste aspecto. Ainda assim, a porosidade dos biomateriais, seja ele quitosana, em seus dois DA's, como também, o colágeno, não só foi compatível com a fisiologia celular, como também, foi eliciadora, visto ter promovido a migração,

proliferação e deposição de matriz pelas rBMS, quando analisados os resultados *in vitro*. As micrografias obtidas aos 14 dias após cultivo e indução osteogênica, tanto em meio enriquecido com FBS, quanto com RS, e, em especial, por este último, demonstraram migração, adesão e proliferação celulares acentuadas, em especial quando analisadas as matrizes 3D de colágeno e de quitosana 4%. Na quitosana 15%, os achados, quanto a esses aspectos foram menos expressivos, e, de certo, vinculados ao DA, uma vez que uma menor densidade de células aderidas foi observada no ensaio de quantificação de DNA (dia 1), corroborado pelo ensaio da f-actina/DNA, aos 14 dias e ainda, sugerido pelo ensaio de viabilidade celular (calceína/iodeto de propídio), ainda que seja considerado o tamanho do diâmetro de seus poros, comparativamente menor do que o diâmetro dos poros da matriz 3D de colágeno ($173,53 \mu\text{m} \pm 38,62 \mu\text{m}$) e quitosana 4%. Como contraponto, considera-se, outrossim, o tamanho médio dos osteoblastos, que é de 10 a 30 μm (ARONOW e outros, 1990).

A biodegradação do material configura um outro aspecto que deve ser observado quando se objetiva estabelecer o tamanho e a densidade de poros no interior de matrizes 3D. De acordo com Cunha-Reis e colaboradores (2007), esta é uma relação direta, ou seja, quanto maior a densidade de poros de uma biomatriz exposta a atividade enzimática, mais rápida é a sua taxa de biodegradação. Também, como veremos a seguir, as matrizes de quitosana 15% apresentaram taxa de degradação mais acentuada do que a quitosana 4% e esse pode ter sido um fator contributivo.

Portanto, além do rol de aspectos favoráveis citados anteriormente, no que tange a eleição da quitosana como objeto dessa análise, a sua biodegradação representa um atributo positivo adicional, a qual deve ocorrer na

proporção em que o crescimento ósseo se estabelece, para que o tecido neoformado ocupe o espaço delimitado pela sua prévia presença (LI e outros, 2005; HUANG e outros, 2005), não estando unicamente vinculada às características físicas do biomaterial, mas também, às suas peculiaridades químicas.

Outro aspecto importante a ser considerado é o desenho estrutural dos arcabouços, o qual, em realidade, é resultante da observância de múltiplas características, dentre elas, a já discutida porosidade. A tendência atual converge para a utilização do modelo 3D de biomatriz, considerado mais fisiológico e próximo da arquitetura óssea original (HUTMACHER, 2000; CHATELET; DAMOUR; DOMARD, 2001). Neste formato, o processo de crescimento tecidual é facilitado pelo trânsito molecular e de células no interior da estrutura, o que proporciona também a formação de vasos e o conseqüente suprimento de oxigênio para área implantada (BURG; PORTER; KELLAM, 2000; HU e outros, 2004; HO e outros, 2005; LI e outros, 2005; MAUNEY e outros, 2005, ZHANG e outros, 2007a ; ZHANG e outros, 2007b; REIS e outros, 2007; TIGH; KARAKEÇILI, GUMUSDERELIOGLU, 2007). Tais afirmativas ficam evidentes no nosso trabalho, quando ao fazermos alusão aos resultados *in vitro*, e a partir deles, analisamos as micrografias obtidas pela microscopia confocal, das rBMSC's, percebemos a presença de células permeando, não só a superfície do biomaterial, mas o interior dos poros, com extensões filamentosas citoplasmáticas envolvendo as interconexões porosas. E, em adição, nas matrizes tridimensionais colagênicas, ainda, visualiza-se a matriz extracelular de aspecto amorfo produzida no interior de sua estrutura. Acreditamos, inclusive, como previamente mencionado, que a diminuição do diâmetro original da matriz de colágeno de 8,5 mm, como ocorreu, para 7,68

mm, quando cultivada em FBS, e para 6,93 mm, quando em RS, seja resultante do concomitante preenchimento de suas estruturas porosas e interconexões, não só pela matriz produzida, como também, pelo embricamento físico e tensionamento dos filamentos citoplasmáticos das células ali semeadas, sugerindo que o RS proporcionou a tais células os fatores de crescimento e proteínas necessárias, não só para a viabilidade da cultura, como também, para a sua manutenção.

Quando analisamos as imagens obtidas a partir das lâminas utilizadas para a marcação imunohistoquímica, ensaio *in vivo*, percebe-se, claramente, a formação vascular de permeio aos biomateriais, em especial na quitosana 15 e 4%, em suas regiões centrais, localizadas, obviamente, no centro do defeito crítico, indicando que os parâmetros físicos microestruturais se encontravam em consonância com o trânsito de moléculas sinalizadoras e fatores de crescimento, inclusive aqueles inerentes a angiogênese.

Ao se agregarem todos os aspectos até então ventilados à estrutura química das biomatrizes de quitosana, verifica-se que aquelas com graus de acetilação maiores são menos hidrofílicas e, portanto, menos solúveis em água e em ácidos orgânicos fracos liberados durante a resposta inflamatória e, também, durante o metabolismo celular, tendo uma taxa de biodegradação mais acentuada, como discorrido em parágrafo anterior. Isso ocorre, em razão da sua cadeia polissacarídica apresentar sítios com carga elétrica positiva, quando presentes nos microambientes após implantação, característica conferida pelos grupos amino, os quais, quando em meio, são passíveis de se dissociar assumindo, na molécula, pólos ionizados positivamente e, assim, com grande afinidade pela água, ácidos orgânicos e proteínas de perfil enzimático (VANDE VORD e outros, 2002).

Os resultados encontrados neste estudo ratificam essas afirmações, uma vez que a quitosana com DA de 15%, avaliada no grupo III, especialmente, para o tempo biológico de 45 dias, apresentou espessura e extensão do biomaterial diminutas, em relação àquelas apresentadas pela quitosana com DA de 4% para o mesmo período. Esses achados podem ser comprovados mais especificamente no tempo de 120 dias do mesmo grupo (GIII), em que fragmentos de biomaterial são vistos de forma esparsa, evidenciando a quase completa degradação da matriz, não acontecendo o mesmo com a quitosana 4%. Os estudos de Thig, Karakeçelli e Gumusderellelioglu (2007) reforçam esses achados.

Como já abordada, a interferência do DA da quitosana no comportamento celular se apresenta como um fator de extrema relevância nas terapias regenerativas fundamentadas na habilidade das células em interagirem com os biomateriais e a partir de então, assumirem um papel singular na reconstrução tecidual (YANG-JO e outros, 2004). De acordo com o descrito na literatura, quanto menor o DA, maior é a adesão, a proliferação e o crescimento de células de linhagem óssea, principalmente osteoblastos permeando a superfície da biomatriz (PRASITSILP e outros, 2000; CHATELET, ODILE, ALAIN, 2000; CHATELET, DAMOUR, DOMARD, 2001; LEE e outros, 2002; AMARAL e outros, 2005; JIANG e outros, 2006; TUZLAKOGLU e REIS, 2007; KONG e outros, 2007). O nosso estudo corrobora os achados encontrados por Amaral e colaboradores (2005) e também, Coutinho e colaboradores, mais recentemente (2008), quando afirmamos que sobre e de permeio à matriz de quitosana 4%, a adesão e proliferação celular, como também, a sua viabilidade foi mais significativa do que quando comparada à

quitosana 15%, quando esquadrinhados os ensaios *in vitro* (f-actina / DNA e quantificação de DNA, no dia 1).

A presença de um maior número de radicais acetil promove uma resposta inflamatória marcante, e em razão disso, entendemos que interfira de forma negativa, em razão de sua intensidade, no microambiente de implantação de forma a alterar o seu cenário bioquímico de maneira dramática, ou seja, a tensão de oxigênio local, o trânsito de nutrientes e metabólitos, e, em especial, o pH, quando em modelo *in vivo*. No nosso estudo, os animais que tiveram a quitosana 15% implantadas nos defeitos críticos criados em suas calvárias, apresentaram não só maior densidade de células inflamatórias presentes, em todos os tempos biológicos, como também uma neoformação óssea reativa na região de borda de defeito de magnitude considerável, percebida ainda no ponto biológico de 7 dias, conforme ilustrada pelas imagens obtidas a partir da lupa . Além desses aspectos, um grande número de células gigantes, já visualizadas aos 15 dias após o implante, foi notada, englobando os fragmentos de ambas as biomatrizes de quitosana, mas, de forma mais intensa na com DA de 15% e em toda a sua extensão, no centro e na periferia. Já na de 4%, foi percebida a presença de tais células mais na periferia, estando a área central do defeito e, por conseguinte, do biomaterial, permeada com matriz colagênica. Nenhuma área de mineralização foi percebida, aos 120 dias, nas matrizes 3D de quitosana.

Ficou demonstrada uma diferença insignificante, em termos de adesão celular entre os 2 arcabouços, de 4 e 15% de DA, quando avaliada no ensaio de quantificação de DNA, após um único dia de cultura *in vitro*, tanto em meio enriquecido com FBS, quanto com RS,

Entende-se que a adesão das células osteoblásticas aos biomateriais está muito relacionada com os atributos superficiais dos mesmos e que envolve uma adesão celular inicial, considerada de curto termo, na qual está sublinhada a imediata interação célula e natureza físico-química da superfície em questão. A essa fase, segue-se outra, caracterizada de longo termo, em razão do envolvimento entre as moléculas de superfície das células, integrinas e proteoglicanas, às glicoproteínas da matriz extracelular (MEC) (AMARAL e outros, 2005). Desse modo, as interações eletrostáticas inespecíficas entre os grupamentos amina protonados da estrutura molecular da quitosana e a superfície negativa das proteoglicanas parecem responder pelo fenômeno inicial da adesão dos osteoblastos ao arcabouço matricial (CHATELET e outros, 2001). Esses pressupostos coadunam com os nossos resultados relativos à adesão celular às matrizes de quitosana de 4 e 15%, no dia 1 da quantificação de DNA.

A menor adesão celular sobre as matrizes de quitosana 15% é evidenciada, especialmente, nas micrografias obtidas 14 dias após a sua semeadura, nos ensaios da f-actina / DNA, calceína / iodeto de propídio. Atribue-se tal evento a adsorção de fibronectina presente no soro adicionado ao meio à quitosana 4%, quando comparada ao TCPS ou quitosana de DA's maiores, como é o caso da de DA de 15%, conforme também relatada por Amaral e colaboradores, em 2005. De acordo, com Cuy e colaboradores (2003) a laminina também adsorve bem em matrizes de quitosana com DA's menores que 20%.

Ressalta-se, ainda, que a migração e distribuição celular, o arranjo e a organização de fibras do citoesqueleto (f-actina), como a sinalização molecular citoplasmática são mediadas pela camada de glicoproteínas

adsorvidas ao biomaterial e que contêm domínios RGD (Arginina- Glicina – Ácido aspártico), tais como, fibronectina, colágeno tipo I e vitronectina (ANSELME, 2000) e que, uma vez, ligadas às integrinas, estabelecem sítios de adesão focal. Ademais, sabe-se que a fibronectina, presente no soro, apresenta uma conformação tridimensional muito mais favorável à adsorção sobre estruturas que expõem grupamentos amina, do que às que expõem grupamentos metila, os quais estão presentes em unidades acetiladas das matrizes de quitosana (KESELOWSKY e outros, 2003). Assim, o comportamento das rBMSC's quando semeadas sobre a quitosana 15% talvez possa ser explicado pela menor adsorção desse peptídeo à estrutura matricial.

O relato de trabalhos que demonstram o desempenho histomorfológico deste biomaterial *in vivo* é escasso, quando comparado com a grande predominância de estudos *in vitro*, o que dificulta sobremaneira a comparação dos resultados ventilados na nossa análise e na abordagem em foco. De forma geral, as análises diferem muito quanto ao tipo de modelo animal utilizado, por vezes, cachorros, coelhos, ovelhas, e quanto às características físico-químicas dos arcabouços utilizados, o que dificulta, sobremaneira, a contraposição de resultados.

Importante ressaltar que a biocompatibilidade de um material é avaliada pela resposta tecidual do hospedeiro, no momento em que este entra em contato com os fluidos tissulares, de forma a desencadear uma mínima resposta inflamatória ou imunitária (WATAHA, 2002). No que se refere a esse aspecto, em particular, os resultados por nós obtidos, demonstraram que as duas configurações de biomatrizes de quitosana (4% e 15%) avaliadas, apresentaram intensa resposta inflamatória, evidenciada pela elevada densidade celular, predominantemente do tipo granulomatosa, tanto para o GII

(4%) quanto para o GIII (15%), em todos os pontos biológicos de observação, como já adiantado. Ressalta-se ainda que, para o GIII, este infiltrado gigante celular foi muitas vezes observado em toda a extensão do biomaterial, diferentemente do GII, no qual estas células concentravam-se mais na sua periferia. Esses resultados realçam a presença de uma resposta inflamatória acentuada até os primeiros 15 dias do processo de reparo, caracterizada pela formação de tecido de granulação, proliferação vascular e denso infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear, tanto no grupo GII (7 e 15 dias), como no grupo GIII (7 e 15 dias), o que corrobora os achados de Vander Vord (2002). De acordo com o autor, a presença de interações químicas específicas existentes entre os oligossacarídeos que compõem a estrutura polissacarídica da molécula, aliada a exposição focal de moléculas de selectina, parecem favorecer a uma migração neutrofilica em direção ao sítio de implantação da matriz.

De acordo com Anderson (2001), e Luttkhuizen, Harmsen e Kuyn (2006), a resposta biológica frente à lesão tecidual decorrente da implantação de biomateriais é caracterizada, inicialmente, pelas interações que passam a ser estabelecidas entre sangue-superfície do material implantado, concomitante formação de tampão plaquetário provisório, denominado, por vezes, de matriz provisória, presença de células que desencadeiam a inflamação aguda e, em seqüência, a crônica, tecido de granulação, reações de corpo estranho e encapsulamento fibroso. Sabe-se que as reações de corpo estranho, por sua vez, são caracterizadas pela adsorção de proteínas ao substrato, tais como, albumina, fibrinogênio, fibronectina, vitronectina e globulinas, e ulterior, adesão de macrófagos e fusão destes para formação de células gigantes, além da interação entre tais células e tantas outras

relacionadas à resposta inflamatória e ao reparo tecidual (ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2008). Na nossa análise, foi notada a ocorrência de reação inflamatória intensa, por vezes, granulomatosa, nos tempos biológicos de menor período e, naqueles de maior elasticidade, foi notado, em adição, o encapsulamento das matrizes de quitosana, nos dois DA`s. Ressalta-se, ainda, que as biomatrizes foram paulatinamente degradadas e uma malha de tecido fibroso interposta, matriz e bordas do defeito, de forma concomitante à sua fragmentação. Para ambos os grupos (II e III) não houve expulsão do biomaterial, o que nos impossibilita negar a sua biocompatibilidade. Os achados *in vivo*, no referido aspecto, foram reforçados pelas análises *in vitro*. As rBMSC`s apresentaram-se viáveis quando semeadas em todos os biomateriais (ensaio da calceína/iodeto de propídio) após 14 dias de cultura e indução osteogênica *in vitro*, seja em meio enriquecido com FBS, seja naquele enriquecido com RS.

A análise pertinente ao grupo GII (4%), no tempo de 120 dias, mostrou, além de menor resposta inflamatória, maior migração de fibroblastos associados à presença de tecido fibroso de maior densidade, coadunando com os resultados de Tighi, Karakeçelli e Gumusderelelioglu (2007), os quais avaliaram *in vitro* a influência da composição e do DA de matrizes tridimensionais de quitosana e o comportamento de células fibroblásticas. Para esses autores biomatrizes com alto grau de deacetilação, como as de 4%, mostraram-se mais favoráveis à adesão e à proliferação fibroblástica do que as biomatrizes com baixo grau de deacetilação. Para o GIII, grau de acetilação maior, de 15%, houve pequena deposição de matriz colagênica de permeio ao biomaterial, apenas a presença de tecido conjuntivo fibroso pouco organizado em torno da biomatriz.

Sabidamente, os fibroblastos são as células predominantemente encontradas em tecidos conjuntivos formados a partir do desencadeamento de mecanismos de reparo tecidual (PAN e outros, 2006). Estas células são importantes na produção de componentes essenciais ao tecido conjuntivo, como os componentes da matriz extracelular e, no tecido propriamente fibroso, do colágeno. No entanto, quando da implantação de biomateriais para regeneração de tecido ósseo, a adesão dessas células às superfícies do material de preenchimento pode ocasionar o encapsulamento fibroso do mesmo interferindo no processo de substituição da biomatriz pelo osso *de novo* e culminando com a formação de tecido fibroso denso ou cicatricial (BAXTER e outros, 2002). O encapsulamento fibroso nessa análise ocorreu de forma patente na quitosana 15%, em especial nos tempos biológicos de 45 e 120 dias, sendo diretamente relacionado com a intensidade da resposta inflamatória incitada e com a subsequente neoformação vascular, resultantes das interações células-superfície da matriz e do desencadeamento da cascata de eventos biológicos a partir desta.

Vale ressaltar que, ao longo do processo de reparo tecidual, a dura-máter exerce papel fundamental no povoamento da área do defeito crítico, especialmente, nesse modelo experimental, em razão da sua proximidade com o sítio para o qual as células estão sendo endereçadas. A sua camada germinativa propicia aporte celular contínuo, o que se apresenta de forma muito evidente a partir da análise histológica, quando se visualiza no seu entorno, maior deposição de matriz colagênica, quando comparada à região do retalho.

Diante do exposto, reconhece-se que dentre as estratégias correntes relacionadas à Bioengenharia Tecidual está a utilização de células replicadas *in vitro*, caracterizadas e semeadas por sobre um arcabouço matricial e seu ulterior implante *in vivo*. Ainda, reafirma-se que a eficiência tecidual na formação de osso *de novo* está fortemente associada às condições nas quais essas células foram expandidas *in vitro*. Embasados por esses conceitos, e em adição, com o objetivo de contornar a utilização do FBS como substrato de enriquecimento de meio de cultura celular, testou-se, igualmente, o emprego do RS, autólogo, como fonte de proteínas e fatores de crescimento para a cultura das rBMSC's. Como visto, ao longo da leitura dos resultados, a sua inserção ao meio interferiu de forma positiva na adesão e proliferação celulares, achados corroborados por Masaki e colaboradores, em 2001.

Desta forma, foram delineadas as primeiras ferramentas em direção a otimização das funcionalidades das matrizes de quitosana, sob investigação nesse estudo, no exercício de sua potencialidade em conduzir a adesão e proliferação celulares *in vitro*.

Extrapolando esses dados para análise *in vivo*, sem deixar de considerar as distintas peculiaridades de cada microambiente, pode-se sugerir que na medida em que tais biomateriais possam ter os seus parâmetros microestruturais manipulados, no sentido de eliciarem respostas do hospedeiro, tais como, reações inflamatórias e de imunogenicidade, de menor intensidade e, portanto, compatíveis com a viabilidade celular, e também, com a migração e adesão de tipos celulares comprometidos com a formação de osso *de novo*, as técnicas regenerativas estarão mais próximas da sua aplicabilidade clínica na Bioengenharia Tecidual Óssea.

Estudos posteriores de implantação de matrizes 3D de quitosana, nos DA's de 4 e 15%, semeadas com as rBMSC's ,em defeito crítico de calvária de rato, cultivadas com adição do RS, constituem uma das vertentes vislumbradas no contexto das perspectivas futuras;

O delineamento dos parâmetros microestruturais das matrizes utilizadas como arcabouços 3D de inserção celular, aliada à compreensão dos eventos moleculares subjacentes à osteogênese e às interações célula-dependentes, configuram como outros alvos a serem escrutinados no cenário de análises científicas prospectivas.

Conclusão

8 CONCLUSÃO

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

8.1 Ensaio *in vitro*

As rBMSC's apresentaram-se viáveis sobre as matrizes 3D de quitosana, nos seus diferentes DA's, nos dois soros utilizados;

Houve interferência do DA das matrizes de quitosana na adesão e proliferação celulares;

O DA de 15% promoveu menor adesão e proliferação celulares;

O crescimento das rBMSC's sobre matrizes 3D de quitosana e colágeno sugere que o RS contém proteínas e fatores de crescimento necessários para adesão e proliferação celulares.

8.2 Ensaio *in vivo*

O comportamento osteogênico dos biomateriais testados esteve restrito a neoformação óssea reparativa das bordas ósseas;

As matrizes 3D se apresentaram biocompatíveis;

A inserção da matriz 3D de quitosana 4% induziu resposta inflamatória menos intensa quando comparada à de 15%.

Referências

REFERÊNCIAS

- AMARAL, I.F. et al. Rat bone marrow stromal cells osteogenic differentiation and fibronectin adsorption on chitosan membranes: the effect of the degree of acetylation. *J. B Mater. Res.*, 2005. v.75, p.387-397.
- AMARAL, I.F.; SAMPAIO, P.; BARBOSA, M.A. Three-dimensional culture of human osteoblastic cells in chitosan sponges: the effect of the degree of acetylation. *J. B Mater. Res.*, 2005. v.76, p.335-346.
- ANDERSON, J. M.; RODRIGUEZ, A.; CHANG, D. T. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin. Immunol.*, 2008. v. 10, p. 1-15.
- ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*, 2000. v. 21, p. 667-681.
- ARONOW, M. et al. Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria. *J. Cell Physiol.*, v.143, p.213-221, 1990.
- ASSIS, O.B.G.; SILVA, V.L. Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 2003. v.13, p. 223-228.
- AUBIN, J. E.; LIU, F. The osteoblast lineage. In: Bilizekian, J., Raisz, L., and Rodan, G., editors. Principles of bone biology. San Diego, CA: Academic press: 1996, p. 39-50.
- AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e quitosana: Aplicações como biomateriais. *Rev. Elet. Mat. Proc.*, 2007. v. 23, p. 27-34.
- BALGUDE, A. P. et al. Agarose gel stiffness determines rate of DRG neurite extension in 3D cultures. *Biomaterials*, 2001. v. 22, p. 1077-1084.

BARRETO, E. C. *Avaliação in vivo do reparo de defeito ósseo com biomaterial do tipo microesferas cerâmicas*. 2006. 103f. Dissertação (Mestrado em Odontologia), Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia, Salvador.

BAXTER, L. C. *et al.* Fibroblast and osteoblast adhesion and morphology on calcium phosphate surfaces. *Eur. Cell Mater.* 2002. v.4, p.1-17.

BISHOP, A. E.; LEE, D. K.; POLAK, J. M. Embryonic stem cells. *J. Pathology*, 2002. v. 197, p. 424-429.

BORAH G, SCOTT B, WORTHAM K. Bone induction by Chitosan in Endochondral bones of the Extremities. In: Brine CJ, Sandford PA, Zikakis JP, editors. *Advances in Chitin and Chitosan*: Elsevier; 1992. p 206-215.

BOYAN, B. D. *et al.* Bone and cartilage tissue engineering. *Clinics in Plastic Surgery*, 1999. v. 26, p. 629-641.

BRUDER, S. P.; CAPLAN, A. I. Bone regeneration through cellular engineering. In: Lanza, R. P., Langer, R.; VACANTI, J., editors. *Principles of tissue engineering*. San Diego: Academic Press; 2000. P. 683-696.

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

CANCEDDA, R.; GIANNONI, P.; MASTROGIACOMO, M. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. *Biomaterials*, 2007. v.28, p.4240-4250.

CARANO, A. D.; FILVAROFF, E. H. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov. Today*, 2003. v.8, p.980-984.

CARDOSO, A. K. M. V. *Análise histomorfológica da implantação de biovidros em defeito crítico criado em calvária de rato*. 2003. 130f Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica), Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia, Salvador.

CARVALHO, P.S.P.; BASSI, A. P. F.; VIOLIN, L.A. Revisão e proposta de nomenclatura para os biomateriais. *Implant News*, 2004. v.1, p.255-259.

CHATELET, C.; DAMOUR, O.; DOMARD, A. Influence of degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*. 2001, v.22. p.261-268.

CHARULATHA, V.; RAJARAM, A. Influence of different crosslinking treatments on the physical properties of collagen membranes. *Biomaterials*, 2003. v.24, p.759-767.

- CHEN, V. J.; SMITH, L. A.; MA, P. X. Bone regeneration on computer-designed nano-fibrous scaffolds. *Biomaterials*, 2006. v.27, p.3973-3979.
- CHUPA, J. M. *et al.* Vascular cell responses to polysaccharide materials: *in vitro* and *in vivo* evaluations. *Biomaterials*, 2000. v.21, p.2315-2322.
- COUTINHO, D. F. *et al.* The effect of chitosan on the *In vitro* Biological performance of chitosan-poly (butylenes succinate) blends. *Biomacromolecules*. 2008. v. 9, p. 1139-1145.
- COWLES, E. *et al.* Mineralization and the expression of matrix proteins during *in vivo* bone development. *Calcif. Tissue Int.*, 1998. v.62, p.74-82.
- CUKIERMAN, E. *et al.* Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*, 2001. v.294, p.1708-1712.
- CUNHA; REIS, C. *et al.* Influence of porosity and fibre diameter on the degradation of chitosan fibre-mesh scaffolds and cell adhesion. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 2007. v. 18, p. 195-200.
- CURTIS, A.; WILKINSON, C. New depths in cell behaviour: reactions of cells to nanotopography. *Biochem. Soc. Symp.*, 1999. v. 65, p. 15-26.
- CUY, J. L. *et al.* Adhesive protein interactions with chitosan: Consequences for valve endothelial cell growth on tissue engineering materials. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 2003. v. 67A, p. 538-547.
- DIETMAR, W. H.; GARCIA, A. J. Scaffold-based bone engineering by using genetically modified cells. *Gene*, 2005. v. 347, p. 1-10.
- DI MARTINO, A.; SITTINGER, M.; RISBUD, M.V. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials*, 2005. v.26. p.5983-5990.
- DUCY, P. *et al.* Osf2/Cbfa1: A Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation. *Cell*, 1997. v. 89, p. 747-754.
- EGGLI; P. S.; MULLER; W.; SCHENK, R. K. Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with 2 different pore-size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits – A comparative histomorphometric and histologic-study of bony in-growth and implant substitution. *Clin Orthop.*, 1988. v. 232, p. 127-138.
- EINHORN, T. A. Clinically applied models of bone regeneration in tissue engineering research. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 1999. v.367, p.S59-S67.
- ELSDALE, T.; BARD, J. Collagen substrata for studies on cell behavior. *J. Cell Biol.*, 1972. v. 54, p. 626-637.

- EVANS, E.; KENT, S. P. The use of basic polysaccharides in histochemistry and cytochemistry: iv. precipitation and agglutination of biological materials by *aspergillus* polysaccharide and deacetylated chitin. *J. Histochem. Cytochem.*, 1962. v. 10, p. 24-28.
- FINKEMEIER, C. G. Bone-Grafting and Bone-Graft Substitutes. *JBJS*, 2002. v. 84, p. 454-464.
- GONÇALVES, E. A. L.; GUIMARÃES, S. A. C.; GARCIA, R. B. Proteínas morfogenéticas ósseas: terapêutica molecular no processo de reparo tecidual. *Rev. Odontol. UNESP*, 1998. v.12, p.299-304.
- GRENHA, A. *et al.* Chitosan nanoparticle-loaded mannitol microspheres: structure and surface characterization. *Biomacromolecules*, 2007. v.8, p.2072-2079.
- GUMUSDERELIOGLU, M.; KARAKEÇILI, A. G. Physico-chemical and thermodynamic aspects of fibroblastic attachment on RGDS-modified chitosan membranes. *Coll. Surf. B: Biointerfaces*, 2007. v. 61, 216-223.
- HIDAKA, Y. *et al.* Histopathological and immunohistochemical studies of membranes of deacetylated chitin derivatives implanted over rat calvaria. *J. B Mater Res.*, 1999. v. 46, p. 418 423.
- HO, M. H. *et al.* Preparation and characterization of RGD-immobilized chitosan scaffolds. *Biomaterials*, 2005, v. 6, p.3179-3206.
- HSIEH, W.C.; CHANG, C.P.; LIN, S.M. Morphology and characterization of 3D micro-porous structured chitosan scaffolds for tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2007. v.57, p.250-255.
- HU, Q. *et al.* Preparation and characterization of biodegradable chitosan hydroxyapatite nanocomposite rods via in situ hybridization: a potential material as internal fixation of bone fracture. *Biomaterials*, 2004. v.25, p.779-785.
- HUANG, Y. *et al.* In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 2005. v.26, p.7616-7627.
- HUTMACHER, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 2000. v.21, p.2529-2543.
- HENRIKSEN, I. *et al.* Bioadhesion of hydrated chitosans: an *in vitro* and *in vivo* study. *Int. J. Pharmac.*, 1996. v. 145, p. 231-240.
- ITO, A. ; MASE, A. ; TAKIZAWA, Y.; SHINKAI, M.; HONDA, H.; HATA, K. I.; UEDA, M.; YASHI, T. K. Transglutaminase-mediated gelatin matrices incorporating cell adhesion factors as a biomaterial for tissue engineering. *J. Biosci. Bioeng.* v. 95, p. 196-199, 2003.

ITO, M. *Biomaterials*, 1991. v. 12, p. 41-46.

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

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

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. In: *Histologia Básica*. 2005. 6ª Ed. 488p.

KESELOWSKY, B. G. *et al.* Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 2003. v. 66A, p. 247-259.

KHAN, S.; TOMIN, E.; LANE, J. Clinical applications of bone graft substitutes. *Orthop. Clin.*, 2000. v. 31, p. 389 – 398.

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

KLEINMAN, H. K.; KLEBE, R. J.; MARTIN, G. R. Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. *J. Cell Biol.*, 1981. v.88, p.473-485.

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

KURITA K. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Prog Polym Sci.*, 2001. v. 26, p. 1921-1971.

LAHIJI, A. *et al.* Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2000. v. 51, p. 586-595.

LANE, J. M. Bone Marrow and Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 in Osseous Repair., *Clin. Orthop.Related Res.*, 1999. v. 367S, p. S107-S117.

LANGER, R; VACANTI, J. P. Tissue engineering. *Science*, 1993. v.260, p. 920-926.

LEE, C. H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. *Int. J. Pharma.*, 2001. v.221, p.1-22.

LEE, J. Y. *et al.* Enhanced bone formation by controlled growth factor delivery from chitosan-based biomaterials. *J Control Release*, 2002. v. 78, p. 187-197.

LEE, S. Mineralization of type I collagen. *Biophys. J.*, 2003. v.85, p.204-207.

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

LIM, S. C.; LEE, M. J.; YEO, H. H. Effects of various implant materials on regeneration of calvarial defects in rats. *Pathol. Int.*, 2000. v.50, p.594-602.

LIU, H.C. *et al.* Preparation of PLLA membranes with different morphologies for culture of MG-63 cells. *Biomaterials*, 2004. v. 25, p. 4047-4056.

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

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

MANIATOPOULOS; SODEK; MELCHER. Bone Formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell. Tissue Res.*, 1988, v. 254, p. 317-330

MASAKI, F. *et al.* Age-dependent decline in bone nodule formation stimulating activity in rat serum is mainly due to the change in the corticosterone level. *J. Cell. Biochem*, 2001. v. 81, p. 547-556.

MASTROGIACOMO, M. *et al.* Tissue engineering of bone: search for a better scaffold. *Orthod. Craniofac. Res.*, 2005. v.8, p.277-284.

MAIS, L. *et al.* Adhesion, growth, and matrix production by osteoblast on collagen substrata. *Calcif Tissue Int.*, 1992. v. 51, p. 202-212.

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

MIGUEL, F. B. *Avaliação morfológica do comportamento de matrizes tridimensionais de colágeno aniônico na regeneração óssea em rato.* 2003. 115f. Dissertação (Mestrado em Odontologia), Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia, Salvador.

MIGUEL, F. B. *et al.* Morphological assessment of the behavior of threedimensional anionic collagen matrices in bone regeneration in rats. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, 2006. v.78, p.334-339.

MUZZARELLI, R. A. A. *et al.* *In vivo* and *in vitro* biodegradation of oxychitin-chitosan and oxypullulan-chitosan complexes. *Carb. Poly.*, 1992. v. 48, p. 15-21.

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

PAN, H.; JIANG, H. L.; CHEN, W. L. Interaction of dermal fibroblasts with electrospun composite polymer scaffolds prepared from dextran and poly lactide-coglycolide. *Biomaterials*, 2006. v.27, p.3209-3220.

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

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

PRASITSILP, M. *et al.* Cellular responses to chitosan in vitro: the importance of deacetylation. *J. Mater. Sci. Mater. Med*, 2000. v. 11, p. 773-778. 2000.

RANUCCI, C.C; MOGHE, P. V. Substrate microtopography can enhance cell adhesive and migratory responsiveness to matrix ligand density. *J. Biomed. Mater. Res*, 2001. v. 54, p. 149-161.

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

ROCHA, L. B.; GOISSIS, G.; ROSSI, M. A. Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. *Biomaterials*, v.23, p.449-456, 2002.

ROSE, F. R. A.; OREFFO, R. O. C. Bone tissue engineering: hope vs hype. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.292, p.1-7, 2002.

ROSEN, V.; COX, K.; HATTERSLEY, G. Bone morphogenetic protein. In: Principles of bone biology. Bilezikian, J.P.; Raisz, L.G.; Rodan G.A., editors. Academic Press, New York, 1996, p.661-672.

ROSKELLY, C.D.; BISSEL, M. J Dynamic reciprocity revisited: a continuous, bidirectional flow of information between cells and the extracellular matrix regulates mammary epithelial cell function. *Biochem. Cell Biol.*, 1995. v. 73, p. 391-397.

SAADEH, P. B. *et al.* Repair of a critical size defect in the rat mandible using allogenic type I collagen. *J. Craniofac. Surg.*, v.12, p.573-573, 2001.

SCHIMIDT, C. E.; BAIER, J. M. Acellular vacular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. *Biomaterials*, 2000. v.21, p.2215-2231.

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

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

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

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

SITTINGER, M. *et al.* Tissue engineering and autologous transplant formation: Practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques. *Biomaterials*, 1996. v. 17, p. 237-242.

SODECK, J., CHEIFETZ, S. Molecular regulation of osteogenesis. *In: DAVIES, J. E. (Ed.) Bone Engineering*. Toronto: Squared Incorporated, 2000. cap.4, p.31-43.

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

SUNDARARAJAN, V. W.; HOWARD, M. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 1999. v. 20, p. 1133-1142.

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

TEIXEIRA, C. C. *et al.* A rapid and ultrasensitive method for measurement of DNA, calcium and protein-content, and alkaline-phosphatase activity of chondrocyte cultures. *Calc. Tissue Int.*, 1995. v. 56, p. 252-256.

TOMIHATA, K.; IKADA, Y. *In vitro* and *in vivo* degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. *Biomaterials*, 1997. v. 18, p. 567-575.

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

TRIFFITI, J. T. The stem cell of the osteoblast. *In: Bilizekian, J., Raisz, L., and Rodan, G., editors. Principles of bone biology*. San Diego, CA: Academic press: 1996, p. 39-50.

TSAI, A. T.; RICE, J.; SCATENA, M.; LIAW, L.; RATNER, B. D.; GIACHELLI, C. M. The role of osteopontin in foreign body giant cell formation. *Biomaterials*, v. 26, p. 5835-5843, 2005.

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

VACANTI, J. P. *et al.* Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration. *Adv Drug Deliv Rev.*, 1998. v. 3, p. 165-182.

VANDE VORD, P.J. *et al.* Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2002. v. 59, p. 585- 590.

VASCONCELOS, B. C. E. *et al.* Reconstrução alveolar com enxerto ósseo autógeno intrabucal. *Rev. Bras. Cir. Periodont.*, v.1, p.31-55, 2003.

VOGEL, G. Can Adult Stem Cells Suffice? *Sci*, 2001. v. 292, p. 1820 – 1822.

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

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

WEBB, K.; HLADY, V.; TRESCO, P. A. Relationships among cell attachment, spreading, cytoskeletal organization, and migration rate for the anchorage-dependent cells on model surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2000. v. 49, p. 362-368.

WIESMANN, H. P. *et al.* Bone tissue engineering by primary osteoblast-like cells in a monolayer system and 3-dimensional collagen gel. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2003. v.61, p.1455-1462.

WILLIAMS, D. F. (Ed.) *Definitions in biomaterials.* New York: Elsevier, 1985.

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

XU, L.; ANDERSON, A. L.; LU, Q.; WANG, J. Role of fibrillar structure of collagenous carrier in bone sialoprotein-mediated matrix mineralization and osteoblast differentiation. *Biomaterials*, 2007. v.28, p.750-761.

YANG-JO *et al.* Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation. *Biotechnology Letters*, 2004. v. 2004, p. 1037-1041.

YUAN, Y. *et al.* The interaction of Schwann cells with chitosan membranes and fibers *in vitro*. *Biomaterials*, 2004. v. 25, p. 4273-4278.

ZAMIR, E. *et al.* Molecular diversity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J. Cell. Sci.*, 1999.v.112, p. 1655–1669

ZELTINGER, J. *et al.* Effect of Pore Size and Void Fraction on Cellular Adhesion, Proliferation, and Matrix Deposition. *Tissue Engineering*, 2001. v. 7, p. 557-572.

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

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