



**UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO**

**LEE CHEN TZU**

**CHENG HUNG JU**

**TESTES DE BIOCAMPATIBILIDADE E DE  
POTENCIAL OSTEOGÊNICO DO GEL DE  
QUITOSANA INCORPORADOS A PROTEÍNA  
MORFOGENÉTICA ÓSSEA (BMP) E HIDROXIAPATITA**

**Bauru**

**2007**



**UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO**

**LEE CHEN TZU**

**CHENG HUNG JU**

**TESTES DE BIOCOMPATIBILIDADE E DE POTENCIAL  
OSTEOGÊNICO DO GEL DE QUITOSANA INCORPORADOS  
A PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA (BMP) E  
HIDROXIAPATITA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências Biológicas como parte requisitos para obtenção do título bacharel em Odontologia, sob orientação da Prof. Dra. Angela Kinoshita.

**BAURU**

Lee, Chen Tzu.

L4771t

Testes de biocompatibilidade de potencial osteogênico do gel de quitosana incorporados à proteína morfogenética óssea (BMP) e hidroxiapatita. / Chen Tzu Lee, Hung Ju Cheng. -- 2007.

61.f.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra Ângela Kinoshita

Trabalho de Conclusão de Curso

(Odontologia) - Universidade do Sagrado Coração - Bauru

- SP.

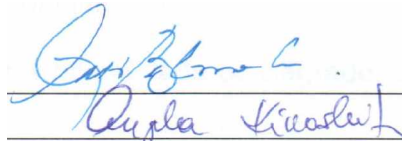
1. Quitosana                      2. BMP                                      3.  
Biocompatibilidade   4. Potencial osteogênico   I.Cheng, Hung  
Ju   II. Kinoshita, Ângela   III.Título.

**LEE CHEN TZU  
CHENG HUNG JU**

**TESTE DE BIOCOMPATIBILIDADE E POTENCIAL OSTEOGÊNICO  
DO GEL DE QUITOSANA INCORPORADO À PROTEÍNA  
MORFOGENÉTICA ÓSSEA (BMP) E HIDROXIAPATITA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências de Saúde como parte requisitos para obtenção do título bacharel em Odontologia, sob orientação da Prof. Dra. Angela Kinoshita.

Banca examinadora:



Handwritten signature in blue ink, appearing to read "Angela Kinoshita", written over a horizontal line.

USC-2007

**A Deus**

**DEDICO**

*Nos piores momentos de minha vida, quando imaginava estar caminhando sozinho, porque observava nas pegadas deixadas na areia a presença de somente dois passos, estava na verdade, sendo carregado nos braços dele.*

**Ao meus amigos**

**DEDICO**

*Os amigos é a resposta aos meus desejos, mas não os procurei para matar o tempo. Procurei-os sempre para as horas vivas, porque eles preenchem a minha necessidade, mas não o meu vazio.*

**Aos colegas da faculdade**

**DEDICO**

*“Para estar junto não é preciso estar perto, e sim lado de dentro.”*

*Leonardo da Vinci*

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

À **USC**, a universidade exelente que me faz amar a Odontologia e transformou-m em cirurgiã dentista.

À minha orientadora, Professora Doutora **Angela Kinoshita**, pela confiança e compreensão em mim e por excelência, sempre nos incentivou com orientação segura para desempenharmos com muito afinco a tarefa abordada.

Ao Professor Doutor **Sérgio A. Catanzao Guimarães**, pela colaboração importante na realização deste trabalho, carinho, sabedoria e conhecimento.

Aos **todos professores**, pela imensa sabedoria, capacidade, dedicação e paciência no ensino, depositados desde o início do curso.

**“ Eu aprendi que para se crescer como pessoa, preciso me cercar de gente mais inteligente que eu”**

*William Shakespeare*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Ms. **Gustavo Campos Belmonte**

*Pelo colaboração e apoio na execução deste trabalho.*

À Profa. Dra. **Mariza Akeme Matsumoto**

*Pela atenção e por indicar um caminho iluminado nos momentos difíceis.*

Aos técnicos **Maira Cristina Rondia Couto e Wilson Orcini**

*Pelo minucioso trabalho de preparo das lâminas.*

Ao funcionário **Sérgio**, do biotério

*Pela imensa ajuda nos procedimentos cirúrgico e cuidados diários com os animais.*

Aos amigos **Cibele, Leandro e Tatiana**

*Pelo apoio e colaboração nos procedimentos cirúrgicos, e por dividir suas experiências científicas.*

Aos amigos **Danielle e Samuel**

*Pelo grande auxílio na pesquisa bibliográfica, correção metodológica deste trabalho, e pelo apoio moral.*

Ao **Departamento de Física e Matemática da FFCLRP/USP**

*Por ceder os reagentes utilizados no preparo dos géis utilizados neste trabalho*

*A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.*

***Há homens que lutam um dia e são bons.  
Há outros que lutam um ano e são melhores.  
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.  
Porém, há os que lutam toda a vida.  
Esses são os imprescindíveis."***

**Bertolt Brecht**

***O futuro tem muitos nomes: para os fracos, ele é inatingível; para os temerosos, ele é desconhecido; para os corajosos, ele é a chance.***

**Vitor Hugo**



## RESUMO

A cicatrização óssea em lesões de grande magnitude como as produzidas por traumas, infecções, tumores, continua sendo um grande desafio à ciência. Ossos autógenos têm sua utilização limitada por fatores como a pouca disponibilidade e a necessidade de uma área doadora, fonte de outros problemas ao paciente. A busca de novos materiais substitutos para o preenchimento e para auxílio da reparação óssea continua sendo um grande tema de pesquisa em materiais. Neste contexto, este trabalho consiste no estudo da membrana da Quitina e do gel de Quitosana e suas associações como a Proteína Morfogenética Óssea (BMP) e Hidroxiapatita (HA) como proposta para uso futuro como material de enxerto na Odontologia e Ortopedia. Dados na literatura indicam que tanto a Quitosana quanto a BMP possuem o potencial de regeneração óssea, isso gera um interesse do estudo da biocompatibilidade e do potencial osteogênico do gel de Quitosana incorporado a BMP e HA, contribuindo na busca de novos materiais alternativos de baixo custo que auxiliem ou acelerem os tratamentos que envolvam reconstituição do tecido ósseo. Os testes de biocompatibilidade e potencial osteogênico foram realizados *in vivo*, em camundongos, no Biotério da Universidade do Sagrado Coração. Cada animal recebeu implante intramuscular na coxa de 1 ml de gel , e foram sacrificados 15 dias após a cirurgia. Posteriormente, foram realizadas análises macroscópica e microscópica da região de implante. A análise histológica demonstrou que a membrana de Quitina não é biocompatível, pois houve a formação de granuloma tipo corpo estranho, e o gel de Quitosana agregado a Hidroxiapatita e BMP apresenta atividade angiogênica moderada, indicando atividade celular acentuada, provavelmente de natureza reparadora, isso demonstram a viabilidade deste composto como um novo material de enxerto ósseo.

**Palavras-chave:** Quitosana, BMP, Biocompatibilidade, Potencial osteogênico,

## ABSTRACT

Bone healing of injuries of great magnitude as the ones produced by traumas, infections and tumors are still a big challenge to science. Autogenous bones have their use limited by factors such as little availability and the necessity of a donating area, which are source for other problems to the patient. The search for new materials for fulfillment and aid to bone regeneration continues to be a subject of research in materials. Thus, this work consists of study of the membrane of Quitine and the Chitosan gel associated with the morphogenetic protein (BMP) and hydroxilapatite (HA) as a proposal for future use as material for grafts in Dentistry and Orthopedics. According to information found in literature, the chitosan gel and the BMP possess the potential for bone regeneration. This fact generates interest for the studying of the chitosan gel incorporated to BMP and HA, contributing to the search for new alternative materials with low cost that can accelerate treatments that involve osseous tissue reconstitution. The biocompatibility and the osteogenic potential tests were carried *in vivo* on mice of the Biotery of the Universidade do Sagrado Coração (USC). Each animal received a one-milliliter intramuscular graft of gel in the thigh, and was sacrificed 15 days after surgery. Afterwards, macro and microscopic analyses of the grafted region were realized. After histologic analysis, the results showed that the membrane of Quitine is not biocompatible because of the formation of a foreign body granuloma while the chitosan gel associated with hydroxilapatite and BMP presents low angiogenic activity that indicates stressed cellular activity, probably due to a reparation nature, demonstrating its viability as a new material for osseous grafts.

**Key-word:** Chitosan, BMP, Biocompatibility, Osteogenic potential.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODO.....	30
3.1 Gel de Quitosana e Associação.....	30
3.2 Membrana de Quitina.....	31
3.3 Teste de Biocompatibilidade.....	32
3.4 Teste de Pontencial Osteogênico.....	32
3.5 Procedimento Cirúrgico.....	32
3.5.1 Anestesia.....	32
3.5.2 Procedimento Cirúrgico para Teste de Biocompatibilidade.....	33
3.5.3 Procedimento Cirúrgico para Pontencial Osteogênic.....	39
3.6 Forma de Análise dos Resultados.....	43
.	
4. RESULTADOS.....	45
4.1 Análise Macroscópica.....	45
4.2 Análise Microscópica.....	46
4.2.1 Teste de Biocomaptibilidade da Memebrana de Quitina.....	46
4.2.2 Teste de Potencial Osteogênico.....	49
5. DISCUSSÃO.....	55
6. CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

*I  
N  
T  
R  
O  
D  
U  
Ç  
Ã  
O*

## 1 INTRODUÇÃO

As estratégias atuais na engenharia tecidual estão focadas na restauração de tecidos patologicamente afetados através do transplante de células em um meio de suporte e biomoléculas. Com isso, diversas pesquisas em Biomateriais são voltadas ao desenvolvimento e aprimoramento destes meios de suporte bem como em sistemas liberadores de fármacos. Dentre os biomateriais estudados, a Quitosana vem sendo amplamente estudada por suas importantes propriedades relacionadas a estes propósitos como a mínima imunogenicidade, ser naturalmente antibactericida, poder ser moldado em diferentes geometrias e ter porosidade, permitindo o crescimento de células (MARTINO et al., 2005).

A Quitosana é um derivado desacetilado da Quitina, o segundo biopolímero natural mais abundante, de alto peso molecular, encontrado em crustáceos. A Quitosana é um polissacarídeo linear, composto de glucosamina e N-acetil glucosamina. Dependendo da fonte e o procedimento de extração, seu peso molecular pode variar de 300 a mais de 1000kDa, com grau de desacetilação de 30 a 95%. Em sua forma cristalina, a Quitosana é normalmente insolúvel em solução aquosa com pH superior a 7, entretanto, em meio ácido (pH<6), esta molécula torna-se solúvel, possibilitando a formação de géis (PARK et al., 2005). A versatilidade da quitosana em gel possibilita a associação com substâncias bioativas, para posterior liberação, fazendo-o atuar como um sistema liberador de fármacos.

Na engenharia tecidual óssea, vários estudos foram realizados focando o uso da quitosana em associação com Fosfato de Cálcio e Trifosfato de Cálcio (TCP) (ZHANG & ZHANG. 2001; ZHANG & ZHANG. 2002) e outros no desenvolvimento de compostos incorporando Hidroxiapatita (KAWAKAMI et al. 1992; KIM et al. 2004) e

KONG et al. 2005; KAWAKAMI et al. 1992) estudaram *in vivo* o efeito da associação Quitosana-Hidroxiapatita sobre a tíbia de coelhos após a remoção do periósteo e verificaram a formação de um osso induzido pelo Biomaterial.

Além da Hidroxiapatita, atualmente sabe-se que as Proteínas Morfogenéticas Ósseas (BMPs) estimulam o crescimento e o reparo ósseo. O processo de estimulação de crescimento ósseo dentro do corpo é conhecido como osteoindução. Um dos pioneiros na ciência da osteoindução foi Marshall Urist, Professor Emérito do Departamento de Cirurgia de Ortopedia em UCLA School of Medicine. Há mais de 35 anos atrás, Urist descobriu que proteínas que direcionavam o osso a se reparar estavam contidas na própria matriz do osso. Somente na última década, por meio de técnicas moleculares, identificou-se uma família de proteínas morfogenéticas estruturalmente relacionadas, contendo seqüências de aminoácidos homólogas às proteínas do Fator de Crescimento Transformador-beta (TGF-beta) (GONÇALVES et al., 1998). O uso de BMPs em procedimentos reconstrotores para a indução da osteogênese representa uma alternativa para enxertos ósseos autógenos e aloimplantes. Recentemente, Warnke e colaboradores (WARNKE et al., 2004) demonstraram a geração de um “osso secundário”, para uso em uma cirurgia reconstrutiva de uma parte da mandíbula, a partir de fragmentos de osso associado à medula óssea do paciente e a BMP 7.

Para um efeito osteoindutor efetivo, as proteínas morfogenéticas, por serem rapidamente difusíveis e solúveis em água, precisam ser implantadas com um carreador apropriado. Segundo Sheeherman & Wozney (2005), estes carreadores para BMPs devem ser apropriados para aumentar a retenção destes fatores de crescimento no sitio de tratamento ortopédico ou odontológico por um período suficiente para permitir a migração, proliferação e diferenciação das células

relacionadas ao reparo ósseo no local lesionado. Estes carreadores devem servir também como um meio de suporte para infiltração celular, mantendo o volume do local onde o reparo ósseo deve ocorrer. Outras características importantes destes meios é que eles devem ser biocompatíveis e, preferencialmente, absorvíveis. As quatro maiores categorias de carreadores de BMPs já existentes englobam os polímeros naturais, materiais inorgânicos, polímeros sintéticos e compostos (combinação) destes materiais. A quitosana encontra-se na primeira categoria.

Park et al. (2005) desenvolveram e testaram um gel de quitosana injetável com a proposta de ser utilizado como um biomaterial substituto do osso. Neste gel, foram associados o Alginato, células tronco mesenquimais e BMP-2. Este composto foi injetado no dorso de ratos, a fim de se verificar a formação de osso. Os animais implantados foram examinados durante um período de 12 semanas. Na região do implante, verificou-se, histologicamente a formação de um novo osso e concluíram que o gel de quitosana, nesta associação, pode atuar como um material bioativo para a formação óssea.

Dentro deste panorama, este trabalho consiste do estudo da biocompatibilidade e do potencial osteogênico dos géis de Quitosana associados à Hidroxiapatita (HA) e a Proteína Morfogenética Óssea (BMP), como proposta para uso futuro como material para enxerto ósseo.

Este trabalho tem como objetivo o estudo da biocompatibilidade e do potencial osteogênico de géis de Quitosana associados à Proteína Morfogenética Óssea (BMPs) e a Hidroxiapatita (HA), em diferentes composições, como proposta para uso futuro como material para enxerto ósseo. A biocompatibilidade de um filme de Quitina, material que origina a Quitosana, também foi avaliada.

*R  
E  
V  
I  
S  
Ã  
O  
  
D  
E*

*L  
I  
T  
E  
R  
A  
T  
U  
R  
A*



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

O tecido ósseo é o constituinte principal do esqueleto, serve de suporte para as partes moles e conformação do corpo, protege órgãos vitais, como os contidos nas caixas craniana e torácica e no canal raquidiano. Local de armazenamento de íons e fosfato, forma um sistema de alavancas que, movimentadas pelos músculos, permite o deslocamento do corpo.

Segundo Junqueiro e Carneiro (1999), o tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e material extracelular calcificado, que é denominado de matriz óssea. Existe três tipo de células específicas na matriz óssea, que são os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos.

Os osteoblastos surgem a partir de células mesenquimais e são responsáveis pela formação osso (osteogênese). Os tecidos que, em princípio originam os osteoblastos são a medula óssea, o perióstio, o endóstio e a membrana periodontal. Os osteoblastos revestem as superfícies ósseas; sintetizam e exportam os contituíntes orgânicos das matriz óssea, inclusive o colágeno do tipo I e os proteoglicanos sulfatados. (KESSEL, 2001). Eles também são capazes de concentrar o fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz. Os osteoblastos variam sua forma morfológica em cada diferente fase. Quando em intensa atividade de síntese, são cubóides, com citoplasma bastante basófilo. Porém, em estado pouco ativo, tornam-se achatados e a basofilia citoplasmática diminui. (JUNQUEIRO & CARNEIRO 1999.)

Quando os osteoblastos depositam osso sobre superfície preexistente, estes são finalmente circundados por matriz óssea e são chamados de osteócitos. Os corpos celulares do osteócitos residem em espaços chamados de lacunas, que são especialmente evidentes no desgaste do osso, nos quais os osteócito são removidos.

A medida que os osteoblastos são circundados por matriz intracelular, estes produzem muitas extensões digitiformes longas e delgadas ou gavinhas que entram em contato com os osteócitos. Isso resulta na formação de muitos pequenos canais, chamados de canaliculos, que estendem por toda a matriz óssea e criam um sistema circulatório canalicular que fornece nutrição aos osteócitos. (KESSEL, 2001).

Os osteoclastos são células móveis, gigantes, extensamente ramificadas, com partes dilatadas que contêm 6 a 50 ou mais núcleos. São encontrados nos tecidos mineralizados e são responsáveis por reabsorver o tecido ósseo, participando do processo de remodelação dos ossos. Frequentemente, nas áreas de reabsorção, encontram-se porções dilatadas dos osteoclastos, colocadas em depressões da matriz escavadas pela ação enzimática e conhecidas como lacuna de Howship. Os osteoclastos se originam de precursores mononucleados provenientes da origem óssea que, em contato com o tecido ósseo, se unem para formar os osteoclasto multinucleares. (JUNQUEIRO & CARNEIRO 1999)

Há ainda, uma população de células derivadas do mesênquima, chamada de células osteoprogenitoras, que podem proliferar e se diferenciar em osteoblastos em alguns casos. As células osteoprogenitoras estão presentes por toda a vida pós-natal e podem ser encontradas sobre as superfícies ósseas. Estas células são ativadas durante as fraturas ósseas e são envolvidas no seu reparo. (KESSEL, 2001)

Ainda segundo o Kessel (2001), a qualidade mecânicas especiais que permitem ao osso servir como um tecido conjuntivo de sustentação são devido a natureza das substância intercelular ou extracelular, que contêm componentes orgânicos e inorgânicos.

Quase 90% da matriz orgânica do osso é formada por colágeno, principalmente colágeno tipo I, responsável pela coloração acidófila. 10% do conteúdo orgânico são

constituídos por proteína e glicoproteína, bem como sulfato de heparano e ácido hialurônico. O colágeno permite ao osso resistir à tensão, ao passo que o componente mineral permite ao osso sustentação à compressão (KESSEI, 2001).

A parte inorgânica do tecido ósseo representa cerca de 50% do peso da matriz óssea, (JUNQUEIRO & CARNEIRO.1999.). O produto mineral do osso é semelhante à hidroxiapatita cristalina  $[Ca_{10}(PO_4)_3OH]$ , e os depósitos minerais se formam em íntima relação com a matriz de colágenos. Fosfato de cálcio não cristalino está presente na matriz óssea, assim como íons de citrato e bicarbonato, íons flureto, magnésio, potássio e sódio. (KASSEL, 2001). Os íons da superfície do cristal de hidroxiapatita são hidratados, existindo, portanto, uma camada de água e íons em volta do cristal. Essa camada, denominada capa de hidratação, facilita a troca de íons entre o cristal e o líquido intersticial. (JUNQUEIRO & CARNEIRO 1999.)

As superfícies ósseas são revestidas por células osteogênicas e tecido conjuntivo, que constituem o perióstio e endóstio.

O perióstio é mais celular e apresenta células osteoprogenitoras que multiplicam por mitose e se diferenciam em osteoblastos, desempenhando papel importante no crescimento dos ossos e na reparação das fraturas. Apresenta fibras de Sharpey, que são feixes de fibras colágenas do perióstio que penetram no tecido ósseo e unem firmemente o perióstio ao osso. O endóstio é geralmente constituído por uma camada de células osteoprogenitoras achatadas, revestem as cavidades do osso esponjoso, o canal medular, os canais de Havers e os de Volkmann.

As principais funções do endóstio e perióstio são a nutrição do tecido ósseo e o fornecimento de novos osteoblastos, para o crescimento e a recuperação do osso.

Existem dois tipos de tecido ósseo, o imaturo ou primário e o maduro, lamelar ou secundário. O tecido ósseo primário é menos freqüente nos adultos, encontrado

apenas próximo às suturas dos ossos do crânio, nos alvéolos dentários e em alguns pontos de inserção de tendões. O tecido ósseo primário apresenta fibras colágenas dispostas em várias direções, sem organização definida. Tem menor quantidade de minerais e maior porcentagem de osteócitos do que o tecido ósseo secundário (JUNQUEIRA & CARNEIRO 1999).

O tipo de tecido ósseo secundário geralmente é encontrado no adulto, possui fibras colágenas organizadas em lamelas de 3 a 7 $\mu$ m de espessura, que ficam paralelas umas às outras. (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999) Esse tecido possui menos osteócitos, e estes estão dispostos mais regularmente e em lacunas mais achatados no osso maduro, comparando-se com osso primário. (KESSEL, 2001)

Na diáfise dos ossos, as lamelas ósseas se organizam em arranjos tópicos, constituindo os sistemas de Havers. Cada sistema de Havers é constituído por cilindros longos, paralelos à diáfise e formados por quatro a vinte lamelas ósseas concêntricas. No centro desses cilindros ósseos existe um canal, denominados de canais de Havers, que nele contém vasos e nervos. (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999.)

O tecido ósseo é formado ou por um processo chamado de ossificação intramembranosa, que ocorre no interior de uma membrana conjuntiva, ou pelo processo de ossificação endocondral. Este último se inicia sobre um molde cartilaginoso, a partir de células do conjuntivo adjacente.

Através da ossificação intramembranosa, forma-se a maioria dos ossos chatos, maxila e mandíbula etc. Existe dois requisitos importantes, que são a presença de células mesenquimais e de uma área extensamente vascularizada. (KESSEL, 2001).

As células mesenquimais se diferenciam em osteoblastos que secretam a matriz óssea, formando uma rede de espículas e trabéculas. Esta região de osteogênese

inicial é conhecida como centro primário de ossificação. A calcificação segue-se rapidamente à formação do osteóide, e os osteoblastos aprisionados nas suas matrizes se transformam em osteócitos. Assim que se estabelece uma rede de trabéculas em forma de esponja, o tecido conjuntivo vascular, nos seus interstícios, é transformado em medula óssea (GARTNER & HIATT, 1999).

Regiões dos tecidos mesenquimais que permanecem não calcificados diferenciam-se no periósteeo e endósteeo do osso em desenvolvimento (GARTNER & HIATT, 1999).

A ossificação endocondral é o método que emprega a formação dos ossos longos e curtos, que ocorre em duas etapas. Inicialmente, forma-se um pequeno molde de cartilagem hialina. A seguir, o molde de cartilagem continua a crescer e serve como base para o desenvolvimento do osso. (GARTNER & HIATT, 1999.)

Na etapa do molde, a cartilagem hialina é depositada segundo o formato do osso requerido, sendo posteriormente substituída por deposição de osteóide e mineralização. A cartilagem hialina se origina a partir de uma massa de tecido mesenquimatoso imaturo e assume a forma aproximada osso.

Em seguida, uma camada de células mesenquimais, os condroblastos e algumas células osteoprogenitoras circundam o modelo de cartilagem hialina e forma o pericôndrio. Mais tarde, à medida que as células osteogênicas suplantam os precursores dos condroblastos, formando uma camada denominada de periósteeo (STEVENS & LOWE., 2004.)

Na porção média da diáfise, as células osteoprogenitoras se transformam em osteoblastos e depositam osteóide, o qual se mineraliza, formando um colar ósseo ao redor de diáfise. Ao mesmo tempo, os condrócitos no modelo de cartilagem se multiplicam de maneira a aumentar em comprimento e largura. (STEVENS & LOWE.,

2004.)

As células osteoprogenitoras no centro de ossificação se transformam em osteoblastos e começam a depositar osteóide, o qual progressivamente substitui a cartilagem calcificada do modelo original. (STEVENS & LOWE., 2004.)

Entretanto, as alterações estruturais do tecido ósseo nos seres humanos, podem ter início durante a vida intra-uterina sendo definido como alterações ósseas congênitas. E também devido a fatores extrínsecos que podem ocorrer ao longo da vida como as alterações ósseas adquiridas. Essas alterações na região maxilofacial podem ser decorrentes de acidentes, tumores, reabsorções após extração dentárias, manobras cirúrgicas iatrogênicas e doenças periodontais.

No entanto, o processo alveolar, na ausência de dentes, sofre uma reabsorção fisiológica, (MADEIRA, 1995) e a perda óssea decorrente de doenças periodontais, podem dificultar o tratamento odontológico necessário. Para recuperar a perda óssea, o uso de enxerto ósseo tornou-se o caminho mais favorável.

Segundo Gomes (2002), é cientificamente conhecido que o melhor material de enxerto é o osso autógeno, devido às suas propriedades biológicas e à ausência de rejeição. No entanto, existem inconvenientes como: hospitalização, necessidade de anestesia geral, maior risco de infecção, maior período de convalescência e necessidade de uma área doadora. Fatores que dificultam este procedimento fazem necessário o desenvolvimento e a produção de substitutos ósseos, sintéticos ou biológicos.

Durante a história, na área médico-odontológico, incansáveis pesquisas são desenvolvidas à procura por substâncias naturais ou sintéticas que pudessem substituir tecidos corpóreos, moles ou duros, perdidos. Antigos registros nos mostram o uso do sulfato de cálcio, marfim, osso seco, ouro, fio de ouro, ligas de prata, entre

outros materiais. (GOMES, 2002).

Ainda segundo Gomes (2002), atualmente, graças ao grande desenvolvimento tecnológico dos biomateriais e avanço dos métodos e dos conhecimentos da fisiologia óssea tornou-se possível influenciar seletivamente a formação óssea controlando a qualidade e quantidade de osso no interior das estruturas bucais. Existem no mercado odontológico inúmeros biomateriais, sintéticos ou biológicos, com tamanho variável de partículas e principalmente classificados quanto ao seu modo de ação: osteoindução, osteocondução ou osteogênese.

Entre os vários biomateriais, as Proteínas Morfogenética Ósseas (BMPs) são amplamente usadas. É um material que estimula o crescimento e reparo ósseo (GONÇALVES et al,1998). Lynch et al (1991) afirmaram que uma série de fatores envolvidos como dose de BMPs, local da implantação, respostas das células no local de implante, vascularização e natureza do material carreador, seriam os fatores reponsáveis pela determinações do tipo de ossificação.

As BMPs têm importante papel no direcionamento e transformação de células, ou seja, a presença de BMP induz uma célula a transformar-se em outra. Elas estimulam as células osteoblastos e inibem a diferenciação da linhagem de mioblasto. (VUKICEVIC et al., 1989; KATAGIRI et al., 1994; YAMAGUSHI et al, 1991). Sommernan et al, 1983 também afirmaram que BMPs são glicoproteínas responsáveis pelo recrutamento de células osteoprogenitoras para os locais de formação óssea.

A atividade osteoindutiva das BMPs somados à presença no tecido ósseo sugerem que elas são importantes reguladores no processo de reparação óssea e podem estar envolvidas na manutenção destes tecidos. As BMPs fazem parte de família de fator de crescimento transformator beta (TGF- $\beta$ ) e inclui uma subfamília,

baseadas em sua seqüência de aminoácidos. As BMPs podem se apresentar sob duas formas: a) proteína morfogenética óssea derivado do osso; b) proteína morfogenética óssea humanas recombinantes (rhBMP) (WONZNEY, 1998)

A proteína morfogenética óssea humanas recombinantes (rhBMP) quando implantada em altas doses pode induzir a formação óssea (WANG et al. 1990).

Segundo o Bowers e Reddi, (1992), as BMPs são proteínas encontradas em altas concentrações em tecido ósseo e são consideradas as responsáveis pela habilidade indutiva e regenerativa dos enxertos ósseos desmineralizados, usadas em terapia periodontal. Com as palavras do outro autor, Bowers et al, (1991), o uso de BMPs associadas ao enxerto desminelarizado seco e congelado (DFDBA), com matriz óssea aumenta significativamente a regeneração dos aparatos de nova inserção e componentes teciduais, tais como: cimento, osso alveolar e ligamento periodontal.

Além o uso de BMP na área periodontal, as pesquisas demonstram que um sucesso das proteínas morfogenéticas ósseas nas cirurgias buco-maxilo-facial e ortopédicas, apresentam um eficácia na indução óssea (SALLER & KOLB, 1994).

Segundo Ripamonti e Reddi, (1994), as BMPs podem ser utilizadas em reparação de tecidos dentais. Nakashima, (1990), constatou que as BMPs estimularam mitoses de células mesenquimais e induziram a diferenciação de de osteodentinócitos através do implante de BMP sobre polpas dentárias amputadas de animais.

O outro biomaterial bastante usado em engenharia tecidual, é a Quitosana. Ela apresenta importantes propriedades relacionadas estes propósitos, tais como possui mínima imunogenicidade, é naturalmente antibactericida, pode ser moldada em diferentes geometrias e é porosa, permitindo a permeabilidade das células ósseas.



Auxilia na diferenciação das células osteoprogenitoras e também, de modo geral, facilita a formação óssea. (MARTINO et al. 2005). A Quitosana é um polímero natural derivado do processo de desacetilação da Quitina (CAMAPANA-FILHO & DESBRIÈRES, 2000), o segundo biopolímero natural mais abundante, encontrado em crustáceos marinhos. Em sua forma cristalina é normalmente insolúvel em meios com pH superior a 7. No entanto, em meio ácido, esta molécula torna-se solúvel, possibilitando a formação de géis (PARK et al. 2005).

In-Sam et al, (2002), realizou um experimento sobre fraturas de mandíbula de cães. Verificou que após quatro semanas de implantação da Quitosana, na área da lesão começaram a acumular os tecidos fibrosos e uns poucos números de osteoblastos puderam ser observados nas margens, e depois de sete semanas, grande número de osteoblastos com osso neoformados foram observados. Em outro trabalho, também foi demonstrada a indução óssea pela Quitosana associada com Cálcio e Fosfato (CP) sobre a tíbia do coelho (ZANG, et al. 2001.)

Além da capacidade de regeneração óssea, a Quitosana acelera a cicatrização, apresenta efeito coagulante e efeito analgésico.

Em outro trabalho, foi demonstrado que as células tratadas, apresentaram aumento da atividade do lisozima extracelular, o que estimula a formação de tecidos conjuntivos. N-acetilglucosamina é o maior componente do epitélio e sua presença é essencial na reparação tecidual das feridas (RAVI KUMAR, 2000). Além disso, feridas tratadas com Quitosana mostraram menor grau de fibroplasia, favorecendo a reepitelização com formação de cicatriz lisa. (SINGLA, 2001.)

A Quitosana ainda é papel importante na hemostasia. (SINGLA, 2001.) A ação da Quitosana sobre plaqueta é a estimulação da liberação do fator de crescimento derivado de plaquetas-AB (PDGF-AB) e fator de transformação do crescimento- $\beta$ (TGF- $\beta$ ). São

citocinas liberadas pela plaquetas, que desempenham importante papel no processo de coagulação e cicatrização. (OKAMOTO, et al. 2003.)

A outra propriedade tópica da Quitosana é analgesia. Segundo Okamoto, et al. (2003), principal efeito analgésico da Quitosana é decorrente da captura de hidrogênio ácidos liberados durante o processo inflamação, pela ionização do grupo amoníaco, a  $NH_3^+$ . A bradicina é um mediador químico liberado pelo cininigênio plasmático e outros citocinas, como Fator de Necrose Tumoral $\alpha$  (FNT $\alpha$ ) e as Interleucinas 1 (IL-1) e 8 (IL-8), que são os fatores em produção da dor no local inflamado. A Quitosana tem a propriedade de absorver a bradicinina liberada no sítio da inflamação.

A utilização de biomateriais no reparo de partes danificadas do tecido ósseo tem revolucionado a ortopedia e odontologia atuais. O emprego de substâncias químicas que facilitam a reparação óssea, através da osteogênese, osteoindução e osteocondução, é alvo de pesquisas constantes. (BORGES, 1998; FRANCO, et al. 2001; LEGENO, 2002)

Um dos fatores mais importante que podem determinar o sucesso ou fracasso dos biomateriais idutores em cirurgias reconstrutiva é a eficiência do material carreador. O carreador deve ser absorvido à medida que ocorre a formação óssea. Além disso, deve ser seguro, biodegradável, biocompatível e formulado para permitir tamanhos e formados adequados. (TORIUMI & ROBERTSON, 1993.) Essas características dependem das propriedades físicas e químicas do material, que devem ser compatíveis com as reações fisiológicas do osso. (BORGES, 1998.)

A biocompatibilidade é um termo que abrange vários aspectos do material, incluindo desde suas propriedades físicas, mecânicas e químicas até seu potencial citotóxico, alergênico e mutagênico, não apresentando efeitos tóxicos ou causando

injúrias na função biológica. (COSTA, 2001.)

Poucos materiais (ou nenhum) são totalmente inertes do ponto de vista fisiológico, visto que a grande maioria apresenta uma variedade de componentes tóxicos ou irritantes. Além disso, as substâncias química que foram adicionadas durante o processo da confecção do material, podem também produzir o efeitos indesejáveis. (ANUSAVICE, 2004)

Até que a biocompatibilidade do material seja comprovada, o mesmo deve ser submetido a diversos estudos variando desde análise *in vitro* até testes *in vivo*. No teste *in vitro* avaliam-se as propriedades do material diretamente em cultura de células que reagem aos efeitos de protudos analisados. O teste *in vivo*, baseia-se na avaliação tecidual de animais que receberam implantes no tecido subcutânea e intramuscular de um material com potencial de causar toxicidade sistêmica, por instalação, irritação da pele, entre outras respostas. Segundo Anusavice, 2004, quando um material, produto ou componente tóxico é identificado, ele pode ser substituído, diluído ou neutralizado para reduzir o nível de toxicidade ou reação biológico.

Minnen et al. (2005) estudaram a biocompatibilidade do poliuretano biodegradável *in vitro* e *in vivo*. Nos estudos *in vivo*, o material foi implantado no dorso (subcutâneo) de ratos e a resposta tecidual foi histologicamente avaliada durante o período de 1 a 12 semanas. Nesta avaliação, foram avaliados os seguintes parâmetros, atribuindo “scores” de acordo com o observado:

Tabela 1: Parâmetros e “scores” adotados em teste de Biocompatibilidade

Parâmetro	Score
Necrose	existente ou não
Espessura de tecido fibroso	número de células em camadas
Número de células inflamatórias	
Células polimorfonucleares <sup>1</sup>	0 – 4
Macrófagos <sup>1</sup>	0 – 4
Células Gigantes <sup>1</sup>	0 – 4
Crescimento de células no material implantado	
Tecido Conjuntivo <sup>2</sup>	0 – 4
Tecido com vascularização	existente ou não
Material Implantado	
Sinais de decaiação <sup>3</sup>	0 – 4
Células com atividade fagocitária <sup>1</sup>	0 – 4

<sup>1</sup>Número de células variando de poucas (0) ou em grande quantidade (4)

<sup>2</sup>Crescimento tecidual variando de nenhum (0) a infiltração total na área (4)

<sup>3</sup>Sinais de degradação, variando de nenhuma (0) a degradação do centro do material (4)

Fonte: Minnen et al. (2005)

Inclusive, além de testar a biocompatibilidade dos biomateriais, há autores que investigaram sistematicamente a biocompatibilidade do cimento do fosfato de cálcio por meio de implante em fêmur do coelho, e verificaram que o material é biocompatível podendo ser aplicado em humanos. (LIU et al. 1997)

Materiais não compatíveis podem mostrar-se mutagênicos ou ainda influenciar mediadores da inflamação, provocando respostas sistêmicas, incluindo toxicidade, teratogênias ou efeitos carcinogênicos (ANUSAVICE, 2004).

Lemmons & Natiella, (1986), concluíram que as propriedades funcionais e a biocompatibilidade são questões básicas no desenvolvimento dos biomateriais e salientaram que existem várias metodologias para analisar essas propriedades, entretanto, em todos os casos, o hospedeiro humano tem sido o teste final.

*M*  
*A*  
*T*  
*E*     *M*  
*R*     *É*  
*I*     *T*  
*A*     *O*  
*I*     *D*  
*S*     *O*

### **3 Materiais e Métodos**

#### **3.1 Gel de Quitosana e associação**

O Gel de Quitosana foi preparado em colaboração com o Departamento de Física e Matemática, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da USP – Ribeirão Preto e da Universidade Federal de Rio Grande do Norte (UFRN), que cedeu a Quitosana. Foram desenvolvidos dois compostos a partir do gel de Quitosana e Alginato, para serem testados em relação a Biocompatibilidade.

Para obtenção do gel de Quitosana, foram utilizados 0,5g de Quitosana, diluídos em 50ml de água e 20 gotas de ácido acético. O gel de Alginato foi preparado utilizando-se 0,5g de Alginato de Sódio e 10ml de água.

O Composto 1 foi preparado utilizando-se o Gel de Alginato associado a 5ml do Gel de Quitosana e 0,458g de Hidroxiapatita Bio-absorvível (Baumer®). O pH deste composto foi de 5,96 (Figura 1A). Esta Hidroxiapatita, segundo o seu fabricante, é uma biocerâmica sintética de alta pureza, possui estrutura macro e microscópica semelhante ao osso humano que, aliada ao elevado grau de pureza, resulta em um material com grande potencial osteocondutor.

O Composto 2 foi preparado utilizando-se o Gel de Alginato, 5ml do gel de Quitosana, 1,5g de Carbonato de Cálcio diluído em 5ml de água. O pH desta associação foi de 7,2. (Figura 1B).

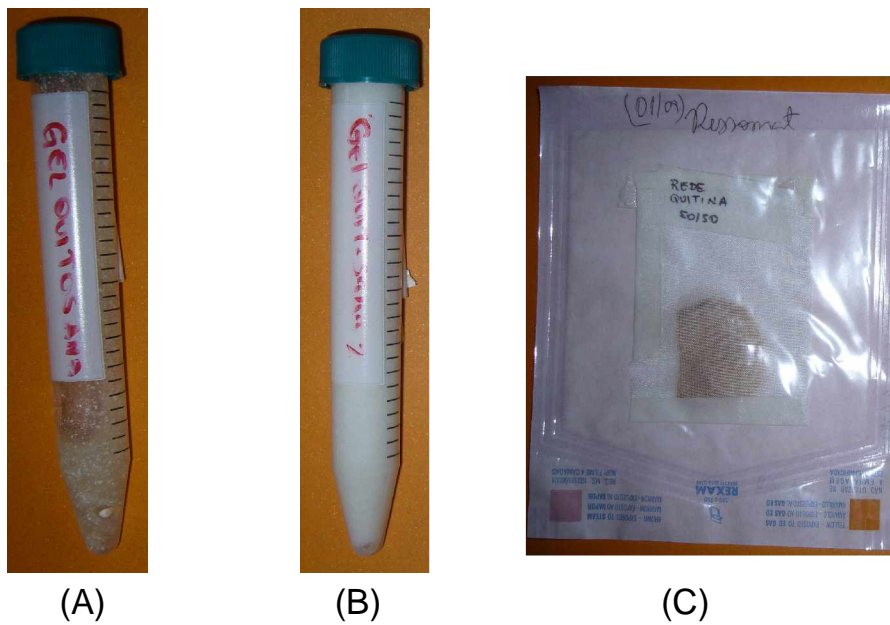
Para o teste do potencial osteogênico, ao Composto 1, foram agregados 150mg de BMP (Proteína Morfogenética Óssea) do fabricante Baumer®.

O preparo dos materiais foi realizado utilizando-se materiais esterilizados e materiais descartáveis.

### 3.2 Membrana de Quitina

Uma membrana de Quitina foi cedida pela UFPR para teste de Biocompatibilidade (Figura 1C). Esta membrana foi esterilizada com Óxido de Etileno, no Hospital de Clínicas da FMRP-USP.

**Figura 1: Materiais implantados para estudo da Biocompatibilidade. (A) Composto 1, (B) Composto 2 e (C) Membrana de Quitina.**



Fonte: Lee Chen Tzu

### **3.3 Teste de Biocompatibilidade**

O teste de Biocompatibilidade foi realizado *in vivo*, em camundongos, de acordo com procedimento cirúrgico descrito a seguir.

Foram utilizados 24 camundongos, divididos em 3 grupos de 8 animais. No primeiro grupo foi implantado o Composto 1, no segundo o Composto 2 e, no terceiro, foi implantado um filme de Quitina.

### **3.4 Teste de Potencial Osteogênico**

O teste de Potencial Osteogênico foi realizado *in vivo*, em camundongos, de acordo com o procedimento cirúrgico descrito a seguir. Foram utilizados 5 camundongos para implante do Composto 3.

### **3.5 Procedimentos cirúrgicos**

As cirurgias foram realizadas no Biotério da Universidade do Sagrado Coração, após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa. Durante todo o período de preservação, os animais receberam dieta balanceada padrão, do Biotério, e água *ad libitum*.

#### **3.5.1 Anestesia**

Para realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram submetidos à anestesia geral com administração da medicação pré-anestésica de relaxante muscular (Diazepan), na dose de 0,1ml por animal (intraperitoneal), seguido pela injeção de cloridrato de Cetamina e Xilasina, associados numa relação de 1:1, com dose de 0,1 ml/100g de peso corpóreo (Figura 2).



### 3.5.2 Procedimento Cirúrgico para Teste de Biocompatibilidade

Após os procedimentos de anestesiados, os animais foram submetidos à tricotomia da região a ser operada (dorso) (figura 3) e a região passou pelo processo de assepsia com PVPI (polivinilpíloridona) tópico (Figura 4). Realizou-se uma incisão linear no dorso do animal, de aproximadamente 1cm, com tesoura reta (figura 5). Após a divulsão dos tecidos (figura 6), o material foi implantado (figura 7A, 7B e 7C), e suturado com fio de seda, logo a seguir (figura 8).

Após 15 dias, os animais implantados com a membrana de quitina foram eutanasiados com dose letal do mesmo anestésico utilizado na cirurgia. A região do material implantado foi coletado e fixado em formol 10% para confecção de lâminas histológicas. Após 30 dias, os animais implantados com os compostos de quitosana foram sacrificados e o mesmo procedimento foi adotado (figura 9A, 9B e 9C).

**Figura 2: Anestesia do animal**



Fonte: Fotografada pela Cibele Ereno

**Figura 3: Tricotomia**



Fonte: Fotografada pela Cibele Ereno

**Figura 4: Anti-sepsia com PVPI**



Fonte: Fotografada pela Cibele Ereno

**Figura 5: Incisão no dorso do animal**



Fonte: Fotografada pela Cibele Ereno

**Figura 6: Divulsão da pele**



Fonte: Fotografada pela Cibele Ereno

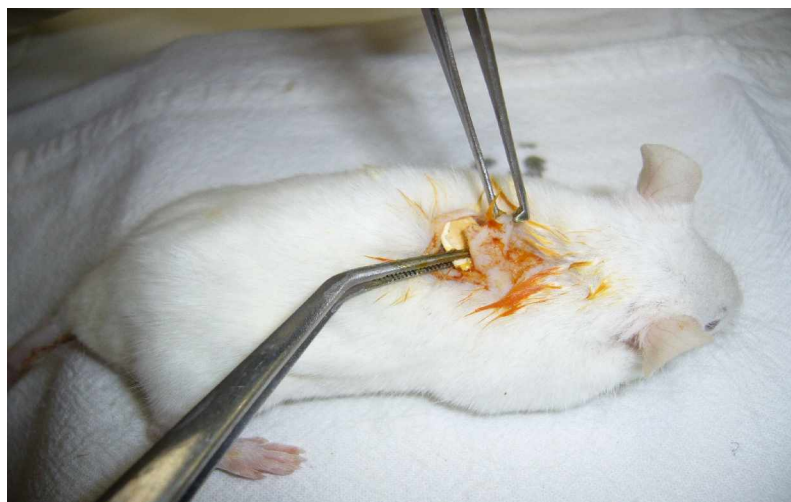
**Figura 7: Implante dos materiais (A) composto 1 de Quitosana (B) composto 2 de Quitosana e (C) Membrana de Quitina**



(A)



(B)



(C)

Fonte: Fotografada pela Cibele Ereno

**Figura 8: Sutura**



Fonte: Fotografada pela Cibele Ereno

**Figura 9: Material coletado (A) Composto 1 de Quitosana, (B) Composto 2 de Quitosana e (C) Membrana de Quitina**



(A)



(B)

(C)



Fonte: Fotografada pela Cibebe Ereno



### 3.5.3. Procedimento Cirúrgico para teste de Potencial Osteogênico

Após os procedimentos de anestesia, os animais foram submetidos à tricotomia da região a ser operada (coxa) (figura 10) e a região passou pelo processo de assepsia com PVPI (polivinilpiloridona) tópico. Realizou-se uma incisão linear na coxa do animal, de aproximadamente 1cm, com tesoura reta (figura 11). Após a divulsão dos tecidos (figura 12), o material (Composto 3) foi implantado (figura 13) e logo após procedeu-se a sutura planas dos tecidos intramuscular (figura 14) e subcutâneo (figura 15), com fio de seda 4-0.

Após 15 dias, os animais foram eutanasiados com dose letal do mesmo anestésico utilizado na cirurgia. A região com o material implantado foi coletada e fixado em formol 10% para confecção de lâminas histológicas.

**Figura 10: Tricotomia**



Fonte: Fotografada pela Lee Chen Tzu

**Figura 11: Incisão linear**



Fonte: Fotografada pela Juliana S. Polido

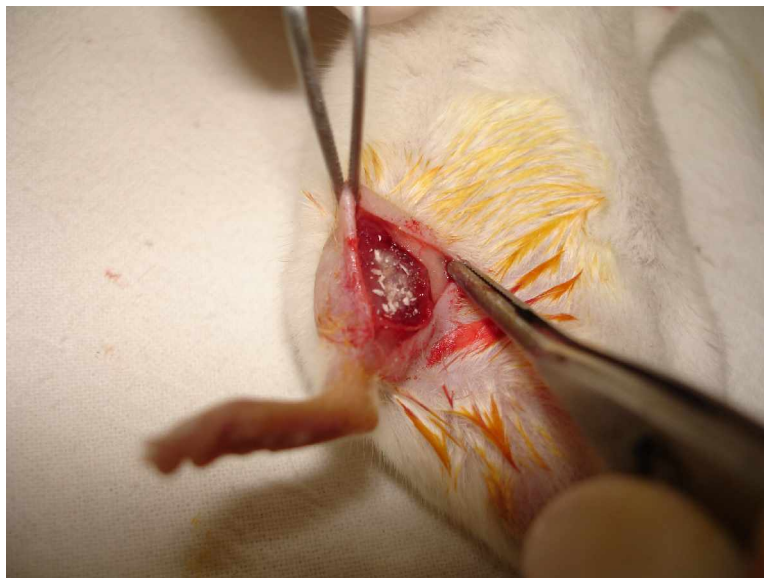
**Figura 12: Divulsão dos Tecidos**



Fonte: Fotografada pela Juliana S. Polido



**Figura 13: Implante do Material**



Fonte: Fotografada pela Juliana S. Polido

**Figura 14: Sutura do tecido muscular**



Fonte: Fotografada pela Juliana S. Polido

**Figura 15: Sutura**



Fonte: Fotografada pela Lee Chen Tzu

### 3.6 Forma de Análise dos resultados

Os materiais coletados nos dois experimentos foram analisados macroscopicamente nas suas dimensões e coloração. A seguir, as peças foram fixadas em formol a 10% por 92 horas. Os cortes microscópicos foram obtidos no sentido longitudinal com 6 $\mu$ m de espessura e corados pelos métodos da Hematoxilina/eosina e Tricômico Masson.

Os cortes microscópicos foram analisados e descritos em todas as suas peculiaridades. Foram selecionados e fotografados, os dados mais relevantes, no próprio microscópio. As lâminas foram fotografadas no fotomicroscópio Nikon H550L, adquiridos com recursos do projeto FAPESP 03/09503-3 sob responsabilidade do Prof. Dr. Sérgio A. Catanzaro Guimarães. As imagens digitais captadas foram analisadas pelo software Image Pro-Plus. (figura 16)

**Figura 16: Microscópio óptico Nikon H550L Micro Publisher 3.3 RTU Equipamentos Eletrônicos Ltda.**



Fonte: Fotografada pela Angela Kinoshita

*R  
E  
S  
U  
L  
T  
A  
D  
O  
S*

## 4 Resultados

### 4.1 Análise Macroscópica

A figura 17 mostra o material coletado do implante subcutâneo do Composto 1. A figura 18, do Composto 2 e a figura 19, da Membrana de Quitina

**Figura 17: Material coletado do implante subcutâneo do composto 1 de Quitosana**



Fonte: Fotografada pela Cibele Ereno

**Figura 18: Material coletado do implante subcutâneo do composto 2 de Quitosana**



Fonte: Fotografada pela Cibele Ereno

**Figura 19: Material coletado do implante subcutâneo da membrana de Quitina**



Fonte: Fotografada pela Cibele Ereno

Através das figuras 17 e 18 podemos notar que os materiais composto 1 e composto 2 foram absorvidos pelo organismo do animal. Com isso, as análises microscópicas não puderam ser feitas, pois nesta análise há a necessidade de se ter os tecidos junto ao material implantado.

A figura 19 mostra que a membranas de Quitina, permaneceu intacta no corpo do animal, possibilitando a análise microscópica.

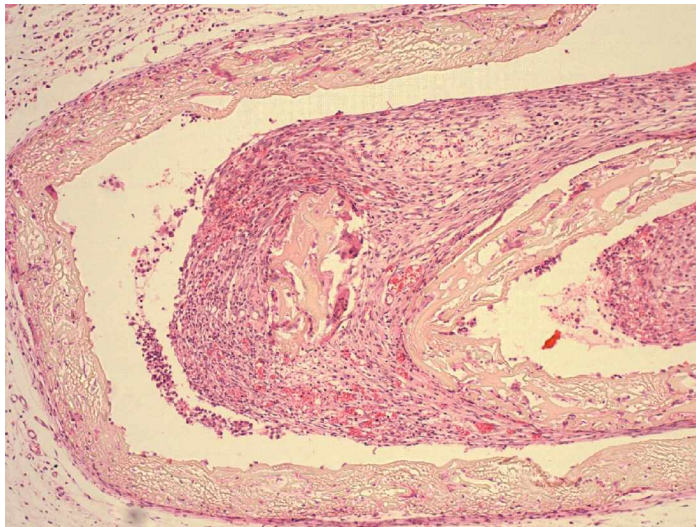
## **4.2 Análise Microscópica**

### **4.2.1 Teste de Biocompatibilidade da Membrana de Quitina**

A figuras 20 mostra lâminas histológica, corada com HE, do material coletado do subcutâneo do camundongo implantado com membrana de Quitina, 15 dias após a cirurgia. As figuras 21 e 22, referem-se às lâminas do material coletado 30 dias após a cirurgia, corados com método Tricrômico de Masson.

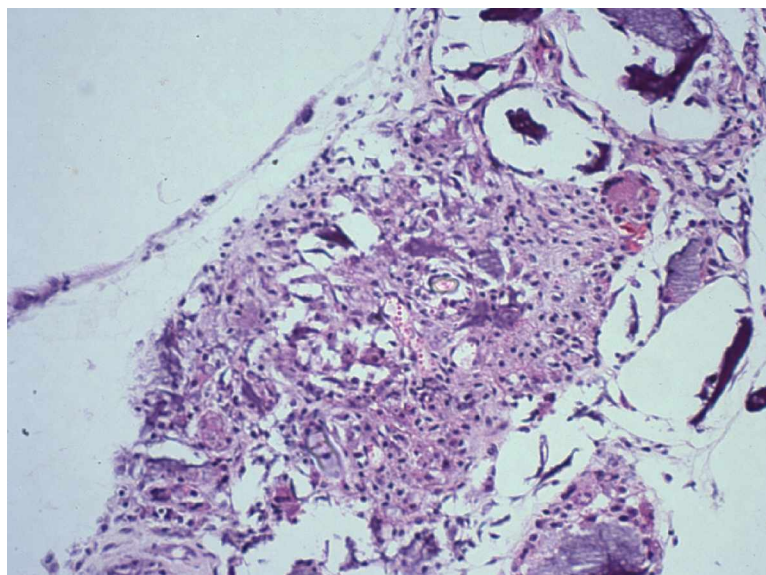


**Fig.20: Lâmina Histológica do material coletado da cirurgia de implante membrana de Quitina após 15 dias. Coloração HE, aumento 4X.**



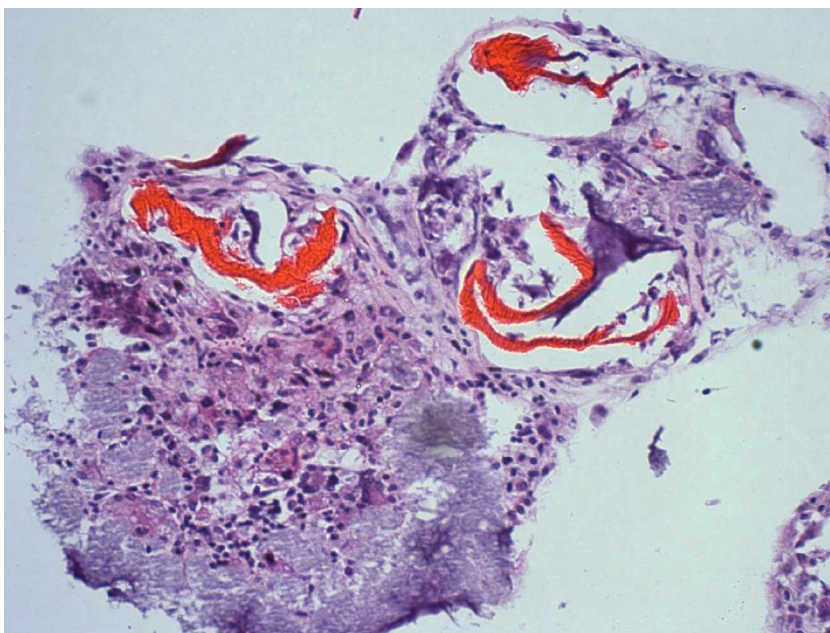
Fonte: Fotografada pela Lee Chen Tzu

**Fig.21: Lâmina Histológica do material coletado da cirurgia de implante membrana de Quitina após 30 dias. Coloração Tricrômico de Masson, aumento 10X.**



Fonte: Fotografada pela Lee Chen Tzu

**Fig.22: Lâmina Histológica do material coletado da cirurgia de implante membrana de Quitina após 30 dias. Coloração Tricrômico de Masson, aumento 10X.**



Fonte: Fotografada pela Lee Chen Tzu

As lâminas referentes ao período de 15 dias de implantação (figura 20) mostram reação inflamatória crônica tipo corpo estranho contornando o material. A densidade celular em torno do material implantado é grande. Os elementos celulares predominantes são monócitos (macrófagos), linfócitos, células gigantes inflamatórias e, em menor proporção, neutrófilos. Além desta composição celular observa-se também, grande atividade angiogênica e áreas hemorrágicas dispersas na estrutura fibro-vascular inflamatória. Várias células gigantes podem ser vistas em contato com o material implantado.

Após 30 dias de implantação (figura 21), nota-se tecido fibrovascular inflamatório com predominância de monócitos (macrófagos). Várias células gigantes são observadas em contato ou nas proximidades do material implantado.

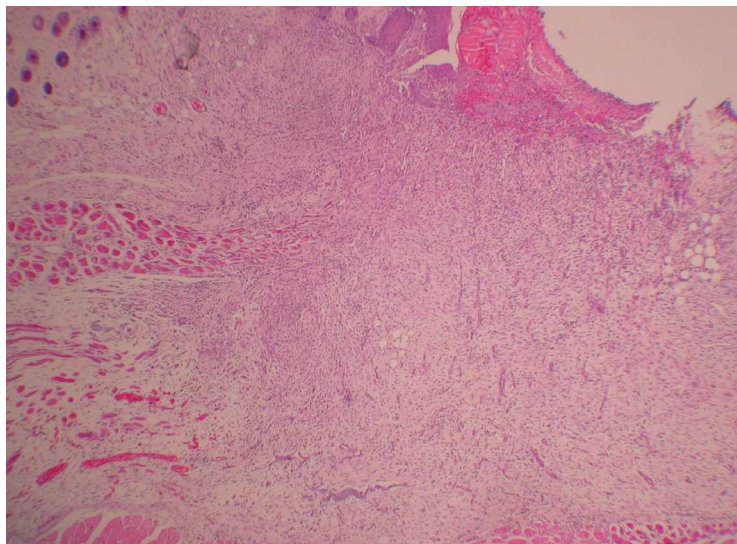


Na lâmina da figura 22 nota-se inúmeras células gigantes em contato com o material implantado. As células gigantes repousam sobre a estrutura fibro-vascular, definindo um autêntico granuloma tipo corpo estranho. O material eosinófilo observado na parte superior representa material fibrinóide precipitado em contato com membrana de Quitina, ou seja, necrose fibrinóide.

#### 4.2.2 Teste de Potencial Osteogênico

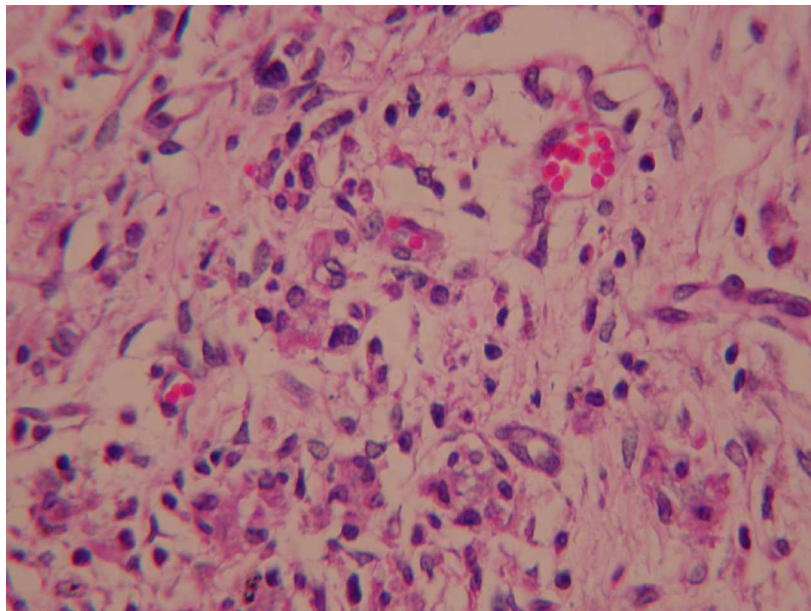
As figuras 23, 24 e 25 mostram fotomicrografias das lâminas contendo o material cirúrgico coletado 15 dias após o implante do composto 3 (gel de Quitosana associado a BMP e Hidroxiapatita).

**Fig.23: Lâmina Histológica do material coletado da cirurgia de implante do composto 3 (gel de Quitosana) 15 dias após. Coloração HE, aumento 4X**



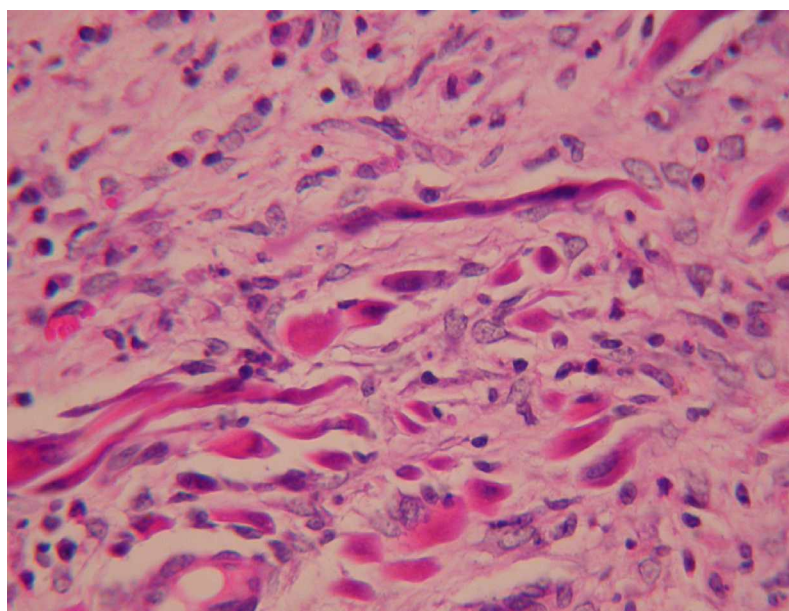
Fonte: Fotografada pela Lee Chen Tzu

**Fig.24: Lâmina Histológica do material coletado da cirurgia de implante do composto 3 (gel de Quitosana) 15 dias após. Coloração HE, aumento 40X**



Fonte: Fotografada pela Lee Chen Tzu

**Fig.25: Lâmina Histológica do material coletado da cirurgia de implante do composto 3 (gel de Quitosana) 15 dias após. Coloração HE, aumento 40X**



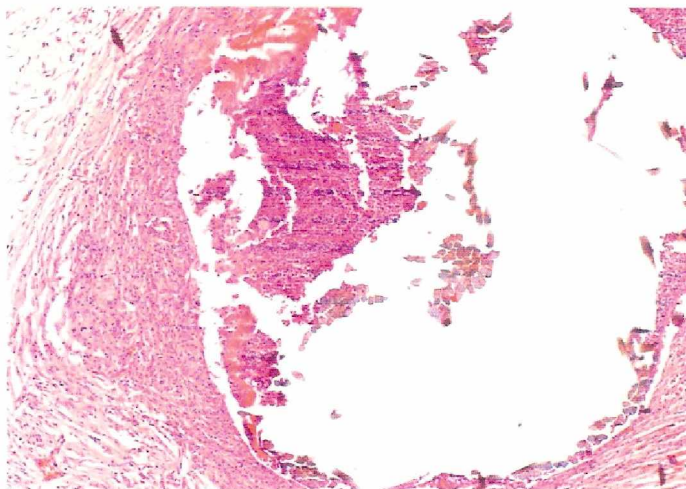
Fonte: Fotografada pela Lee Chen Tzu

Na figura 23 nota-se a presença de tecido de granulação que formou-se para impedir que o gel se difundisse para os planos teciduais mais profundos. Observa-se também áreas vacuolisadas dentro do tecido de granulação, provavelmente representada pelo gel de quitosana.

Na figura 24, nota-se um tecido de granulação abundante envolvendo grande parte do fragmento tecidual no qual se nota macrófagos com citoplasma amplo e rico em material fagocitado, provavelmente o gel de quitosana. Nota-se também atividade angiogênica moderada indicando atividade celular acentuada, provavelmente de natureza reparadora. Áreas de miolise são freqüentemente observadas no seio do tecido de granulação indicando fase de intensa destruição tecidual. Próximo às áreas de miolise, nota-se proliferação de miocélulas indicando atividade regeneradora (figura 25).

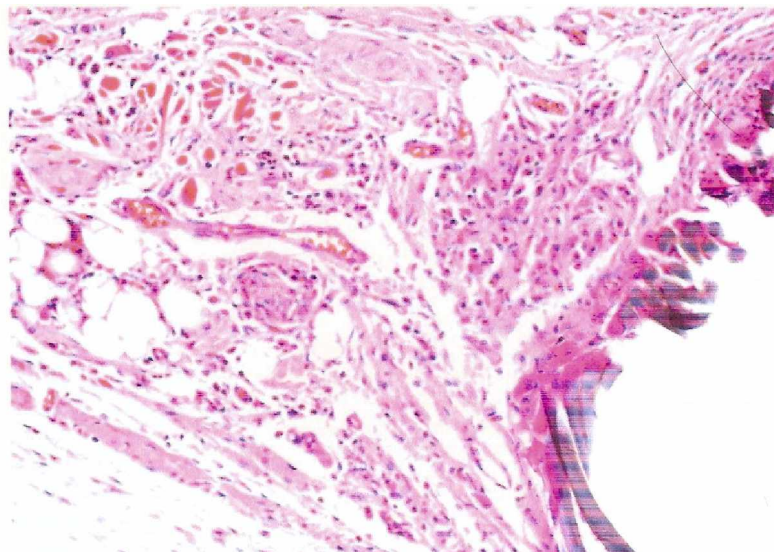
Nas figuras 26 e 27 mostram fotomicrografias das lâminas contendo o material cirúrgico coletado 30 dias após o implante do composto 3.

**Fig.26: Lâmina Histológica do material coletado da cirurgia de implante do composto 3 (gel de Quitosana) 30 dias após. Coloração HE, aumento 10X**



Fonte: Fotografado pelo Dr. Sérgio C. Guimarães

**Fig.27: Lâmina Histológica do material coletado da cirurgia de implante do composto 3 (gel de Quitosana) 30 dias após. Coloração HE, aumento 20X.**



**Fonte:** Fotografado pelo Dr. Sérgio C. Guimarães

Na figura 26 nota-se a presença do material implantado, na forma de partículas escuras, envolvidas por neutrófilos. Na sua periferia estende-se uma faixa tecidual com estrutura de granuloma tipo corpo estranho

Na figura 27, nota-se as células gigantes em contato com o material implantado. Observa-se também o granuloma tipo corpo estranho mostra tendência ao amadurecimento com aumento de fibras colágenas e redução dos componentes celulares.

*D  
I  
S  
C  
U  
S  
S  
Ã  
O*

## 5 Discussão

A regeneração de tecido ósseo é um tema de grande interesse na Odontologia e na Medicina. As pesquisas atuais na engenharia tecidual óssea baseiam-se no implante de células associadas a meios de suporte e biomoléculas.

Devido ao desenvolvimento tecnológico dos biomateriais é possível substituir os enxertos autógenos diante dos seus inconvenientes.

Dentre as biomateriais, a Quitosana têm sido amplamente estudada por apresentar características relevantes a estas aplicações como mínima imunogenicidade, ser naturalmente antibactericida, poder ser moldada em diferentes geometrias e apresenta porosidade, permitindo o crescimento de células, atuando, assim, como material osteocondutor, além de seu baixo custo.

As Proteínas morfogenética Óssea (BMPs), de acordo com a literatura é um material osteoindutor, que estimulam o crescimento e o reparo ósseo (GONÇALVES et al., 1998), foi usada como reconstituidores para a indução da osteogênese representando uma alternativa para enxertos ósseos autógenos e aloimplantes (WARNKE, 2004). As BMPs são glicoproteínas responsáveis pelo recrutamento de células osteoprogenitoras para os locais de formação óssea (SOMMERNAN et al, 1983).

Dados da literatura revelam que ambos os materiais possuem o potencial de regeneração óssea. No âmbito científico há uma grande motivação e interesse no estudo da biocompatibilidade e do potencial osteogênico do gel de Quitosana e suas associações, contribuindo na busca de uma alternativa devido o baixo custo e também, no anseio de encontrar novos materiais que auxiliem ou acelerem os tratamentos que envolvam reconstituição do tecido ósseo (MARTINO et al.



2005; .PARK et al. 2005).

O presente trabalho foi realizado em modelo animal, utilizando camundongos nos experimentos, procurando analisar a osteoindução em defeitos criados no músculo da coxa, bem como a biocompatibilidade em subcutâneo. Também foi estudada a biocompatibilidade da membrana de Quitina, do qual se deriva a Quitosana.

Os resultados referentes a biocompatibilidade da Quitina mostram que este material, da forma que foi empregada, levou a reações inflamatórias indesejáveis. Houve a formação de granuloma tipo corpo estranho.

Os resultados referentes ao implante intramuscular do gel de Quitosana associado a BMP e Hidroxiapatita (composto 3) apontam que este material resultou em atividade angiogênica moderada indicando sinais de natureza reparadora, 15 dias após o implante. Os resultados histológicos 30 dias após o implante demonstram que o gel de quitosana não é totalmente biocompatível, pois verificou-se a formação de granuloma tipo corpo estranho. Porém em comparação com a Quitina, o gel de Quitosana demonstrou melhor biocompatibilidade, pois o implante da Quitina pelo mesmo período resultou em necrose tecidual. Apesar da associação com BMPs e Hidroxiapatita, materiais já conhecidos como osteoindutores, não foi verificada a formação óssea neste período. O tratamento químico da quitosana, como a desacetilação de mais de 90%, bem como a preservação dos animais por períodos superiores a 30 dias provavelmente devem contribuir para o resultado positivo no teste de potencial osteogênico.

C  
O  
N  
C  
L  
U  
S  
Ã  
O



## **6 Conclusão**

Os experimentos demonstraram que a membrana de Quitina não é biocompatível pois houve a formação de granuloma tipo corpo estranho. O gel de Quitosana agregado a Hidroxiapatita e BMP tem potencial para ser um novo material de enxerto.

*R  
E  
F  
E  
R  
Ê  
N  
C  
I  
A*

## Referências

ANUSAVICE, K. J. *Philip's Science of Dental Materials*. 11 ed. Philadelphia: Saunders, 2004.

BORGES, A. B. P. *O efeito da hidroxiapatita sintética na regeneração óssea de defeito provocado experimentalmente no terço proximal da tíbia de cães: estudo clínico-cirúrgico, radiológico e histológico por microscopia de luz e microscopia eletrônica de retrodisperção*. 1998. 112f. Tese de Doutorado. Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

BOWERS, G. (et al.). Histologic comparison of regeneration in human intrabony defects when osteogenin is combined with desmineralized freeze-dried bone allograft and with purified bovine collagen. *J Periodontol*, n.62, p.690-702. 1991.

BOWERS, G. M.; REDDI, A. H. Regeneration of the periodontium in advanced periodontal disease. *J Am Dent Assoc.*, 1992.

CAMPANA-FILHO, S. P.; DESBRIÈRES, J. Chitosan and derivatives. In: FROLLINI, E. *Embrapa Instrumentação Agripecuárias*. São Carlos: USP-Instituto de Química de São Carlos; UNESP-Faculdade de Ciências Agrônômicas, 2000. p.41-71.

COSTA, C. A. S. Teste de citotoxicidade em culturas de células. In: ESTRELA, C. *Metodologia Científica*. Ensino e Pesquisa em Odontologia. São Paulo: Arte Médica, 2001.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. *Tratado de Histologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

GOMES, L. A. *Implantes Ossointegrados*. São Paulo: Santos, 2002.

GONÇALVES, E.A.L.; GUIMARÃES, S.A.C.; GARCIA, R.B. Proteínas morfogenéticas ósseas: terapêutica molecular no processo de reparo tecidual. *Revista Odontologica Universidade de São Paulo*, v.12, n. 3, p. 299-304, jul./set. 1998.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

KESSEL, R.G. *Histologia Médica Básica - A Biologia das células, tecidos e órgãos*.  
Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

LEMMONS, J.; NATIELLA, J. Biomaterial, biocompatibility and peri-implant consideration. *Dent. Clin. North Am.*, Philadelphia, E.U.A, v.30, n.1, p.3-23, jan. 1986.

LIU, C. (et al) Revolution of the biocompatibility of a nonceramic hydroxyapatite. *J. Endod.*, Philadelphia, v.23 n.8, p.490-493. 1997.

LYNCH, S. (et al). Effect of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factor on periodontal wound healing. *J Periodontol*, n.62, p.458-67. 1991.

MADEIRA, M. C. *Anatomia da face-Bases anátomo-funcionais para a prática odontológica*. São Paulo: Sarvier, 1995.

MARTINO, A.; SITTINGER, M.; RISBUD, M.V. Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials*, v.26 p.5983-5990. 2005.

NAKASHIMA, M. The induction of reparative dentine in the amputated dental pulp of dog by bone morphogenetic protein. *J Arch Oral Biol.*, n.35 ,p.493-7.1990.

OKAMOTO, Y. (et al.) Carbohydr. *Polym.*54,537, 2003.

PARK, D.J. (et al.) Injectable bone using chitosan-alginate gel/mesenchymal stem cells/BMP-2 composites. *Journal of Crânio-Maxillofacial Surgery*, v.33, , p.50-54, mês. 2005.

RAVI KUMAR, M. N. V., *React. Funct. Polym.*, 46.1, 2000.

RIPAMONTI, U; REDDI, A. H. Periodontal regeneration: potencial role bone morphogenetic protein. *J Periodontal Res*,n.29, p.225-35, 1994.

SAILER, H. S.; KOLB, E. Application of purified bone morphogenetic protein (BMP) in cranio-maxillo-facial surgery. BMP in compromised surgical reconstruction using titanium implants. *J Craniomaxillofac Surg*, n.22, p.2-11. 1994.

SANTOS, A. A. (et al.) O papel da proteína morfogenética óssea na reparação do tecido ósseo. *Acta Ortop. Bras.* São Paulo, v. 13, n. 4, 2005. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-78522005000400009&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-78522005000400009&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em: 28 jun 2007.

SINGLA, A. K.; CHAWLA, M. *J Pharm. Pharmacol.* n.53, p.1047. 2001.

SOMMERNAN, M. (et al.) Identification of bone matrix-derived chemotactic factor. *Calcif Tissue*, n.35, p.481-5.1983.

STEVEN, A., LOWE, J.S. *Histologia Humana*. 2 ed. São Paulo: Manole, 2004.

TORIUMI, D. M., ROBERTSON, K. Bone Inductive biomaterials in facial plastic and reconstructive surgery. *Facial Plastic Surg*, n.9, p.29-36.1993.

WANG, E. A. (et al.). Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci USA.*, n.87, p.2220-4.1990.

WONZNEY, J. M. The bone morphogenetic protein family: multifunctional cellular regulators in the embryo and adult. *Eur J Oral Sci*, n.106, p.160-166,. 1998.

ZHANG, T.; ZHANG, M. Synthesis and characterization of macroporous chitosan/calcium phosphate composite scaffolds for tissue engineering. *Journal Biomedical Material Research*, v.55, p.304-312, 2001.