

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS PATOS - PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

Análise histológica da utilização de quitosana e β -trifosfato de cálcio
na regeneração óssea de coelhos

Guilherme Neves Porto

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS PATOS - PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

Análise histológica da utilização de quitosana e β -trifosfato de cálcio
na regeneração óssea de coelhos

Guilherme Neves Porto

Graduando

Prof. Dr. Marcelo Jorge Cavalcanti de Sá

Orientador

Patos

Abril de 2013

FICHA CATALOGRÁFICA
De acordo com AACR2, CDU, CUTTER
Biblioteca Setorial do CSTR/UFCG – Campus de Patos - PB

G956a
2013

Porto, Guilherme Neves

Análise histológica da utilização de quitosana e β -trifosfato de cálcio na regeneração óssea de coelhos /
Guilherme Neves Porto – Patos - PB: CSTR/UFCG/UAMV,
2013.

24 f.: Il

Inclui bibliografia

Orientador: Marcelo Jorge Cavalcanti de Sá

Monografia (Graduação em Medicina Veterinária),
Universidade Federal de Campina Grande. Centro de Saúde e
Tecnologia Rural.

1 – Cirurgia Ortopédica Veterinária. 2 - Pequenos
Animais. 3 - Biomateriais. 4 – Coelhos I – Título.

CDU: 617:619

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

GUILHERME NEVES PORTO
Graduando

Monografia submetida ao Curso de Medicina Veterinária como requisito parcial
para obtenção do grau de Médico Veterinário.

ENTREGUE EM...../...../.....

MÉDIA: _____

BANCA EXAMINADORA

_____ Prof. Dr. Marcelo Jorge Cavalcanti de Sá	Nota _____
_____ Prof. Msc. Adílio Santos Azevedo	Nota _____
_____ Dr. José Rômulo Soares dos Santos	Nota _____

Dedico este trabalho à minha
família e amigos que todos os
dias me deram forças para chegar
até o final desse curso.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por me permitir realizar essa conquista em minha vida.

Aos meus pais, Francisco e Maria, pelo dedicação, amor e educação. Exemplos de vida e de pessoas maravilhosas que sempre se preocuparam comigo e meus irmãos mais do que com eles. Meu porto seguro em todas as idas e vindas.

Aos meus irmãos, Gustavo e Danilla pelo companheirismo.

A minha namorada, Isabela, por todo o carinho e me compreender.

A meus amigos de turma, em especial a Piêtro, Tardelli, Thiago, Christiano, Amaral, Maíra, Liliane pelas noites de estudo, brincadeiras e que mostraram ser amigos de verdade quando precisei, me dando conselhos, atenção e força. E amigos que não são da turma, Elias e Amós que foram os melhores amigos durante esse período e espero que ainda sejamos no futuro. Também a Ariana, Jade, Marta e aos amigos de João Pessoa, Leandro, Victor, Eddy, Igor, Felipe, Gabriel e Kelbson.

Ao professor Marcelo, por ter me orientado.

Aos membros da banca Adílio, que me aconselhou bastante nessa monografia e Rômulo, que além de grande amigo também me ajudou muito. Obrigado por aceitarem fazer parte da banca examinadora da minha monografia.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Tecido ósseo	12
2.1.1 Componentes	12
2.2 Histogênese óssea	13
2.2.1 Ossificação Intramembranosa	13
2.2.2 Ossificação endocondral	13
2.3 Regeneração óssea	13
2.4 Quitosana	14
2.5 β -Trifosfato de cálcio	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Procedimento cirúrgico	17
3.2 Microscopia de luz e avaliação histológica	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5 CONCLUSÃO	22
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: aos 45 dias: A – grupo controle (obj.: 4x); B – grupo quitosana (obj.: 4x); C – grupo trifosfato de cálcio (obj.: 4x); D – grupo quitosana + trifosfato de cálcio (obj.: 4x). Bola preta indica local da osteotomia. Notar neoformação óssea maior em B, C e D em comparação com A.....18

Figura 2: aos 90 dias: A – grupo controle (obj.: 4x); B – grupo quitosana (obj.: 4x); C – grupo trifosfato de cálcio (obj.: 4x); D – grupo quitosana + trifosfato de cálcio (obj.: 4x). Bola preta indica local da osteotomia. Notar neoformação óssea maior em B, C e D em comparação com A.....19

RESUMO

PORTO, GUILHERME NEVES. Análise histológica da utilização de quitosana e β -trifosfato de cálcio na regeneração óssea de coelhos. 23P. Trabalho de Conclusão de Curso – Monografia (Curso de Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Patos, 2013.

Objetivou-se, com este trabalho, realizar uma avaliação interfacial entre o osso e o implante pro meio da análise histológica. Os animais foram acondicionados em gaiolas separadas e após o período de adaptação foram iniciados os procedimentos cirúrgicos. Foram feitas duas osteotomias em cada tíbia e em cada animal, cada lesão recebeu o tratamento: Controle, Quitosana, β -trifosfato de cálcio e a associação desses últimos dois materiais, sendo que cada coelho terá todas os tratamentos citados. Após o fim da cirurgia, os animais foram separados em dois grupos: um grupo que foi eutanasiado aos 45 dias e outro aos 90 dias. Feito a eutanásia, foram extraídas das tíbias as porções onde foram feitas as lesões para a confecção de lâminas histológicas e assim foi feita a visualização da regeneração óssea e compará-la ao grupo Controle.

Palavras - Chaves: biomateriais, ortopedia, cirurgia

ABSTRACT

PORTO, GUILHERME NEVES. Histological analysis of the use of chitosan and calcium β -triphosphate in the regeneration of bone in rabbits. 23p. End of course work – Monograph (Veterinary Medicine Course). Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Patos, 2013.

The objective of this study was to conduct an interfacial assessment between bone and implant by histologic analysis. The animals were housed in separate cages and after the adaptation period the surgical procedures were initiated. Two osteotomy were performed in each tibia and in each animal, the lesions received the following treatments: Control, chitosan, β -calcium triphosphate and the association of the latter two materials, each of which will rabbit all of the above treatments. After the end of surgery, the animals were divided into two groups: one group was euthanized at day 45 and another at day 90. After the euthanasias, portions of injured tibias were extracted to the fabrication of histological slides and so was made the visualization of bone regeneration and compare it to the Control group.

Key - Words: biomaterials, orthopedics, surgery

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a associação da cirurgia com a engenharia de materiais vem sendo crescente, com o objetivo de desenvolver terapias capazes de maximizar e acelerar processos regenerativos de tecidos orgânicos sem provocar efeitos adversos aos pacientes, sendo essa associação profissional chamada de engenharia de tecidos.

A quitosana é obtida da quitina, que é o segundo biopolímero mais abundante na natureza e vem ganhando destaque em pesquisas médicas nos últimos anos (KHAN e PEH, 2003), por ser um material biocompatível, atóxico e biodegradável (SENEL e McCLURE, 2004). Várias pesquisas apontam sua capacidade em estimular a osteogênese sem causar danos à matriz óssea (WANG et. al. 2002)

O β -trifosfato de cálcio (β -TCP) é uma cerâmica granulada sintética, reabsorvível feita a partir de Hidróxido de Cálcio (Ca(OH)_2) e Ácido Fosfórico (H_3PO_4). É um material biodegradável e biocompatível. já utilizado com sucesso no preenchimento de defeitos e extensão de contornos do tecido ósseo (SHAREEF et. al. 1993; MARTIN e BROWN 1995; SIVAKUMAR et. al. 1996; PEREIRA et. al. 1999; FELÍCIO-FERNANDES e LARANJEIRA, 2000; BILLOTTE, 2000).Dentre suas propriedades mais atraentes, estes materiais não mostraram toxicidade local ou sistêmica, nenhuma resposta a corpos estranhos ou inflamações, e aparente capacidade de unir-se aos tecidos do hospedeiro (KAWACHI et. al. 2000).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia da quitosana, β -TCP isolados e associados, na regeneração do tecido ósseo de coelhos para analisar sua diminuição da consolidação do tecido em questão.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tecido ósseo

O tecido ósseo é uma forma especializada de tecido conjuntivo, cuja matriz óssea é constituída de componentes orgânicos e inorgânicos. O primeiro representa aproximadamente 35% do peso seco do osso e é constituído principalmente por fibrilas de colágeno tipo I. A porção inorgânica representa cerca de 65% do peso seco sendo composta por sais de cálcio e fosfato na forma de hidroxiapatita (GARTNER e HIATT, 1999).

2.1.1 Componentes

2.1.1.1 Osteoblastos

Os osteoblastos são as células que sintetizam a parte orgânica (colágeno tipo I, proteoglicanas e glicoproteínas) da matriz óssea. São capazes de concentrar fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz. Uma vez aprisionado pela matriz recém-sintetizada, o osteoblasto passa a ser chamado de osteócito (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

2.1.1.2 Osteócitos

São osteoblastos incorporados na matriz óssea mineralizada durante a osteogênese. Estas células possuem longas projeções citoplasmáticas no interior de canalículos intercomunicantes, que constituem uma rede de comunicação entre as células e a superfície óssea, sendo responsáveis pela manutenção da matriz (ROSS et. al. 1993; GARTNER e HIATT, 1999; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

2.1.1.3 Osteoclastos

São as células exclusivas de reabsorção óssea. É uma célula multinucleada com muitos lisossomas e é rica em enzimas hidrolíticas. A ação de reabsorção dos osteoclastos desencadeia a remodelagem constante do osso, que é uma parte normal da manutenção do esqueleto (RUBIN et. al. 2006).

2.1.1.4 Matriz óssea

A matriz óssea compõe-se de duas partes. A inorgânica, composta de grande quantidade de íons fosfato, cálcio, de pequena quantidade de magnésio, potássio, sódio, citratos e bicarbonato. O cálcio e o fósforo formam os cristais de

hidroxiapatita. A parte orgânica da matriz é formada por fibras colágenas (95%) e por pequena quantidade de substância fundamental amorfa (colágeno tipo 1). A associação de hidroxiapatita com fibras colágenas é responsável pela dureza e resistência do tecido ósseo. A mineralização consiste na deposição de íons inorgânicos, principalmente o fosfato de cálcio (SALGADO, 2002).

2.1.1.5 Endóstio e perióstio

O endóstio possui células de formação e reabsorção óssea ou formas em repouso dessas células, capazes de serem ativadas em resposta a estímulos apropriados. O perióstio é uma membrana de tecido conjuntivo denso com menos número de células e algumas com capacidade de diferenciar-se em osteoblastos sob estímulos apropriados (ROSS et al, 1993).

2.2 Histogênese óssea

Segundo COLVILLE e BASSERT (2010), o tecido ósseo tem duas maneiras de processar a ossificação:

2.2.1 Ossificação Intramembranosa

Ocorre apenas em alguns ossos do crânio. O osso forma-se nas membranas de tecido fibroso que cobrem o cérebro no feto desenvolvimento. Este processo cria os ossos achatados do crânio

2.2.2 Ossificação endocondral

É responsável por desenvolver a maioria dos ossos. O corpo primeiro cria uma cartilagem "molde" que é subsequentemente substituída por osso. A cartilagem é removida gradualmente à medida que o osso é criado e o centro de crescimento se expande.

2.3 Regeneração óssea

Após uma lesão óssea há extravasamento de sangue que forma um coágulo, que durante o reparo é reabsorvido, juntamente com restos celulares da matriz extracelular, em seguida, células do perióstio proliferam iniciando a reparação óssea. Assim, o tecido lesado passa por uma fase inflamatória, seguida de reparo e remodelação (TEN CATE, 2001).

De acordo com Junqueira e Carneiro, 2004, para que a reparação se inicie, o coágulo sanguíneo e os restos celulares e da matriz devem ser removidos pelos

macrófagos. O periósteo e endósteo próximos à área fraturada respondem com uma intensa proliferação, formando um tecido muito rico em células osteoprogenitoras que constitui um colar em torno da fratura e penetra entre as extremidades ósseas rompidas. Nesse anel ou colar conjuntivo, bem como no conjuntivo que se localiza entre as extremidades ósseas fraturadas, surge tecido ósseo imaturo, tanto pela ossificação endocondral de pequenos pedaços de cartilagem que aí se formam, como também por ossificação intramembranosa. Podem, pois, ser encontradas no local de reparação, ao mesmo tempo, áreas de cartilagem, áreas de ossificação intramembranosa e áreas de ossificação endocondral. Esse processo evolui de modo a aparecer, após algum tempo, um calo ósseo que envolve a extremidade dos ossos fraturados. O calo ósseo é constituído por tecido ósseo imaturo que une provisoriamente às extremidades do osso fraturado.

2.4 Quitosana

De acordo com Laranjeira et. al. (2009), a quitosana é obtida pela reação de desacetilação da quitina em meio alcalino. A quitina é um polímero natural extraído de exoesqueleto de crustáceos, insetos e etc. O biopolímero quitosana pode ser modificado fisicamente, sendo uma das vantagens mais interessantes a sua grande versatilidade em ser preparado em diferentes formas, tais como pós, flocos, microesferas, nanopartículas, membranas, esponjas, colmeias, fibras e fibras ocas.

A maioria dos materiais biológicos é mais apropriada para a engenharia de tecidos do que os sintéticos, porque estes são mais compatíveis com o ambiente natural dos tecidos. Estas matrizes devem sustentar o crescimento celular, por apresentarem propriedades mecânicas condizentes com o tecido a ser reconstruído, induzir respostas celulares mais rápidas ou ainda possuírem intrinsecamente propriedades diretamente relacionadas com a remodelagem dos tecidos (PARTRIDGE et. al. 2002). A estrutura do arcabouço deve possuir cinco fatores considerados desejáveis: superfície que permita adesão e crescimento celular; nenhum componente ou subproduto de sua degradação deve provocar reações inflamatórias ou tóxicas; apresentar estrutura tridimensional; a porosidade deve proporcionar elevada área superficial para interação célula-

arcabouço e ter espaço para a regeneração da matriz extracelular (TAMAI et. al. 2002).

Uma importante propriedade biológica da quitosana é a resposta do tecido hospedeiro para os implantes. Em geral, estes biomateriais causam uma mínima reação ao corpo estranho. A formação de tecido com granulação normal associada com angiogêneses está relacionada à resposta de cicatrização, e este efeito tem sido sugerido para estimular a integração do material implantado pelo hospedeiro (KIM et. al. 2008).

Outra vantagem do uso da quitosana como arcabouço é que pode ser moldada em várias formas (membranas, blocos, tubos e microesferas) e possui uma excelente habilidade para formar estruturas porosas (TAN et. al. 2009). Várias composições têm sido utilizadas para produzir um arcabouço de quitosana que tenha um tamanho de poro e propriedades mecânicas desejáveis (HSIEH et. al. 2007). A quitosana possui também possui habilidade para ser processada em estruturas porosas para uso em transplante de células e regeneração tecidual (MADIHALLY e MATTHEW, 1999).

2.5 β -Trifosfato de cálcio

Os fosfatos de cálcio apresentam-se hoje como os principais materiais estudados e empregados como biomaterial para a reposição e regeneração do tecido ósseo, pois apresentam como principais características: semelhança com a fase mineral de ossos, dentes e tecidos calcificados, excelente biocompatibilidade, bioatividade, ausência de toxicidade e taxas de degradação variáveis (GUASTALDI e APARECIDA, 2010).

Os cimentos à base de fosfato de cálcio têm a propriedade de serem osteocondutivos, ou seja, estimularem a neoformação óssea consequente da reabsorção do implante (MORAES et. al. 2004).

Ainda sobre a osteocondutividade, Yuan et. al. (2000), afirma que a substituição do cimento de fosfato de cálcio por tecido ósseo pode ser explicada pela osteocondutividade ocorrida no cimento implantado no tecido ósseo, osteoclastos reabsorvem o material por fagocitose e osteoblastos produzem a neoformação óssea.

As principais propriedades apresentadas pelo TCP incluem: a possibilidade de substituições catiônicas, a forma alotrópica β -TCP possibilita que até cerca de 15% dos íons Ca^{2+} sejam trocados por Mg^{2+} sem mudanças significativas em sua estrutura, originando o composto denominado de β -TCP substituído por magnésio; a bioatividade e osteocondutividade, as formas alotrópicas α e β -TCP exibem a mesma habilidade de osteocondução, porém a fase β -TCP apresenta maior bioatividade, sendo este fato atribuído ao arranjo estrutural desta fase que possibilita que maior quantidade de íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} sejam trocados com o meio biológico e ainda a biodegradação, a utilização do TCP juntamente com a HA tem sido uma alternativa viável para aumentar a velocidade de reabsorção da HA. Nestes casos, a velocidade de dissolução da mistura HA/TCP é controlada pela quantidade de TCP utilizado. Devido ao seu comportamento biodegradável, o TCP nas formas alotrópicas α e β tem se tornado objeto de interesse na área de biomateriais, sendo utilizado na ortopedia e odontologia como material de preenchimento de cavidades e defeitos ósseos e fixação de tecidos moles. (KAWACHI, CAMPBELL, KWON e XIN, in: GUASTALDI e APARECIDA, 2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande (UAMV/UFCG), segundo protocolo de aprovação CEUA nº 10-2012.

Foram utilizados 12 coelhos jovens, machos, da raça Nova Zelândia, pesando em média 3 kg, provenientes de um criadouro particular na cidade de Campina Grande, Paraíba. Os animais foram divididos ao acaso, em dois momentos experimentais com 6 animais cada momento, de acordo com o período em que foram eutanasiados (45 ou 90 dias após o procedimento cirúrgico). Cada animal recebeu os quatro tratamentos empregados divididos em grupos, a saber: o grupo C (controle), o grupo QUI (quitosana), o grupo TCP (β -trifosfato de cálcio) e o grupo QUI+TCP (associação de quitosana com β -trifosfato de cálcio). Os animais foram alocados em gaiolas individuais, vermifugados com albendazol¹ a

¹ Ibazole 5% - IBASA

5% na dose de 20mg/kg por via oral e passaram por um período de adaptação de sete dias antes do início do experimento, recebendo ração balanceada duas vezes ao dia e água potável *ad libidum* durante todo o experimento.

A quitosana e o β -TCP de cálcio foram fornecidos pelo Grupo de Biomateriais do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

3.1 Procedimento cirúrgico

No pré-operatório cada animal foi submetido a jejum sólido por 12 horas e líquido por 6 horas. A tricotomia foi feita com aparelho de tricotomia compreendendo 4 cm acima e abaixo da região medial da articulação de ambos os joelhos. A medicação pré-anestésica foi constituída de acepromazina² na dose de 1 mg/kg administrado pela via intravenosa (IV) e para manutenção anestésica foi utilizado zoletil³ na dose de 15 mg/kg IV. Foi realizada anestesia epidural com lidocaína 2% na dose de 0,22 ml/kg associado ao tramadol⁴ na dose de 1 mg/kg em todos os animais. A anti-sepsia das áreas operatórias foi realizada com solução alcoólica de clorexidine⁵ 0,5%. Após a delimitação da área operatória com panos de campo, uma incisão cutânea foi efetuada ao longo da margem medial da epífise tibial de aproximadamente 3 cm, em seguida o tecido subcutâneo foi divulsionado até expor o perióstio, sendo este tecido incisado e expondo o osso. Foi realizado em cada metáfise proximal duas osteotomias com uma broca ortopédica de 3 mm, com aproximadamente 2 cm de distância entre as lesões. O processo de osteotomia foi realizado com instilação local de solução fisiológica, evitando assim osteólise. Esse processo foi realizado nas metáfises tibiais de ambos os membros pélvicos. A osteotomia dorsal da tibia esquerda não foi colocado nada (grupo controle) e na osteotomia ventral foi colocado o implante de quitosana. Nas osteotomia realizadas na metáfise tibial direita, na lesão dorsal, foi colocado o β -trifosfato de cálcio e na osteotomia ventral foi colocado a associação de quitosana/ β -trifosfato de cálcio. Após a introdução dos implantes, o perióstio e o tecido subcutâneo foram suturados com categut 3-0 em plano

² Acepran 1% - VETNIL

³ Zoletil 100 - VIRBAC

⁴ Tramadon - CRISTÁLIA

⁵ Riohex 0,5% - RIOQUÍMICA

contínuo. A aproximação dos bordos da ferida cirúrgica foi feita com sutura em zigue-zague com categut 3-0. A pele foi unida com mononilon 3-0 empregando-se sutura simples interrompida.

Nos primeiros dez dias de pós-operatório (PO) foi feita anti-sepsia da ferida cirúrgica com solução fisiológica a 0,9% e kuraderm⁶ spray até a remoção dos pontos externos. Nos primeiros cinco dias de PO foi administrado pela via intramuscular (IM) enrofloxacin⁷ na dose de 10mg/kg para evitar assim processo infeccioso. Para o controle da dor e também evitar processo inflamatório exacerbado, foi administrado pela via IM, nos três primeiros dias de PO, meloxicam⁸ na dose de 0,2 mg/kg no primeiro dia e nos dois dias subsequentes 0,1 mg/kg.

3.2 Microscopia de luz e avaliação histológica

Após a eutanásia de acordo com o período de avaliação, as amostras implantadas nos ossos serão coletadas e avaliadas microscopicamente.

Foram colhidos fragmentos do tecido ósseo que contenham os implantes. Um corte transversal com 2 cm de extensão foi realizado, de modo que seja colhido 1cm de osso proximal e distal em relação aos implantes que foram submetidos a descalcificação para a avaliação histológica. Os fragmentos ósseos foram submetidos à fixação com formalina tamponada a 10% durante 10 dias. Logo após, o material foi lavado em água corrente e descalcificado em mistura de partes iguais de solução de ácido fórmico 5% + ácido clorídrico 5% durante cinco dias. Em seguida os fragmentos foram desidratados por passagens em soluções de álcool em concentrações crescentes (70%, 80%, 90% e álcool absoluto).

Após os processos de desidratação e de diafanização (xilol). Os fragmentos foram incluídos em parafina líquida e, posteriormente, cortados em fatias transversais de 5µm de espessura dos blocos e montados em lâminas de vidro coradas com hematoxilina-eosina para serem analisadas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

⁶ Kuraderm Prata - AVIPEC

⁷ Biofloxacin 2,5% - BIOVET

⁸ Maxicam 0,2% - OURO FINO

Pode-se observar aos 45 dias, na interface osso/implante, que os grupos QUI, TCP e TCP+QUI apresentaram maior reação celular do tipo granuloma que o grupo C. Também foi observado no centro dos granulomas, nos mesmos grupos, maior neovascularização e presença do biomaterial envolvido por células com neoformação óssea, sendo essa reação mais intensa no grupo QUI+TCP e QUI. Pode-se notar maior quantidade de tecido ósseo neoformado na interface osso/implante no grupo QUI+TCP em relação aos demais grupos, sendo as reações dos grupos QUI e TCP maiores que a do grupo C.

Aos 90 dias, na interface osso/implante dos grupos QUI e QUI+TCP evidenciou-se maior reação celular com presença de granuloma que os demais grupos. Notou-se também intensa neovascularização nos grupos com menor grau no grupo C. Observou-se que os biomateriais ainda estavam presentes e envolvidos por células. Todos os grupos apresentavam cicatrização óssea avançada, porém nos grupos QUI e QUI+TCP essa reação era mais intensa que os demais.

Os exames histológicos realizados neste estudo possibilitaram analisar os estímulos induzidos pelos biomateriais durante o período de reparação óssea proposto neste experimento. A presença de biomaterial na interface osso/implante é normal, pois segundo Scimitz et. al. (1999), e Knabe (2000), a reabsorção dos cimentos à base de fosfato de cálcio é lenta, podendo-se encontrar material até 2 anos após a implantação.

Segundo Kim et. al. (2008), diz que a propriedade da quitosana como uma mínima reação de corpo estranho e formação de tecido com granulação normal associada com angiogêneses foi encontrada no experimento, no qual não houve reação adversa e a neovascularização sendo maior nos grupos que possuíam quitosana (QUI e QUI+TCP). TAN et. al. (2009), citou uma vantagem do uso deste biomaterial como arcabouço, ela pode ser moldada em várias formas. No experimento, a quitosana estava na forma de esponja, podendo ser cortada no tamanho necessário dependendo da lesão.

Garrido e Wykrota (2009) , afirmam que quando a biocerâmica é usada para reconstituição óssea, ela se funde fortemente aos osteoblastos num primeiro estágio onde há a resença de substância cimentante amorfa e pela arquitetura superficial, permitindo o aumento gradativo da resistência mecânica que se aproxima rapidamente a do osso cortical. Também foi descrito que este material demonstrou ser mais do que um simples material de preenchimento. Demonstrou ser também um substituto ósseo eficiente nos locais reconstituídos sob stress fisiológico de cargas, que quando incorporado ao tecido ósseo cumpre satisfatoriamente a demanda exigida.

A capacidade osteoindutora da quitosana, isto é, a habilidade de transformar células mesenquimais indiferenciadas perivascular em células formadoras de tecido ósseo, foi observada neste experimento, sendo explicada pela maior neoformação óssea nos grupos QUI e QUI+TCP. Segundo Ueno (2001), a quitosana tem a capacidade de aumentar as funções de células inflamatórias, promovendo organização celular e atuando no reparo de feridas amplas, mostrando assim sua alta capacidade de cicatrização e reparação do tecido lesionado. Isso é explicado A ação da quitosana sobre as plaquetas produz mais um efeito benéfico, que é a liberação de fator de crescimento derivado de plaquetas-AB (PDGF-AB) e fator de transformação do crescimento- β_1 (TGF- β_1), provavelmente pelo dano causado às membranas plaquetárias pela forte agregação induzida, principalmente, pela quitosana⁴⁶. PDGF-AB e TGF- β_1 são citocinas liberadas pelas plaquetas, que desempenham importante papel no processo de cicatrização .

Azevedo (2012), comprova a relação do TCP com a maior formação óssea, sendo explicada pela capacidade osteocondutiva do material, de modo que a regeneração óssea possa acontecer de forma mais rápida.

Tais citações retificam os resultados encontrados nesse experimento, os grupos que continham tratamento com biomateriais, associados ou não, foram os que obtiveram melhores resultados, sendo a regeneração no grupo de 90 dias após o tratamento mais expressiva do que o grupo de 45 dias.

5 CONCLUSÃO

Podemos concluir que os biomateriais utilizados neste experimento para auxiliar a regeneração óssea foi satisfatória e acelerou a neoformação óssea. A associação da quitosana com o β -trifosfato de cálcio acelera e aumenta a neoformação óssea comparada a utilização desses biomateriais isoladamente. Nenhum dos biomateriais utilizados nesse experimento provocou reação de rejeição.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, A. S. Utilização de fosfatos de cálcio, quitosana e medula óssea no reparo ósseo em coelhos. Estudo clínico-cirúrgico, radiológico e histológico. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.**, São Paulo, vol. 49, n. 1, p. 12-18, 2012.

BILLOTTE, W.G. **Ceramic Biomaterials**, Biomedical Engineering Handbook, Second Edition, 2000.

COLVILLE, T.; BASSERT, J.M. O Sistema Esquelético. In: **Anatomia e Fisiologia Clínica para Medicina Veterinária**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Editora Mosby Elsevier. p. 158. 2010.

CAMPBELL, A. A. Bioceramic Coatings for Orthopaedic Implants. **Materials Today**, vol. 26. 2003.

FELÍCIO-FERNANDES G. ; LARANJEIRA M.C.M.. Calcium phosphate biomaterials from marine algae, Hydrothermal synthesis and characterization. **Química Nova**, vol. 23, p. 441-446. 2000.

GARRIDO, C.A., WYKROTA, F.H.L. **Uso de biocerâmica bifásica micro-macro porosa de fosfatos de cálcio na reconstituição de grandes perdas ósseas em fraturas expostas infectadas de tíbia**. Disponível em: <<http://www.uh.cu/centros/biomat/Congresos/biomat99/PIC6.pdf>>. Acesso em: 6 de fevereiro de 2013. 2009.

GARTNER, L.P, HIATT, J.L. Cartilagem e Osso. In: **Tratado de Histologia**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 104-123. 1999.

GUASTALDI, A.C. ; APARECIDA, A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Quim. Nova**, vol. 33, No. 6 p. 1352-1358. 2010.

HSIEH, W. C., et. al. Morphology and characterization of 3D micro-porous structured chitosan scaffolds for tissue engineering **Colloids and Surfaces B**, vol. 57, p. 250. 2007.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10ª Ed. Rio De Janeiro: Guanabara Koogan. p. p. 136-153. 2004.

KAWACHI E.Y., et.al. Biocerâmicas: Tendências e Perspectivas de uma Área Interdisciplinar. **Química Nova**, vol. 23. p. 518-522. 2000.

KHAN, T. A.; PEH, K. K. **A preliminary investigation of chitosan film as dressing for punch biopsy wounds in rats**.. Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Science. vol.6, p. 20-26. 2003.

KIM, I.Y., et. al. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. **Biotechnology Advances**, vol. 26, Issue 1. p. 1-21. 2008.

KNABE C, et. al. Evaluation of calcium phosphates and experimental calcium phosphate bone cements using osteogenic Cultures. **Journal of Biomedical Materials Research**, vol. 52: p. 498-508. 2000.

KWON, S.H., et. al. Synthesis and dissolution behavior of β -TCP and HA/ β -TCP composite powders. **Journal of the European Ceramic Society**, vol. 23: p. 1039. 2003.

LARANJEIRA, MAURO C. M.; FAVERE, VALFREDO T. de. **Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico**. 2009. Quím. Nova, São Paulo, vol. 32, n. 3. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000300011&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 12 de Dezembro de 2012.

MADIHALLY, S. V; MATTHEW, H. W. Porous Chitosan Scaffolds For Tissue Engineering. **Biomaterials**, vol. 20, p. 1133-1142. 1999.

MARTIN R.I. ; BROWN P.W.. Mechanical properties of Hydroxyapatite formed at Physiological Temperature. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, vol. 6.p. 138-143. 1995.

MORAES, P. C. et. al. Biocompatibilidade do cimento de fosfato de cálcio implantado no rádio de coelhos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, vol. 19, n. 4, p. 351-359. 2004.

OKAMOTO, Y., et. al. Effects of molecular weight and deacetylation degree of chitin/chitosan on wound healing. **Carbohydrate Polymers**, vol.53, p. 337. 2003.

PARTRIDGE, K. et. al. Adenoviral BMP-2 Gene Transfer in Mesenchymal Stem Cells: In Vitro and in Vivo Bone Formation on Biodegradable Polymer Scaffolds. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 292. p. 144-152. 2002.

PEREIRA A.P.V. ; VASCONCELOS W.L. ; ORÉFICE R.L.. Novos biomateriais: híbridos orgânico-Inorgânicos bioativos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 9. p. 104-109. 1999.

ROSS, M.H, et al. Osso. In: **Histologia Texto e Atlas**. 2ª ed. São Paulo: Editora Panamericana. p. 141-179. 1993.

RUBIN, et. al. Ossos e articulações. In: **Patologia: Bases clinicopatológicas da Medicina**. 4 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. p. 1337-1338. 2006.

SALGADO, J. F. M. **Avaliação da Velocidade do Processo de Regeneração Óssea Primária, Conjugando a Técnica de Regeneração Óssea Guiada com Membrana de Colágeno Aniônico e Terapia Laser de Baixa Potência**. UNIVAP, São José dos Campos, São Paulo. 2002.

SCHMITZ, J.P., et. al. Reconstruction of bone using calcium phosphate bone cement: a critical review. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, vol. 57. p. 1122-1126. 1999.

SENEL, S.; McCLURE, S. J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. **Advanced Drug Delivery Review**. vol. 56. p.1467–1480. 2004.

SHAREEF MY, MESSER PF AND VAN NOORT R.. Fabrication, Characterization and Fracture Study of a Machinable Hydroxyapatite Ceramic. **Biomaterials**, vol. 14. p. 69-75.1993.

SIVAKUMAR, M., et. al.. Development of Hydroxyapatite Derived from Indian Coral. **Biomaterials**, vol. 17. p. 1709-1714. 1996.

TAMAI, N. et. al. Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure exhibit superior osteoconduction in vivo **Journal of Biomedical Materials Research**. vol. 59, 110. 2002.

TAN, H., et. al. Gelatin/chitosan/hyaluronan scaffold integrated with PLGA microspheres for cartilage tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, vol. 5, 328. 2009.

TEN CATE, A. R. **Histologia Bucal**. Rio de Janeiro: Guanabara. 2001.

UENO H., et. al. **Chitosan accelerates the production of osteopontin from polymorphonuclear leukocytes**. **Biomaterials**, 22. p. 1667-73. 2001.

XIN, R. et. al. A comparative study of calcium phosphate formation on bioceramics in vitro and in vivo. **Biomaterials**, vol. 26, p. 6477-6486. 2005.

YUAN H et. al. Tissue responses of calcium phosphate cement: a study in dogs. **Biomaterials**, v.21. p. 1283-90. 2000.

WANG, X., et. al. Bone repair in radii and tibias of rabbits with phosphorylated chitosan reinforced calcium phosphate cements. **Biomaterials**, vol. 23. p. 4167-4176. 2002.