GUSTAVO MIRANDA ZANOTTO

Avaliação do hidrogel de quitosana/glicerol fosfato
como matriz de suporte para células-tronco de equinos

São Paulo
2012

GUSTAVO MIRANDA ZANOTTO

**Avaliação do hidrogel de quitosana/glicerol fosfato
como matriz de suporte para células-tronco de equinos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Departamento

Área de Concentração:

Clínica Cirúrgica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Luis Claudio Lopes Correia da Silva

**São Paulo
2012**

1D

Nº CLASSIFICAÇÃO
T. 2403
FNUZ
Nº TOMBO
033071

24/02

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP

23/11/12

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2703
FMVZ

Zanotto, Gustavo Miranda

Avaliação do hidrogel de quitosana/glicerol fosfato como matriz de suporte para células-tronco de equinos / Gustavo Miranda Zanotto. -- 2012.
69 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Luis Cláudio Lopes Correia da Silva.

1. Engenharia tecidual. 2. Biomaterial. 3. Quitosana. 4. Células-tronco. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação do hidrogel de quitosana/glicerol fosfato como matriz de suporte para células tronco de equino", protocolado sob o nº 2747/2012, utilizando células tronco de cavalos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Luis Claudio Lopes Correia da Silva, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 15/8/2012.

We certify that the Research "Evaluation of hidrogel chitosan/glycerol phosphate as scaffold for equine stem cells", protocol number 2747/2012, utilizing stem cells from equine, under the responsibility Prof. Dr. Luis Claudio Lopes Correia da Silva, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 8/15/2012.

São Paulo, 16 de agosto de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ZANOTTO, Gustavo Miranda

Título: Avaliação do hidrogel de quitosana/glicerol fosfato como matriz de suporte para células-tronco de equinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: 17 / 12 / 2012

Banca Examinadora

Prof. Dr. WIS CASSIO LOPES CORRÊA DA SILVA
Instituição FMVZ-USP Julgamento APROVADO

Prof. Dr. Marcia Angela De Que
Instituição FMVZ USP Julgamento aprovado

Prof. Dr. Luiz Henrique Catalani
Instituição IQ-USP Julgamento aprovado.

*Dedico este trabalho aos meus pais
Osmar e Marilena, que com muito
amor e carinho construíram bases
sólidas para que pudesse chegar até
aqui. Sem eles nada teria sentido.*

*Dedico também, as minhas
amadas irmãs companheiras de
uma vida. Muito obrigado pelos
ensinamentos e exemplos.*

*Dedico a toda a minha família,
que sempre unida, nas alegrias e nas
tristezas me deu grandes exemplos
de amor, carinho e amizade.*

*“Você pode dizer adeus a sua família e a seus
amigos e afastar-se milhas e milhas e, ao mesmo
tempo, carregá-los em seu coração, em sua mente, em
seu estômago, pois você não apenas vive no mundo,
mas o mundo vive em você.”*

Frederick Buechner

Agradecimentos

Agradeço à Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pela oportunidade de estar realizando um sonho.

Agradeço ao meu orientador Prof. Luis Cláudio Lopes Correia da Silva, por todos os ensinamentos. Obrigado pela oportunidade de evoluir profissionalmente ao lado de um grande profissional.

Ao Prof. Luis Henrique Catalani e a Dr^a. Vânia B. Bueno pela ajuda com a elaboração do hidrogel utilizado neste trabalho. Agradeço sinceramente e torço para que possamos realizar outros trabalhos em conjunto.

A Prof^a. Dr^a. Maria Angélica Miglino por ter aberto as portas do Serviço de Anatomia de Animais Doméstico e Silvestres da FMVZ/USP e as Prof^a. Dr^a. Patrícia Beltrão Braga e a Dr^a Graciela Pignatari, por toda orientação e contribuição para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigado por toda atenção dispensada. Ao Dr. André Franciolle, por ter cedido gentilmente material para a realização deste trabalho.

Gostaria de agradecer aos colegas do Laboratório de Células Tronco pela ajuda para a realização do projeto, em especial a Isabella Fernandes e Fabiele Russo. Agradeço à Dra. Rose Eli Rici pela ajuda na realização da Microscopia eletrônica de Varredura.

Agradeço ao Ms. Marcos Vinícius Mendes Silva por toda colaboração. Obrigado pela ajuda, paciência e incentivo. Com certeza sua participação foi fundamental para a realização deste estudo.

Ao Prof. Dr. André Luis do Valle de Zoppa, Prof. Dr. Wilson Roberto Fernandes, Prof^a. Dr^a. Raquel Yvone Baccarin, Prof^a.Dr^a. Carla Baggi Belle e ao Prof. Dr. Stefano Hagen, por todos os ensinamentos passados ao longo destes anos, meu muito obrigado.

Aos meus colegas de convívio na pós-graduação e no Hospital Veterinário da FMVZ/USP, pela oportunidade de aprender com vocês. Muito obrigado pela ajuda nos momentos difíceis.

A Faculdade Anhanguera de Campinas – unidade 3, e a todos os colegas de trabalho sou muito grato pela ajuda e compreensão. Sem isso, as dificuldades seriam muito maiores.

Gostaria de agradecer em especial a um grande amigo, Prof. Daniel Borges, por todas as conversas, incentivo e pela ajuda com a parte de estatística do presente trabalho.

Aos meus professores de graduação na UFPR, em especial Prof. Felipe Wouk, Prof. Ivan Deconto e Prof Alexander Biondo, com certeza seus ensinamentos são parte do que sou hoje.

Aos meus familiares e amigos por toda a convivência e incentivo para a conclusão de mais uma grande importante etapa da minha vida.

RESUMO

ZANOTTO, G.M. **Avaliação do hidrogel de quitosana/glicerol fosfato como matriz de suporte para células-tronco de equinos.** [Evaluation of chitosan/glycerol phosphate hydrogel as scaffold for equine stem cells]. 2012. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Lesões cartilagíneas apresentam grande dificuldade em cicatrizar e algumas técnicas cirúrgicas tem sido desenvolvidas, mas seus resultados são falhos ao longo do tempo. Desta forma, a aplicação da engenharia tecidual para a reconstrução de lesões de cartilagem tem despertado interesse crescente. A correta combinação entre as fontes celulares, matrizes de suporte e fatores de crescimento podem melhorar a qualidade do tecido reparado. Neste caso, as fontes celulares mais promissoras são as células-tronco, devido sua alta taxa de proliferação e capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares. As matrizes de suporte tem papel fundamental na adesão, proliferação e diferenciação celular, sendo que diversos tipos de biomateriais tem sido estudados. A quitosana é um polímero natural, biocompatível e biodegradável, que tem se mostrado interessante na utilização na engenharia tecidual. O presente estudo objetivou avaliar o hidrogel de Quitosana/Glicerol Fosfato como matriz de suporte para células-tronco de equinos. O hidrogel foi preparado adicionando-se 100 µL de β-glicerol fosfato a 900 µL de quitosana diluída em meio ácido. As células-tronco de gordura, saco vitelínico e polpa dentária foram cultivadas no hidrogel de Quitosana/Glicerol Fosfato, suspendendo-se 5×10^5 células em 350 µL de hidrogel, ainda em estado líquido, e este material foi mantido por duas horas a 37°C, em atmosfera úmida com 5% CO₂ e em seguida meio de cultivo celular foi adicionado. Foi realizada análise histológica deste material através das colorações de Hematoxilina/Eosina, Picrossírius e Tricromo de Masson. O hidrogel de Quitosana/Glicerol Fosfato apresentou comportamento bastante irregular e estrutura frágil. As células sedimentadas no hidrogel apresentaram morfologia arredondada e não houve deposição de colágeno. Observou-se redução na quantidade celular ao longo do tempo. As células cultivadas apresentaram morfologia fibroblastóide e aderência em placa de cultivo. Estas características, apesar de não exclusivas, são associadas às características de células-tronco

mesenquimais. Quando cultivadas no hidrogel as células assumiram formato redondo, que alguns autores sugerem estar relacionado a uma diferenciação condrogênica. Porém, esta parece ser uma característica de células cultivadas em hidrogel, estando relacionadas à maciez e a falta adesão entre célula e matriz. Este fato pode explicar a diminuição da quantidade de células presentes no meio ao longo do experimento. Apesar de promissor o uso deste biomaterial em engenharia tecidual de cartilagem necessita de algumas melhorias, particularmente em relação à homogeneidade, força mecânica e aderência celular. Este parece ser o primeiro relato do cultivo de células-tronco mesenquimais originadas da polpa dentária na espécie equina.

Palavras-chave: Engenharia tecidual. Biomaterial. Quitosana. Células-tronco

ABSTRACT

ZANOTTO, G.M. **Evaluation of chitosan/glycero phosphate hydrogel as scaffold for equine stem cells** [Avaliação do hidrogel de quitosana/glicerol fosfato como matriz de suporte para células-tronco de equinos.] 2012. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Cartilage injuries have great difficulty healing and some surgical techniques have been developed, however, results fail over time. Thus, the application of tissue engineering in cartilage injuries repair has gained interest. The correct combination of cell source, scaffolds, and growth factors may improve the quality of the repaired tissue. In this case, the most promising cell sources are stem cells because of their high proliferation rate and ability to be transformed into several cell types. Scaffolds have a fundamental role in cell adhesion, proliferation, and differentiation, thus, several biomaterials have been studied. Chitosan is a natural polymer, biocompatible and biodegradable, suitable for use in tissue engineering. This study aimed at evaluating *Chitosan/Glycerophosphate* hydrogel as scaffold for equine stem cells. The hydrogel was prepared by adding 100 μL β -Glycerophosphate to 900 μL of chitosan diluted in acid medium. Stem cells from fat, yolk sac, and dental pulp were cultivated in *Chitosan/Glycerophosphate* hydrogel, suspending 5×10^5 cells in 350 μL of hydrogel, still in liquid form; this material was kept for two hours at 37°C in humid atmosphere with 5% CO_2 and a cell cultivation medium was subsequently added. Histological analysis of this material was realized through Hematoxylin/Eosin, Picrosirius, and Masson's Trichrome stains. The *Chitosan/Glycerophosphate* hydrogel presented substantial irregular behavior and fragile structure. The cells sedimented in hydrogel presented rounded morphology and no collagen deposit. A reduction in cell quantity over time was observed. Cells cultivated in scaffold presented fibroblastoid morphology and adherence to scaffold. These characteristics, despite not being exclusive, are associated with characteristics of mesenchymal stem cells. When cultivated in hydrogel, cells assumed a round form, which some authors indicate to be related to chondrogenic differentiation. However, this seems to be a characteristic of cells cultivated in hydrogel, thus, being associated with softness and lack of cell-matrix adhesion. This may explain the reduced quantity

of cells in the medium throughout the experiment. Despite the promising use of this biomaterial in cartilage tissue engineering, improvements related to homogeneity, mechanical strength, and cell adhesion must be studied. This seems to be the first report on the cultivation of mesenchymal stem cells originating from equine dental pulp.

Key words: Tissue Engineering, Biomaterial, Chitosan, Stem Cells

LISTA DE ABREVIATURAS

%	por cento
° C	grau Celsius
µL	microlitros
CO ₂	dióxido de carbono
DMEM/F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium/ F12</i>
HE	hematoxilina-eosina
M	molar
MEM NEEA <i>amino acids</i>)	aminoácidos não essenciais (<i>medium essential media – nonessential</i>
mL	mililitros
DMEMc	DMEM completo
g	gramas
mg	miligramas
MEV	microscopia eletrônica de varredura

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Cartilagem Articular	19
2.2 Técnicas de Reparo de Cartilagem Articular	21
2.3 Engenharia Tecidual para Reparos de Cartilagem	23
2.4 Células-tronco para o Reparo de Cartilagem.....	23
2.5 Matriz de suporte celular para o reparo de cartilagem articular	25
2.6 Quitosana.....	28
2.7 Hidrogel de Quitosana/Glicerol Fosfato	32
3 MATERIAL E MÉTODO.....	33
3.1 Hidrogel de Quitosana/Glicerol Fosfato	33
3.1.1 Purificação e Desacetilação da Quitosana	33
3.1.2 Preparação, esterilização e caracterização do Hidrogel Quitosana/Glicerol Fosfato	34
3.1.3 Determinação do tempo de gelificação e da termorreversibilidade do hidrogel de quitosana/glicerol fosfato.....	35
3.1.4 Análise microestrutural por Microscopia Eletrônica de Varredura	35
3.2 Cultivo e caracterização das células-tronco de gordura, saco vitelínico, e polpa dentária.....	36
3.2.1 Células-tronco de Saco Vitelínico.....	36
3.2.2 Células-tronco de tecido adiposo de equinos.....	36
3.2.3 Células-tronco de polpa dentária.....	37
3.3 Cultivo das Células de Equinos em Matriz Tridimensional de Quitosana/Glicerol Fosfato	38
3.3.1 Análise Histológica	38
3.3.2 Microscopia e Fotomicrografia	40
3.3.3 Determinação da Quantidade de células presentes no Biomaterial	41
4 RESULTADOS.....	42
4.1 Hidrogel de Quitosana/Glicerol Fosfato	42
4.1.1 Purificação e desacetilação da Quitosana.....	42
4.1.2 Preparação, esterilização e caracterização do Hidrogel de Quitosana/Glicerol Fosfato	42

4.1.3 Determinação do Tempo de Gelificação e da Termorreversibilidade do Hidrogel de Quitosana/Glicerol Fosfato	43
4.1.4 Análise microestrutural por Microscopia Eletrônica de Varredura	43
4.2. Cultivo e caracterização das células-tronco de gordura, saco vitelínico, e polpa dentária	44
4.3 Cultivo das Células de Eqüinos em Matriz Tridimensional de Quitosana/ Glicerol Fosfato	45
4.3.1 Análise Histológica	45
4.3.2 Microscopia e Fotomicrografia	46
4.3.3 Determinação da quantidade de células presentes no biomaterial	50
5 DISCUSSÃO	52
6 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

O tratamento de lesões cartilagíneas continua sendo um grande desafio para os cirurgiões devido à baixa capacidade intrínseca da cartilagem para se reparar associada a sua complexidade biomecânica. Apesar de muitas técnicas estarem descritas para o tratamento de lesões articulares, os resultados não parecem satisfatórios em longo prazo (BEDI; FEELEY; WILLIAMS, 2010).

Desta forma, a medicina regenerativa, mais precisamente a engenharia tecidual, chamou bastante a atenção dos pesquisadores como opção viável para o tratamento de lesões de cartilagem articular.

A engenharia tecidual é um ramo da ciência que associa os conhecimentos de engenharia e da biologia, com o intuito de reparar ou restaurar o funcionamento do organismo. A engenharia tecidual é composta basicamente por três pilares, são eles: as células, a matriz de suporte e os fatores de crescimento tecidual. O estudo da interação entre estes pilares, bem como o desenvolvimento de métodos que melhorem esta interação, são focos deste campo de estudo (LANGER; VACANTI, 1993).

As fontes celulares mais comumente utilizadas na engenharia tecidual de cartilagem são os condrócitos e as células-tronco. Os condrócitos são exemplos de células adultas diferenciadas, que tem um papel específico no tecido cartilagíneo. Entretanto, sua proliferação limitada e baixa capacidade de regeneração restringem seu emprego na engenharia tecidual de cartilagem (BIANCO; ROBEY, 2001).

Por outro lado, as células-tronco apresentam alto grau de proliferação e podem se transformar em diversos tipos celulares. Estas características tornam-nas muito interessantes para o emprego no tratamento de lesões de cartilagem através de engenharia tecidual (KOH; ATALA, 2004).

Outro fator determinante no sucesso da engenharia tecidual é a matriz de suporte ou *scaffold*. A matriz de suporte é qualquer material capaz de

permitir a aderência e proliferação celular, a permeabilidade de nutrientes e a deposição de matriz extracelular (SPILLER; MAHER; LOWMAN, 2011).

Vários tipos de materiais são estudados com o objetivo de se criar uma matriz de suporte ideal. Estes materiais podem ter origem natural ou sintética, e serem reticulados de forma física ou química (BURDICK; PRESTWICH, 2011; (SPONITIZ; BURKS, 2008).

A quitosana é um exemplo de polímero de origem natural amplamente estudada na criação de matrizes de suporte. Algumas características como, citocompatibilidade, biodegradação e capacidade antibacteriana tornam este polímero extremamente vantajoso para a construção de *scaffolds* (DASH et al., 2011).

O hidrogel é um arcabouço, geralmente de origem natural, capaz de reter uma grande quantidade de água em seu interior. Esta característica cria um ambiente bastante favorável para as células (SPILLER; MAHER; LOWMAN, 2011).

Algumas técnicas utilizadas para a produção do hidrogel pode permitir que este material gelifique dependendo da variação do pH ou da temperatura. Estes são os chamados hidrogéis injetáveis ou *in situ*. Este tipo de material geralmente é líquido em temperatura ambiente e se solidificam quando aquecidos à temperatura próxima a temperatura corporal (AMINI; NAIR, 2012).

Este mecanismo permite que um *scaffold* seja depositado através de cirurgias minimamente invasivas, como a artroscopia. Além do mais, estas matrizes tomam o formato do local onde foram depositadas, permitindo assim, um bom preenchimento de lesões teciduais irregulares.

A adição de β -glicerol fosfato em uma solução de quitosana permite a formação de um hidrogel termossensível (CHENITE et al., 2001). Este material tem sido amplamente estudado com foco na engenharia tecidual e na liberação controlada de medicações. Porém, não há relatos do uso deste tipo de biomaterial como matriz de suporte para células-tronco de equinos.

O objetivo do presente trabalho foi de avaliar o comportamento do hidrogel de Quitosana/Glicerol Fosfato como matriz de suporte para células-tronco de equinos *in vitro*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cartilagem articular

Uma superfície articular do tipo sinovial consiste em no mínimo dois ossos articulando-se através de uma fina camada de cartilagem hialina (TODHUNTER, 1996). O papel da cartilagem articular é promover uma superfície de baixa fricção, transmitir e distribuir as forças na articulação (ANASTASIOU et al., 2003). A capacidade da cartilagem articular em permitir uma função normal da articulação sinovial está diretamente ligada com as propriedades mecânicas da matriz extracelular (SHU et al., 1995).

A cartilagem articular é uma cartilagem do tipo hialina e pode ser dividida em quatro zonas: superficial, de transição, radial e calcificada. Cada zona se diferencia pela disposição das fibras de colágeno bem como pela composição e tipo de proteoglicanos presentes (WONG; CARTER, 2003).

Esta organização específica da cartilagem articular é resultado de um complexo processo de desenvolvimento formado durante a embriogênese (OLSEN; REGINATO; WANG, 2000).

A fase condrogênica é o primeiro passo da ossificação endocondral e ocorre através de eventos rigidamente controlados que compreendem a condensação das células mesenquimais condroprogenitoras e diferenciação em condrócitos. A composição da matriz extracelular muda conforme as células mesenquimais se diferenciam em condrócitos. Enquanto a produção de colágeno tipo I diminui, os condrócitos começam a produzir colágeno tipo II, IX e XI, bem como agrecan. Estas características são mantidas na cartilagem articular adulta (DELISE; FISCHER; TUAN, 2000).

A água é o componente mais abundante na cartilagem articular, correspondendo de 70 a 80% de seu peso total (SHU et al., 1995). Considerando a matéria seca, a cartilagem adulta é composta por: 50% de colágeno, 35% de proteoglicanos, 10% glicoproteínas, 3% minerais, 1% de lipídeos e contém de 1 a 12% de condrócitos (TODHUNTER, 1996).

O colágeno tipo II representa aproximadamente 90 a 95% das fibras de colágenos presentes na cartilagem articular. Sua função principal é aumentar a força de tensão do tecido, sendo particularmente importante na superfície cartilaginosa. As fibras colágenas também se arranjam concentricamente em torno dos condrócitos formando uma cápsula denominada grupo isógeno. Cada grupo isógeno, contendo um ou mais condrócitos, é revestido pela cápsula pericelular colagenosa circundado por uma matriz territorial rica em proteoglicanos (McILWRAITH, 2006).

As fibras de colágeno na zona superficial são finas, compactas e dispostas de forma paralela à superfície articular. Já na zona média e de transição estão dispostas obliquamente e de tamanho médio. Nessa região formam uma malha densa com proteoglicanos interligados com significado funcional importante. Na zona profunda e radial encontram-se fibras de colágeno grandes, arranjadas perpendicularmente à superfície articular. Estas fibras espessas e perpendiculares penetram a zona calcificada e penetram no osso subcondral, ancorando assim a cartilagem ao osso subcondral (CHU, 2001).

Os proteoglicanos são outro componente sólido importante da matriz extracelular da cartilagem articular. Estes compostos ocupam os espaços entre as fibras de colágenos. Os proteoglicanos apresentam várias formas e são constituídos de monômeros formados por uma proteína ligante e cadeias laterais de glicosaminoglicanos. Quando associado ao ácido hialurônico formam grandes agregados chamados de agregans. Os principais glicosaminoglicanos da cartilagem madura são o condroitin-6 sulfato e o queratan sulfato (McILWRAITH, 2006).

Em um ambiente hidratado, os proteoglicanos ficam carregados negativamente, o que atrai água para o interior da matriz extracelular e é responsável pela resistência compressiva da cartilagem articular. Por outro lado, a organização das fibras de colágeno são responsáveis pela resistência à tensão (SHU et al., 1995).

Os condrócitos são células metabolicamente ativas, que apesar de ocupar menos de 10% do volume tecidual, é o grande responsável pela manutenção da matriz extracelular extremamente especializada (CHU, 2001). Com relação às zonas, os condrócitos apresentam-se mais achatados ou em forma discóide do que nas camadas mais profundas e sedimentados em uma fina malha de

colágeno tipo II. Os condrócitos situados nas camadas mais profundas são mais arredondados e se relacionam mais verticalmente orientados pelas fibras de colágeno (JAFFERY, 1994).

2.2 Técnicas de reparo de cartilagem articular

A cartilagem articular é um tecido altamente organizado, com propriedade biomecânica complexa e com baixa capacidade de regeneração intrínseca. Estes fatores tornam o reparo de lesões cartilagíneas um grande desafio para os cirurgiões (BEDI; FEELEY; WILLIAMS, 2010).

Algumas características da cartilagem articular como o baixo suprimento sanguíneo, a alta proporção de matriz extracelular e a baixa capacidade mitótica dos condrócitos em condições fisiológicas, contribuem para a baixa capacidade de reparação de defeitos cartilaginosos (SHU et al., 1995).

O tipo de injúria, incluindo sua profundidade e tamanho, bem como se aguda ou crônica, afetam diferenciadamente a capacidade de reparação da cartilagem articular (SHU et al., 1995).

Lesões de cartilagem superficiais são aquelas que não ultrapassam a cartilagem calcificada e não penetram o osso subcondral, ativando o mecanismo de reparo condral intrínseco. Uma fina camada de matriz extracelular pode ser depositada sobre a superfície lesada, mas esta resposta é transitória e limitada. Desta forma, considera-se que lesões de cartilagem superficiais não cicatrizam e tendem a evoluir para a degeneração articular (CHU, 2001).

Quando a lesão invade o osso subcondral, o mecanismo de reparo osteocondral é ativado. Desta forma, células provenientes da medula óssea podem cicatrizar os defeitos condrais. Este processo envolve a formação de coágulo de fibrina, migração e proliferação das células progenitoras derivadas da medula óssea (CHU, 2001).

As estratégias para o tratamento de lesões de cartilagem incluem; debridamento da cartilagem articular lesada, terapias celulares, terapias

celulares associadas à matriz (*scaffold*), e transplante de tecidos integralmente (WILLIANS, 2007).

A técnica mais comumente empregada no tratamento de lesões profundas de cartilagem de pequeno tamanho é a microfratura. É considerada uma técnica simples e barata se comparada a outras modalidades (BEDI; FEELEY; WILLIANS, 2010).

A microfratura consiste em se realizar pequenas perfurações no osso subcondral recrutando células-tronco mesenquimais da medula óssea para o defeito (BREINAN et al., 2000). Entretanto, o tecido reparado por esta técnica é uma fibrocartilagem contendo diversas quantidades de colágeno tipo I, II e III (BAE; YOON; SONG, 2006).

Apesar da facilidade e do custo do uso da técnica de microfratura, os resultados não são satisfatórios quando se avaliam os pacientes por um longo período de pós-operatório (BEDI; FEELEY; WILLIANS, 2010).

Algumas técnicas associadas à microfratura parecem melhorar a qualidade do tecido cicatrizado. A associação de matrizes e fatores de crescimento parecem ter resultados mais satisfatórios (KIESWETTER et al., 1997; LOHMAN et al., 2000; FORTIER; NIXON; LUST, 2002; HOEMAN et al., 2005; NIXON et al., 2005;).

A técnica de transplante osteocondral autólogo, também conhecida por mosaicoplastia, é um método eficiente de se tratar defeitos osteocondrais do joelho. A técnica consiste de se retirar múltiplos segmentos osteocondrais cilíndricos de uma área doadora (que não recebe carga) e implantar nos defeitos osteocondrais. Este procedimento oferece diversas vantagens sobre as demais técnicas de reparo osteocondral, como a possibilidade de se transplantar uma cartilagem hialina, um menor tempo de reabilitação e ser executada em apenas um momento cirúrgico (BEDI; FEELEY; WILLIANS, 2010).

Porém, algumas limitações do uso da técnica de mosaicoplastia são descritas, tais como: morbidade no sítio doador, limitada quantidade de tecido que pode ser obtido para reparação tecidual, o preenchimento incompleto do defeito osteocondral e a discrepância na espessura dos implantes (*plugs*) entre o sítio doador e o defeito osteocondral (BEDI; FEELEY; WILLIANS, 2010).

O implante autólogo de condrócitos é uma técnica descrita para o tratamento de defeitos condrais completos. A primeira grande vantagem da

utilização desta técnica era de produzir principalmente cartilagem hialina ao invés de fibrocartilagem. Entretanto, o procedimento é tecnicamente difícil e algumas complicações são relatadas (GIKAS; ASTON; BRIGGS, 2008).

Os tratamentos cirúrgicos disponíveis, como a mosaicoplastia, o implante autólogo de condrócito e a microfratura, apresentam taxas de sucesso variadas e a longo termo são insatisfatórios. Desta forma, o interesse pela utilização da engenharia tecidual para o tratamento de defeitos ostecondrais é crescente (KOCK; van DONKELAR; ITO, 2011).

2.3 Engenharia tecidual para reparos de cartilagem

A engenharia tecidual é definida como uma ciência interdisciplinar que utiliza os princípios da engenharia e das ciências da vida com o objetivo de desenvolver substitutos biológicos que restaurem, mantenham e melhorem a função tecidual (LANGER; VACANTI, 1993).

A engenharia tecidual é composta basicamente pela associação de três fatores: as fontes de células, as matrizes de suporte e os fatores de crescimento tecidual. As células devem ser capazes de se proliferar e produzir matriz extracelular. Entretanto, as células não são capazes de realizar tais funções isoladamente, e dependem de fatores que sinalizam o crescimento e diferenciação celular. A matriz, por sua vez, precisa ser capaz de estabilizar, ancorar e orientar este crescimento (LAPORTA et al., 2012).

Com relação à engenharia tecidual, dois tipos celulares são considerados. As células adultas diferenciadas e as células-tronco ou progenitoras. As células adultas diferenciadas realizam atividades altamente especializadas em um determinado tipo de tecido. Apresentam a vantagem de não precisar muita manipulação para realizar sua função específica, porém sua capacidade regenerativa é limitada, o que restringe seu uso na engenharia tecidual (BIANCO; ROBEY, 2001).

As células progenitoras são definidas como células parcialmente diferenciadas que ainda mantêm algum grau de regeneração, mas podem ser

mais facilmente induzidas a realizar um tipo específico de tarefa em um determinado tecido (KOH; ATALA, 2004).

2.4 Células-tronco para o reparo de cartilagem

O termo células-tronco se refere a um grupo de células indiferenciadas com alto poder proliferativo, capazes de se dividir e originar células semelhantes ou células filhas. Esta propriedade significa que células-tronco podem produzir mais células-tronco (MCCULLOCH; TILL, 2005).

O conceito de utilizar células-tronco como base de intervenções terapêuticas é relativamente recente e sua aplicação clínica ainda é limitada. Um grande campo da medicina regenerativa esta focada em estudar a impressionante capacidade das células-tronco em reparar e regenerar tecidos lesados ou perdidos.

As células-tronco são categorizadas quanto ao tecido de origem e seu grau de potencialidade. Tipicamente estas células são classificadas em uma cadeia hierárquica linear, variado da totipotente a unipotente (SOUZA et al., 2003).

O termo células-tronco totipotente significa que estas células são capazes de se diferenciar em qualquer tecido do organismo adulto, incluindo os tecidos extrafetais. Já as células-tronco pluripotentes são capazes de se diferenciar em células das três camadas germinativas que constituem o embrião. As células-tronco multipotentes ou adultas são células capazes de se diferenciar em vários tipos celulares de uma mesma camada germinativa. Como exemplo pode-se citar as células-tronco mesenquimais (SOUZA, et al., 2003).

Recentemente, as células-tronco mesenquimais têm sido consideradas como fonte bastante interessante de células para a engenharia tecidual de cartilagem por sua fácil obtenção e grande capacidade de expansão *in vitro* (VINATIER et al., 2009).

As células-tronco mesenquimais são normalmente obtidas a partir da medula óssea ou do tecido adiposo. Sendo caracterizadas por sua capacidade de se aderir ao plástico e potencial de se diferenciar em adipócitos, condrócitos

e osteoblastos, e, além disso, expressar marcadores de expressão como CD103, CD75, CD90 e não expressar CD34, CD45 (VINATIER et al., 2009).

As células-tronco mesenquimais derivadas de gordura tem atraído muita atenção como substitutas das originadas da medula óssea. A facilidade na obtenção deste tipo de material e a alta taxa de proliferação *in vitro* tornaram as células-tronco mesenquimais derivadas de gordura uma boa fonte de células-tronco (STEWART; STEWART, 2012). Estas células já demonstraram ser capazes de se diferenciar em diversos tipos celulares na espécie equina (VIDAL et al., 2007). Além disso, quando pensamos em obter células-tronco de tecido adiposo podemos pensar também em transplante autólogo, o que vem a ser muito interessante para a Medicina Regenerativa.

As células-tronco mesenquimais derivadas de gordura apresentaram propriedades anti-inflamatórias e condroprotetoras quando aplicadas na articulação (HUURNER et al., 2012). Estas células quando associadas ao scaffold de plasma rico em plaquetas se diferenciou em condrócitos *in vivo* (XIE et al., 2012).

Wenceslau et al. (2011), estudando fetos caninos, observaram que o saco vitelino pode ser uma fonte promissora de células-tronco. As células oriundas dessas culturas se diferenciaram em tecido ósseo e cartilaginoso, além de expressarem marcador de pluripotência Oct 3/4 (em pequeno número) e caderina para endotélio vascular (VE-cadherin).

Francioli (2012) isolou do saco vitelino de equinos células progenitoras com morfologia fibroblastóide e com aderência ao plástico. Estas células se diferenciaram em osteoblastos, condrócitos e adipócitos *in vitro* e foram positivas para marcadores de células mesenquimais e pluripotência (CD105, Stro-1, Oct3/4, Nanog), sugerindo ser uma célula-tronco mesenquimal.

2.5 Matriz de suporte celular para o reparo de cartilagem articular

O objetivo do uso de uma matriz de suporte para a engenharia tecidual de cartilagem é promover um ambiente confortável que estimule a célula a produzir uma matriz cartilaginosa e substituir temporariamente a função da

matriz nativa até que uma nova cartilagem seja produzida (KOCK; van DONKELAAR; ITO, 2012).

Para cumprir esta tarefa o *scaffold* deve preferencialmente: (1) ser biodegradável de forma controlada sem a produção de substâncias tóxicas, (2) apresentar porosidade que permita a difusão de nutrientes, (3) suportar a viabilidade celular, proliferação, diferenciação e produção de matriz extracelular, (4) ser capaz de se fixar e integrar com o tecido vizinho ao defeito e (5) oferecer suporte mecânico para o tecido formado (AHMED & HINCKE, 2010).

Muitos polímeros, naturais ou sintéticos, tem sido utilizados como scaffold na engenharia tecidual de cartilagem. Muitos dos polímeros naturais são hidrogéis, que apresentam grande quantidade de água em sua constituição, tornado-se muito atrativos como matriz de suporte para tecidos cartilaginosos (KOCK; van DONKELAAR; ITO, 2012).

Algumas características como porosidade, tamanho e interconectividade dos poros são características importantes em uma matriz de suporte. Estas características estão relacionadas à migração celular, oxigenação e difusão dos nutrientes através da matriz (NUENBERGER et al., 2011). A resistência da matriz influencia na diferenciação celular e no crescimento celular em cultura (KELLY & PENDERGAST, 2006). Um incremento na resistência do material altera a morfologia dos condrócitos, que são arredondados em substratos macios e achatados quando a matriz é mais firme (GENES et al., 2004).

Hidrogéis são estruturas tridimensionais, porosas, reticuladas e com alto teor de água (AMINI; NAIR, 2012). Quando empregados para o reparo de cartilagem podem ter dois propósitos; serem utilizados como implantes permanentes substituindo a cartilagem lesada ou podem servir como carreadores de células e substâncias que estimulam o reparo da cartilagem (SPILLER; MAHER; LOWMAN, 2011).

O hidrogel pode ter origem natural ou sintética. Dentre as moléculas naturais estudadas para a produção de hidrogel, as proteínas e os polissacarídeos são os mais comuns (AMINI; NAIR, 2012). Os polissacarídeos normalmente utilizados para preparação de hidrogel são: agarose, alginato

quitosana e ácido hialurônico (BURDICK; PRESTWICH, 2011). Já as matrizes a base de proteínas mais comumente estudadas são o colágeno, a gelatina e a fibrina (SPONITIZ; BURKS, 2008).

Os hidrogéis preparados com polímeros de origem natural apresentam vantagens como a biocompatibilidade, biodegradação e interação célula-matriz (SPILLER; MAHER; LOWMAN, 2011).

Tanto métodos químicos quanto físicos de reticulação podem ser empregados para a formação do hidrogel. Porém, os métodos físicos geralmente são mais suaves para as células. As ligações iônicas ou termogelificação são exemplos de hidrogéis físicos (SPILLER; MAHER; LOWMAN, 2011; AMINI; NAIR, 2012).

Apesar da baixa força mecânica, os hidrogéis físicos são bastante interessantes para encapsular e manter células viáveis, principalmente quando não se faz necessária a descarga de peso neste material (AMINI; NAIR, 2012).

A quantidade de matriz extracelular depositada durante o processo de reparação do defeito cartilágneo depende de alguns fatores importantes, tais como: tipo de hidrogel, quantidade de célula incorporada, magnitude e frequência da descarga de peso (LEE; BADER, 1997).

Hidrogéis menos reticulados apresentam uma malha maior, o que permite maior difusão de nutrientes e células (BRYANT et al., 2004). As células se proliferam mais e depositam maior quantidade de matriz extracelular em hidrogel com menor reticulação (KISIDAY et al., 2008).

Outra característica importante de um hidrogel é a liberação controlada de fármacos ou fatores de crescimento que estimulam os tecidos vizinhos e as células encapsuladas, sejam condrócitos ou células-tronco mesenquimais. Fortier e colaboradores (2002) observaram que quando os condrócitos são co-encapsulados com fator de crescimento semelhante à insulina, o reparo condral em equinos foi melhor do que quando se utilizou apenas hidrogel com condrócito.

Os hidrogéis termorreversíveis ou associações hidrofóbicas formam uma classe interessante de hidrogel, que dependendo da temperatura pode apresentar-se em estado líquido ou estado de gel. Esta característica permite que o hidrogel seja injetado em forma líquida e que se transforme *in situ* em um

gel a temperatura corporal (RICHARDSON, PETERS, ENNETT, 2001; CHEN et al., 2007).

Vários critérios devem ser levados em conta para o desenvolvimento de um hidrogel *in situ* ideal. Apresentar solubilidade em meio aquoso, gelificar em condições fisiológicas, não produzir subprodutos tóxicos durante a gelificação e gelificar rápido o suficiente para ser clinicamente aplicável são algumas características importantes para o hidrogel *in situ* ideal (AMINI; NAIR, 2012).

Apesar dos hidrogéis fisicamente ligados apresentarem vantagem de formarem gel sem a utilização de agentes reticulantes químicos, eles apresentam algumas limitações, como por exemplo: dificuldade de se controlar o tamanho dos poros, as funcionalidades químicas, a degradação e a dissolução. Consequentemente, fornecem um desempenho inconsistente *in vivo* (DASH et al., 2011).

2.6 Quitosana

A quitosana é um aminopolissacarídeo biodegradável, hidrofílico, não tóxico e biocompatível, obtido a partir da desacetilação alcalina da quitina (MUZARELLI, 1977 apud CHENITE et al., 2001). Sua estrutura química é composta pela união de dois compostos, o 2-acetoamido-2-deoxi-D-glicopirranose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose, unidos por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$. Este polímero apresenta-se com diferentes pesos moleculares e graus de desacetilação (CHENITE et al., 2001).

A quitosana é um polímero catiônico que possui um grupamento amino e dois hidroxila na repetição glicosídica residual (AGRAWAL; STRIJKERS; NICOLAY, 2009). Os sítios de ligações presentes na quitosana proporcionam a criação de materiais versáteis, podendo alterar as propriedades biológicas ou modificar as propriedades físicas (DASCH et al., 2011).

Este polímero é estudado como biomaterial de potencial aplicação, principalmente nas áreas médica e farmacêutica. Uma vantagem de sua utilização está na disponibilidade da quitosana na natureza por meio da quitina,

podendo ser facilmente encontrada como subproduto da indústria pesqueira (TORRES et al., 2005).

A Quitosana é obtida através da desacetilação termoquímica da quitina, mas pode ocorrer de forma natural em apenas algumas espécies de Fungos (*Mucoraceae*) (ROBERTS, 1992). Vários métodos de desacetilação alcalina foram propostos, a maioria deles utilizando a hidrólise das posições acéticas com soluções de hidróxido de sódio ou de potássio (DMITRIEV; KNIREL; KOCHETKOV, 1975 apud DASH et al., 2011). O tratamento da quitina com uma solução de hidróxido de sódio a 40% em uma temperatura variando entre 90 e 120°C, por quatro a cinco horas, culmina com a N-desacetilação da quitina. A técnica utilizada para a desacetilação determina o peso molecular e o grau de desacetilação do polímero. As quitosanas geralmente comercializadas são classificadas em quitosanas de baixo peso molecular (20 a 190 kDa) ou alto peso molecular (190 a 375 kDa) (DASH et al., 2011).

A presença de grupamentos amino indica que o pH da solução altera a carga e as propriedades da quitosana (YI et al., 2005). Em pH ácido, os grupamentos amino ficam protonados e tornam a quitosana um polieletrólito catiônico solúvel em água. Por outro lado, quando em pH acima de seis, os grupamentos amino ficam deprotonados, o polímero perde sua carga e se torna insolúvel. A transição solúvel-insolúvel ocorre quando o seu valor de pKa está entre seis a seis e meio. Como o valor de pKa varia conforme o grau de desacetilação da quitosana, o grau de solubilidade da quitosana esta diretamente ligado ao seu grau de desacetilação (CHO et al., 2000).

A viscosidade das soluções de quitosana aumenta conforme o aumento da sua concentração, diminuição da temperatura e aumento do grau de desacetilação. A viscosidade da quitosana influencia nas propriedades biológicas, tais como, propriedades de cicatrização, capacidade osteogênica e de biodegradação (GERENTES et al., 2002).

A natureza aniônica da maioria dos tecidos orgânicos, dada pela alta presença de glicosaminoglicanos na matriz extracelular, interage com a característica catiônica da quitosana, permitindo assim uma boa aderência do polímero aos tecidos (CHENITE et al., 2001). Quanto maior o grau de desacetilação da quitosana, a interação entre polímero e as células é maior, através do aumento de grupamentos amino livres. Consequentemente, a

adesão e a proliferação celular depende do grau de desacetilação (DASH et al., 2011).

A biodegradação possui um importante papel no metabolismo da quitosana no organismo. Enzimaticamente, a quitosana pode ser degradada por enzimas capazes de hidrolisar as ligações glucosamina-glucosamina, glucosamina-N-acetil-glucosamina e N-acetil-glucosamina-N-acetil-glucosamina (KEAN; THANOU, 2009). Outras formas de degradação da quitosana como a reação de oxi-redução (HSU; DON; CHIU, 2002) e a degradação por radicais livres (ZOLDNERS; KISELEVA; KAIMINSH, 2005) foram sugeridas, mas estes fenomenos parecem ter papel pouco importante na degradação *in vivo* (DASH et al., 2011).

A velocidade da degradação da quitosana aumenta conforme o grau de desacetilação diminui (HIRANO; TSUCHIDA; NAGAO, 1989; SASHIWA et al., 1991). Outros fatores que parecem afetar a degradação da quitosana é a disposição homegênia dos grupos acetil (AIBA, 1992; SUH; MATTHEW, 2000;) e o peso molecular (TOMIHATA e IKADA, 1997; ZHANG; NEAU, 2001; HUANG; KHOR; LIM; 2004).

A degradação muito rápida da quitosana pode causar acúmulo de aminossacarídeos, desencadeando resposta inflamatória. Enquanto a quitosana com baixo grau de desacetilação pode causar resposta inflamatória aguda, a quitosana com alto grau de desacetilação parece induzir resposta inflamatória mínima(DASH et al., 2011).

Pouco se sabe sobre a degradação da quitosana *in vivo*. O mecanismo de ação não está completamente elucidado, porém os estudos indicam que o processo de degradação e eliminação está bastante associado ao peso molecular (GUO et al., 2006).

A citocompatibilidade da quitosana já foi observada *in vitro* utilizando-se diversos tipos celulares, tais como: miocárdio, células endoteliais e epiteliais, fibroblasto, hepatócito, condrócito e queratinócito (CHATELET; DAMOUR; DOMARD, 2001).

Em estudo avaliando a citocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* de filmes de quitosana com fibroblastos e queratinócitos, o grau de desacetilação não pareceu exercer efeito significativo. Testes clínicos, utilizando biomateriais a

base de quitosana, não provocaram nenhum tipo de resposta inflamatória ou alérgica em seres humanos (CHATELET; DAMOUR; DOMARD, 2001).

Apesar da quitosana ser considerada um polímero não tóxico e biocompatível (THANOU; VERHOEF; JUNGINGER, 2001), certas alterações podem torná-la mais ou menos tóxica, e qualquer reagente residual deve ser removido cuidadosamente (DASH et al., 2011).

Molinaro e colaboradores (2002) estudaram o efeito da aplicação subcutânea de quitosana/glicerol fosfato em ratos. Neste estudo foi observada uma resposta inflamatória de caráter agudo. Os autores notaram que o grau de desacetilação da quitosana parece influenciar no processo inflamatório, sendo que quanto maior o grau de desacetilação, menor a resposta inflamatória.

Interessantemente, a quitosana parece exercer um efeito tóxico para bactérias (JUMAA; FURKERT; MULLER, 2002), fungos (GUO et al., 2006) e parasitas (PUJALS et al., 2008).

O efeito antibacteriano parece ser mais pronunciado em bactérias gram positivas, como *Staphylococcus aureus*. Apesar do mecanismo de ação ainda não estar completamente elucidado, algumas teorias são propostas. Uma das teorias mais aceitas é que as cargas positivas da molécula de quitosana interajam com as cargas negativas da parede bacteriana e interfiram na sua funcionalidade (FENG et al., 2000). Outra hipótese seria a ligação da quitosana com o DNA da bactéria, impedindo a expressão de mRNA e a síntese de proteínas (HADWIGER et al., 1986). Cuero, Osuji e Washington (1991) propuseram que a capacidade antibacteriana da quitosana seria através da quelação de metais, supressão da formação de esporos e ligação com nutrientes essenciais para o crescimento bacteriano.

A combinação da boa biocompatibilidade da quitosana, sua atividade antibacteriana intrínseca e ser processada em diversas formas, torna a quitosana um bom material para ser utilizado como matriz na engenharia tecidual (DASH et al., 2011).

O potencial do uso da quitosana como biomaterial para a engenharia tecidual, fornecendo estruturas com tamanhos de poros e taxa de degradação conhecidos, torna esta substância particularmente importante para a regeneração óssea e de cartilagem. Porém, esforços visando aumentar as

propriedades mecânicas dos compostos a base de quitosana são fundamentais para sua aplicação clínica (DASH et al., 2011).

A quitosana tem sido utilizada como matriz de suporte para os estudos de reparo de cartilagem articular devido a sua formulação ser muito semelhante aos glicosaminoglicanos presentes na matriz extracelular da cartilagem (SUH e MATTHEW, 2000; LAHIJI et al., 2000).

Ahmaji e Bruijn (2007) observaram que culturas de células-tronco mesenquimais de ovinos, que foram suplementadas com meio de cultivo contendo 2% de quitosana, apresentaram um incremento na proliferação celular. Esse mesmo efeito também foi observado por outros autores que utilizaram culturas com diferentes tipos celulares (INUI et al., 1995; HOWLING et al., 2001). O mecanismo de como a quitosana estimularia a proliferação celular não é conhecido, porém parece envolver mecanismos de pontecialização dos efeitos dos fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaqueta (INUI et al., 1995).

2.7 Hidrogel de quitosana/glicerol fosfato

A formação de um hidrogel deve levar em consideração vários critérios. O processo de gelificação deve ser compatível com as células, bem como a estrutura do hidrogel e sua composição química. O tempo de degradação do hidrogel deve ser próximo ao tempo de formação do tecido e os produtos de sua degradação não devem ser tóxicos para as células encapsuladas (NICODEMUS; BRYANT, 2008).

O hidrogel de quitosana pode ser produzido de diversas formas. Para cada processo, a quitosana é reticulada de forma física ou química, formando o hidrogel. A reticulação física reversível criada pela interação eletrostática, ao invés da reticulação química, diminui o potencial de toxicidade dos reagentes e outros efeitos indesejáveis (DASH et al., 2011). A formulação da quitosana em forma de hidrogel permite associar a este polímero características bastantes interessantes dos hidrogéis que são: capacidade de absorver grande

quantidade de água, ser macio, maleável e compatível com a maioria dos tecidos vivos. Sua característica viscoelástica evita dano ao tecido vizinho quando implantado *in vivo* (DASH et al., 2011).

Para se construir um hidrogel estável, duas condições são necessárias: as interações entre as cadeias devem ser fortes o suficiente para formar pontos de junções semi permanentes e a rede deve ser capaz de realizar troca de moléculas de água com o polímero. Hidrogéis de quitosana que apresentam estas características podem ser produzidos através de ligações não covalentes (BERGER et al., 2004; BOUCARD; VITON; DOMARD, 2005). Entretanto as aplicações dos hidrogéis de quitosana são limitadas devido a sua fraca força mecânica e dissolução incontrolada (PEPPAS, 1986).

A associação de uma solução de quitosana com o sal glicerol fosfato forma um hidrogel termossensível. Os grupamentos fosfato, do sal de glicerol fosfato, neutraliza o grupamento amônia da quitosana aumentando a característica hidrofóbica e criando ligações de hidrogênio entre as cadeias de quitosana em temperaturas elevadas (CHENITE et al., 2000).

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Hidrogel de Quitosana/Glicerol Fosfato

O hidrogel de Quitosana/glicerol fosfato foi preparado pelo Laboratório de Biomateriais Poliméricos do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, com a colaboração do Prof. Dr. Luiz Henrique Catalani e da Dra. Vânia Blasques Bueno.

3.1.1 Purificação e desacetilação da quitosana

Com o objetivo de se retirar sais remanescentes da desacetilação, impurezas e materiais insolúveis, a quitosana passou por um processo de purificação através de filtração. Um grama de quitosana, de peso molecular médio e grau de desacetilação de $76 \pm 10\%$ (Aldrich, Alemanha), foi diluída em 300 ml de ácido acético (0,5M), mantendo-se a suspensão sob agitação por 24 horas em temperatura ambiente. Depois de diluída a solução foi filtrada em papel filtro sob pressão positiva. A solução filtrada foi precipitada adicionando-se base de hidróxido de sódio (NaOH) ao meio. O precipitado foi separado do sobrenadante através de filtração e lavado com água destilada, seguido de imersão em metanol e secagem a temperatura ambiente.

Para a desacetilação da quitosana foi utilizado tratamento alcalino com hidróxido de sódio (NaOH). Um grama de quitosana foi suspenso em 20 ml de solução de NaOH a 40%, foi aquecido a 80°C , sob agitação mecânica por 3 horas. O material obtido foi filtrado e o material retido no filtro lavado com água destilada até atingir a neutralidade (CARDOSO, 2008).

O grau de desacetilação foi medido por análise elementar no analisador Perkin Elmer CNH, como descrito por Brant (2008).

3.1.2 Preparação, esterilização e caracterização do hidrogel quitosana/glicerol fosfato

A preparação do hidrogel termossensível de quitosana/glicerol fosfato foi realizado como descrito por Chenite e colaboradores (2000). Para isso, 200mg de quitosana, desacetilada e purificada como descrito anteriormente, foi dissolvida em 9 ml de ácido clorídrico 0,1M, sob agitação. Para formação do gel, adicionou-se a esta solução 560mg de glicerol fosfato diluído em 1 ml de água destilada.

Foram realizadas duas formas de esterilização do hidrogel: esterilização por radiação gama e por autoclavagem líquida regular.

Para a esterilização por radiação gama, a solução pronta do hidrogel (quitosana associada ao β -glicerol fosfato) foi acondicionada em tubos Falcon de 50 ml.

A esterilização por autoclavagem foi realizada antes da mistura da solução de quitosana com a de β -glicerol fosfato. A solução de quitosana foi acondicionada em frasco de Duran e a solução autoclavada a 121°C por 15 minutos. O β -glicerol fosfato foi filtrado em filtro de 0.22 μ m. A mistura das duas soluções foi realizada de forma estéril em fluxo laminar.

Depois de preparado, o hidrogel de quitosana/glicerol fosfato foi caracterizado quanto a coloração, turbidez e consistência do gel.

3.1.3 Determinação do tempo de gelificação e da termorreversibilidade do hidrogel de quitosana/glicerol fosfato

Para determinar o tempo que o hidrogel de quitosana/glicerol fosfato leva para chegar ao estado de gel, o teste usado foi o teste de inversão do tubo proposto por Gupta e colaboradores (2006). Dessa forma, 900 μ L da solução de quitosana e 100 μ L da solução de glicerol fosfato aquecidos a 37°C, foram gentilmente homogenizados e colocados em banho-maria a 37°C.

Em intervalos de dois, cinco, dez, 15 e 20 minutos os tubos eram invertidos para observar o escoamento. O momento em que a solução não escoava mais era considerado o tempo de gelificação.

Os hidrogéis termorreversíveis são aqueles capazes de realizar a transição líquido/gel conforme a variação de temperatura. Com o objetivo de observar a termorreversibilidade do hidrogel de quitosana/glicerol fosfato, a mesma formulação utilizada anteriormente foi aquecida a 37°C por tempo suficiente para a formação do gel, e posteriormente resfriada a 4°C, em uma cuba contendo água com gelo picado.

3.1.4 Análise microestrutural por Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada em colaboração com a Dra Rose Eli Grassi Rici do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres do Departamento de Cirurgia da FMVZ/USP.

Para a observação da estrutura física do hidrogel de quitosana/glicerol fosfato foi utilizada a técnica de criodesidratação do material. Aproximadamente 1ml de quitosana/glicerol fosfato foi aquecida a 37°C para formação do gel. Após gelificação, o material foi submetido a congelamento com nitrogênio líquido e posteriormente criodesidratado. O material foi submetido a revestimento metálico *sputting* com ouro no aparelho metalizador EMITECH K550.

3.2 Cultivo e caracterização das células-tronco de gordura, saco vitelínico, e polpa dentária

3.2.1 Células-tronco de saco vitelínico

As células-tronco de saco vitelínico foram gentilmente cedidas pelo Dr. André Luis Francioli (FMVZ/USP).

As células-tronco de saco vitelino foram cultivadas e expandidas em meio de cultivo α -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino definido

(Hyclone, estado, país) e 1% penicilina/estreptomicina (Invitrogen, CA, EUA) e incubadas a uma temperatura de 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

3.2.2 Células-tronco de tecido adiposo de equinos

O tecido adiposo foi coletado de cadáver recém eutanasiado por condições humanitárias. Aproximadamente 50g de tecido adiposo foram coletados da base da cauda, acondicionados em coletor universal estéril e encaminhado para o Laboratório de Células-tronco do Setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres do Departamento de Cirurgia da FMVZ/USP.

Aproximadamente três centímetros cúbicos deste material foi retirado e lavado extensivamente com tampão fosfato-salina (PBS) contendo 5% de solução antibiótica e antimicótica (penicilina, esteptomicina e anfotericina B – Sigma Alderich, St Louis, EUA). Após a lavagem o material foi fragmentado em pequenos pedaços com auxílio de lâmina de bisturi e adicionou-se collagenase tipo 1 (1mg/mL) (Invitrogen, Carlsbad, EUA) e o material foi incubado por uma hora à 37,0° C em banho-maria, com agitações a cada dez minutos.

Para inativação da collagenase foi adicionado meio α -DMEM contendo 10% de soro fetal bovino. O material foi centrifugado a 1000 rpm por cinco minutos. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e o precepitado novamente lavado com meio α -DMEM (Lgc Biotecnologia, São Paulo, Brasil) adicionado de 10% de soro fetal bovino (Lgc Biotecnologia), 1% de L-glutamina (Invitrogen), 1% de aminoácidos não essenciais (Invitrogen) e 1% de solução antibiótico-antimicótico (100 UI/mL penicilina, 100µg/mL estreptomicina, 25 µg/mL anfotericina B, Sigma-Alderich). Em seguida o material foi colocado em placa petri de 35mm e mantido a 37,0° C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. O meio de cultivo foi trocado a cada três dias. Quando observada confluência de 80% as células eram expandidas e congeladas para serem futuramente utilizadas nos experimentos.

3.2.3 Células-tronco de polpa dentária

A mandíbula de um equino eutanasiado por condições humanitárias foi cirurgicamente dissecada. Após a retirada da mandíbula, o ramo horizontal da mandíbula foi cortado em serra de fita em secções de aproximadamente dois centímetros em condições de antissepsia. As secções foram acondicionadas em recipiente estéril e encaminhadas para a retirada dos segmentos dentários em fluxo laminar. No fluxo laminar, os segmentos dentários foram retirados com auxílio de pinça anatômica e agulha hipodérmica, sendo colocados em tubos cônicos de 15 mL contendo α -DMEM e 5% de solução antibiótica-antimicótica. Os tubos foram acondicionados em caixa térmica contendo gelo e encaminhados para o Laboratório de Células-tronco do Setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres do Departamento de Cirurgia da FMVZ/USP.

No laboratório, em fluxo laminar, as secções dentárias foram lavadas com solução PBS acrescido de 5% de solução antibiótica-antimicótica por no mínimo três vezes, para posterior retirada da polpa dentária com auxílio de pinça anatômica. A polpa dentária foi fragmentada com auxílio de lâmina de bisturi e adicionou-se collagenase tipo I (3mg/mL) (Invitrogen) e o material foi mantido em banho-maria a 37° C, por uma hora, com agitações a cada dez minutos para favorecimento da digestão do tecido.

Para a inativação da collagenase foi adicionado meio de cultivo α -DMEM com 10 % de soro fetal bovino e o material foi centrifugado a 1000 rpm por cinco minutos, o sobrenadante foi descartado e o botão celular ressuspendido em meio de cultivo α -DMEM (Lgc Biotecnologia) contendo de 10% de soro fetal bovino (Lgc Biotecnologia), 1% de L-glutamina (Invitrogen), 1% de aminoácidos não essenciais (Invitrogen) e 1% de solução antibiótico-antimicótico (100 UI/mL penicilina, 100 μ g/mL estreptomicina, 25 μ g/mL anfotericina B, Sigma Alderich) e colocado em placas de petri de 35mm.

As placas de cultivo foram colocadas em estufa a 37,0° C com umidade relativa próxima de 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂. O meio foi trocado a cada três dias. Quando observada confluência de 80% as células eram replaqueadas.

3.3 Cultivo das células de eqüinos em matriz tridimensional de quitosana/glicerol fosfato

Para o cultivo das células na matriz de quitosana/glicerol fosfato, aproximadamente 5×10^5 células-tronco de cada tipo celular (gordura, saco vitelínico e polpa de dente) foram ressuspendidas em 50 μ L de glicerol fosfato e misturado imediatamente a 450 μ L de quitosana. Esta solução foi acondicionada em tubo cônico de 15 mL e aquecida a 37,0° C. Depois de formado o gel, 500 μ L de meio de cultivo foi adicionado e mantido em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. O meio foi trocado a cada três dias.

De cada tipo celular foram feitos três tubos, sendo um incubado por 24 horas, outro por 7 dias e outro por 21 dias. Da mesma forma, três tubos contendo apenas biomaterial foram incubados nestes mesmos períodos e serviram como controle.

3.3.1 Análise Histológica

Depois de incubado, o material foi encaminhado para o Laboratório de Histologia do Setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da FMVZ/USP. O material foi fotografado e o aspecto macroscópico anotado. Os procedimentos histológicos foram realizados de acordo com os protocolos descritos e estabelecidos por Tolosa e colaboradores (2003).

As lâminas foram preparadas desidratando as amostras em séries crescentes de etanóis (50%, 70%, 80%, 90% e três passagens de álcool absoluto) por vinte minutos cada. A diafanização foi feita com duas passagens em xilol por vinte minutos cada, e então o material foi incluído em parafina líquida a 60°C (Histosec - Merck Chemicals®, Darmstadt, Alemanha) por 2 horas, sendo confeccionado blocos retangulares com base aproximadamente

de 2x3 cm. Após inclusão os blocos foram desbastados, imersos em água e mantidos em geladeira por no mínimo 12 horas para hidratação do material.

Os blocos foram cortados em micrótomo automático Leica RM2165 (Leica, Wetzlar, Alemanha) em cortes de cinco e dez micrometros de espessura. Os cortes obtidos foram colocados em lâminas histológicas lisas e deixados em estufa a 60°C durante 12 horas para adesão do material à lâmina.

Os cortes de cinco micrometros de espessura foram mergulhados em xilol por dez minutos, totalizando três passagens. Em seguida, o material foi reidratado em séries decrescente de etanol (100%, 95% e 70%), três minutos cada passagem e as lâminas lavadas em água corrente por cinco minutos.

Em seguida, foram realizadas colorações de hematoxilina-eosina (HE), picrossírius e tricromo de Masson, como descrito a seguir.

Todas as lâminas passaram pelo mesmo processo de finalização, sendo realizadas passagens em álcool 95%, álcool 100%, (duas passagens), e xilol (duas passagens), três minutos cada passagem.

Depois de coradas, as lâminas foram montadas com Permount® (Fischer Scientific, Pittsburgh, USA) e, posteriormente fotomicrografadas em microscópio Olympus BX 60 acoplado a câmera Axio CAM HRc.

Para a técnica de coloração de hematoxilina/eosina, as lâminas foram imersas no corante hematoxilina por cinco minutos e lavada em água corrente por cinco minutos. Após lavagem, as lâminas foram imersas no corante eosina por 30 segundos e submetidas a três banhos em água destilada.

Para coloração de Picrossírius as lâminas foram imersas em corante de picrossírius por 45 minutos, aquecido a 60°C e lavadas com água corrente por cinco minutos.

A coloração tricromo de Masson foi realizada iniciando-se com a preparação da coloração de fundo com hematoxilina férrica por cinco minutos. O excesso de corante foi retirado e as lâminas lavadas por cinco minutos em água corrente.

Posteriormente as lâminas foram imersas na primeira solução de corantes denominada solução A (fucsina ácida e escarlata de Biebrich) por cinco minutos, sendo em seguida lavada em água corrente por igual tempo. Na sequência, as lâminas foram imersas por dez minutos na solução B (ácido fosfotungstico, ácido fosfomolibídico e água destilada). O excesso do corante

foi retirado em água destilada e as lâminas imersas na solução C (azul de anilina) por dez minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente por cinco minutos e realizou-se uma passagem de três minutos em solução de ácido acético 1%, para novamente serem lavadas em água corrente por dez minutos.

3.3.2 Microscopia e Fotomicrografia

As lâminas foram analisadas e fotomicrografadas em microscópio Olympus BX 60 acoplado a câmera Axio CAM HRc. Para avaliação foram utilizadas as objetivas de 10x, 20x e 40x que permitiu uma magnificação de 100, 200 e 400 vezes respectivamente.

As lâminas coradas com a técnica de hematoxilina/eosina foram avaliadas observando-se a disposição celular, morfologia celular e aspecto do biomaterial. Foram observados dez campos na objetiva de 40 vezes, contando-se a quantidade de células por campo.

As lâminas coradas com a técnica de Picrossírius foram submetidas à luz polarizada, buscando a demarcação de pontos vermelhos, azuis ou verdes conforme o tipo de fibras colágenas depositadas.

As lâminas coradas com a técnica de Tricromo de Masson foram avaliadas quanto à presença de cor azul que indica a deposição de colágeno.

As lâminas foram analisadas como um todo nos aumentos anteriormente descritos e os campos mais representativos foram fotomicrografados.

3.3.3 Determinação da quantidade de células presentes no biomaterial

A determinação da quantidade de células presentes no biomaterial foi realizada semelhante ao descrito por Babalola e Bonassar (2010), utilizando-se as lâminas coradas pela técnica de hematoxilina/eosina.

Contou-se a quantidade de células presentes em dez campos aleatórios, em objetiva de 40x, de três cortes não seriados, de cada cultivo em cada momento analisado.

O número de células dos cultivos foi avaliado pelo teste de Kruskall-Wallis e em caso de diferença significativa ($p < 0,05$) as médias entre tratamentos foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney, pelo programa Minitab16.

4 RESULTADOS

4.1 Hidrogel de quitosana/glicerol fosfato

4.1.1 Purificação e desacetilação da quitosana

A purificação da quitosana revelou uma grande quantidade de impurezas presentes no produto de origem comercial. Estes resíduos foram facilmente separados pelo processo de filtração.

O processo de desacetilação da quitosana permitiu um aumento do grau de desacetilação. O produto comercial apresentava grau de desacetilação de $76 \pm 10\%$, e a solução submetida a desacetilação térmica alcalina atingiu grau de desacetilação de $92 \pm 2\%$.

4.1.2 Preparação, esterilização e caracterização do hidrogel de quitosana/glicerol fosfato

A preparação do hidrogel de quitosana/glicerol fosfato foi realizada de forma simples e sem necessitar recursos especiais. O β -glicerol fosfato foi facilmente homogeneizado à quitosana através de agitação suave.

O material encaminhado para esterilização por radiação gama retornou em estado de gel, o que dificultou as demais análises, enquanto que a esterilização da solução de quitosana através da autoclave foi satisfatória e não alterou as propriedades macroscópicas da solução.

O hidrogel de Quitosana/Glicerol Fosfato, quando em estado líquido, apresentou alta viscosidade, coloração amarelada e límpida. Em estado de gel observou-se leve turvação do meio. O hidrogel apresentou baixa consistência, mas capaz de manter a forma quando retirado do tubo (Figura 1).

Figura 1 – Imagem mostrando características macroscópicas do hidrogel Quitosana/Glicerol Fosfato

Fonte: (Zanotto, G. M., 2012)

Legenda: (A). Hidrogel de quitosana/glicerol fosfato na forma líquida (B). Hidrogel de quitosana/glicerol fosfato gelificado em tubo falcon (C). Hidrogel de quitosana/glicerol fosfato mantendo o formato fora do tubo (D).

4.1.3 Determinação do Tempo de Gelificação e da Termorreversibilidade do hidrogel de quitosana/glicerol fosfato

O teste de inversão do tubo revelou que o tempo gasto para a transição do estado líquido para o estado sólido do hidrogel de quitosana/glicerol fosfato é superior a 20 minutos. Quando resfriado, o hidrogel de quitosana/glicerol fosfato não retornou ao seu estado líquido.

4.1.4 Análise microestrutural por Microscopia Eletrônica de Varredura

O hidrogel de quitosana/glicerol fosfato apresentou estrutura laminar, padrão de reticulação irregular formando poros de diversos tamanhos (Figura 2).

Figura 2 – Microscopia Eletrônica de Varredura evidenciando a reticulação do hidrogel de Quitosana/Glicerol Fosfato

Fonte: (Zanotto, G. M., 2012)

4.2. Cultivo e caracterização das células-tronco de gordura, saco vitelínico, e polpa dentária

Os três tipos celulares obtidos de fontes diferentes, tecido adiposo, polpa dentária e saco vitelínico apresentaram comportamento semelhante em cultura. Foi observada adesão à placa e morfologia fibroblastóide alongada, fusiforme, pontiaguda e com núcleo grande e centralizado (Figura 3).

Figura 3- Fotomicrografia mostrando a morfologia das células-tronco de equinos

Fonte: (Zanotto, G. M., 2012)

Legenda: (A) Tecido adiposo, (B) polpa dentária, (C) saco vitelínico. Aumento de 10X.

4.3 Cultivo das células de equinos em Matriz Tridimensional de quitosana/glicerol fosfato

4.3.1 Análise Histológica

Após a adição do meio de cultivo no hidrogel de quitosana/glicerol fosfato, observou-se boa penetração deste na matriz, evidenciado pela coloração rosa característica do meio de cultivo em toda a extensão do tubo.

O aspecto macroscópico do hidrogel de quitosana/glicerol fosfato incubado por 24 horas com as células de saco vitelínico, gordura e polpa de dente, evidenciou um hidrogel levemente turvo, sem alteração na coloração e que se desfazia facilmente.

Após sete dias de cultivo as características físicas do hidrogel permaneciam semelhantes às observadas com 24 horas. Porém, o gel parecia discretamente mais firme.

Com 21 dias de cultivo, o hidrogel de quitosana/glicerol fosfato apresentava aspecto levemente mais turvo do que nos momentos anteriores. Observou-se também uma retração do hidrogel e liberação de líquido que se misturou ao meio (Figura 4).

Figura 4 – Imagem macroscópica do Hidrogel de quitosana/glicerol fosfato incubado com as células-tronco de diferentes fontes em diferentes períodos

Fonte: (Zanotto G. M., 2012)

Legenda: (A) 24 horas, (B) 21 dias.

4.3.2 Microscopia e Fotomicrografia

A coloração de Hematoxilina/Eosina permitiu a boa visualização das células e da matriz de quitosana/glicerol fosfato.

Com 24 horas de incubação foi possível observar uma disposição celular homogênea por todo o hidrogel. A morfologia celular predominante era de células arredondadas. Estas características foram observadas nos três tipos celulares cultivados (Figura 5).

Figura 5— Fotomicrografia da análise histológica dos cultivos de células-tronco de equinos em hidrogel de quitosana/glicerol fosfato por 24 horas

Fonte: (Zanotto, G. M., 2012)

Legenda Os hidrogéis foram submetidos a protocolos rotineiros de histologia e submetidos a coloração de Hematoxilina/Eosina. (A, B, C) Células-tronco de gordura: (D, E, F) células-tronco de saco vitelínico: (G, H, I) células-tronco de polpa dentária. Em (A, D, G) aumentos de 10x, (B, E, H) 20x e (C, F, I) 40x.

Depois de sete dias de incubação não foi possível observar alteração na morfologia celular. Porém a disposição das células era diferente, mostrando

maior quantidade de células nos bordos do hidrogel. Não houve diferença entre os tipos celulares cultivados (Figura 6).

Figura 6 - Fotomicrografia da análise histológica de cultivos das células-tronco de equinos em hidrogel de quitosana/glicerol fosfato por sete dias.

Fonte: (Zanotto, G. M.)

Legenda: Os hidrogéis foram submetidos a protocolos rotineiros de histologia e submetidos a coloração de Hematoxilina/eosina A,B, C), células-tronco de gordura; D, E, F) células-tronco do saco vitelínico G, H, I) células-tronco de polpa dentária Em (A, D, G) aumentos de 10x, (B, E, H) 20x e (C, F, I), 40x

Aos 21 dias de incubação as células mantinham as características morfológicas citadas anteriormente nos três tipos celulares cultivados.

Observou-se uma maior concentração celular nos bordos do hidrogel semelhante ao descrito no momento anterior (Figura 7).

Figura 7 – Fotomicrografia da análise histológica d cultivos das células-tronco de equinos em hidrogel de quitosana/glicerol fosfato por 21 dias

Fonte: (Zanotto, G.M, 2012)

Legenda: Os hidrogéis foram submetidos a protocolos rotineiros de histologia e submetidos a coloração de Hematoxilina/eosina A,B, C), células-tronco de gordura; D, E, F) células-tronco do saco vitelínico G, H, I) células-tronco de polpa dentária. Em (A, D, G) aumentos de 10x, (B, E, H), 20x e (C, F, I), 40x.

O aspecto do hidrogel variou conforme os momentos avaliados. Com 24h de incubação foi possível observar poros com tamanhos regulares. Nos momentos seguintes foi observado poros de tamanhos irregulares e quebra da reticulação do hidrogel de quitosana/glicerol fosfato e as alterações mais marcantes foram encontradas com 21 dias.

A coloração de picrossírius corou o biomaterial com a cor vermelha característica. Porém, quando submetida à luz polarizada não foi possível notar nenhuma coloração vermelha, azul ou verde que indicaria a presença de colágeno (Figura 8).

Figura 8 – Fotomicrografia da análise histológica de cultivos das células-tronco de equinos em hidrogel de quitosana/glicerol fosfato corados pela técnica de Picrossírius.

Fonte: (Zanotto, G. M.)

Legenda: (A, B, C) Células-tronco de gordura (D, E, F), células-tronco de saco vitelino, (G, H, I) células-tronco de polpa dentária. (A, D, G,) 24 horas, (B, E, H) sete dias e (C, F, I, L) 21 dias.

Com a técnica de Tricromo de Masson não foi observada deposição de fibras de colágeno indicada pela ausência de fibras coradas em verde (Figura 9).

Figura 9 – Fotomicrografia da análise histológica de cultivos de equinos em hidrogel de quitosana/glicerol fosfato corados pela técnica de tricromo de Masson.

Fonte: (Zanotto, G. M.)

Legenda: Legenda: (A, B, C) Células-tronco de gordura (D, E, F), células-tronco de saco vitelínico, (G, H, I) células-tronco de polpa dentária. (A, D, G,) 24 horas, (B, E, H) sete dias e (C, F, I, L) 21 dias.

4.3.3 Determinação da quantidade de células presentes no biomaterial

Com exceção das células-tronco de saco vitelínico, que não diferiram no momento 24 horas e sete dias, foi possível verificar que as concentrações celulares diminuíram ao longo do tempo.

As células-tronco de gordura apresentaram uma queda mais acentuada no número de células por campo em relação aos demais tipos celulares.

Pôde-se observar que apesar da quantidade de células presentes no momento 24 horas diferir entre os tipos celulares, no momento sete dias as culturas apresentavam-se com quantidades de células semelhantes. Aos 21 dias, as células-tronco de polpa dentária e de gordura diferiram estatisticamente. Os resultados estão expressos na tabela abaixo.

Tabela 1: Análise estatística da média $\pm$ erro padrão da média para a contagem do número de células por campo de visão em objetiva de 40x das diferentes culturas celulares nos diferentes momentos.

Materiais	Tempo (dias)		
	24 horas	7	21
Tecido Adiposo	6,60 $\pm$ 0,48 Aa	4,27 $\pm$ 0,27 Ab	0,90 $\pm$ 0,23 Bc
Saco Vitelínico	3,47 $\pm$ 0,21 Ca	3,73 $\pm$ 0,37 Aa	1,17 $\pm$ 0,19 ABb
Polpa Dentária	4,83 $\pm$ 0,22 Ba	3,50 $\pm$ 0,33 Ab	1,73 $\pm$ 0,22 Ac

Fonte: (Zanotto, G. M., 2012)

5 DISCUSSÃO

Uma grande quantidade de material insolúvel foi observada durante o processo de purificação da quitosana. Este problema tem sido descrito na literatura e se deve ao fato de que a técnica de desacetilação da quitina normalmente utilizada é a suspensão em meio alcalino, que é uma reação heterogênea (SIGNINI; CAMPANA FILHO, 1998). Esta característica pode limitar o uso deste material para pesquisas *in vivo*, uma vez que para aplicações biomédicas é necessário um grau ultra puro do material (DORNISH et al., 1997).

As características funcionais da quitosana, como por exemplo: viscosidade, propriedades mecânicas e porosidade de suas membranas são determinadas, entre outros, pelo grau de desacetilação e peso molecular do polímero. O processo de obtenção da quitosana através da desacetilação da quitina pode ser realizado de diversas formas, a mais comum é através da desacetilação heterogênea em meio alcalino. Uma desvantagem deste processo é a baixa acessibilidade aos sítios reativos da quitina, o que compromete a uniformidade do produto (CARDOSO, 2008).

No presente estudo utilizou-se quitosana com grau de desacetilação de $76\pm 10\%$ (medido por análise elementar na central analítica do IQ/USP). Com objetivo de elevar o grau de desacetilação, a quitosana foi submetida a desacetilação em meio alcalino. O grau de desacetilação final foi de $92\pm 2\%$, semelhante ao descrito por outros autores para a preparação do hidrogel de quitosana/glicerol fosfato (CHENITE et al., 2000; QIU et al., 2011; GANJI; ABDEKHODAIE; RAMAZANI, 2007).

A massa molar viscosimétrica média, medida por viscosimetria capilar, foi de $1,53 \times 10^5$. Apesar da falta de consenso, a medida de viscosidade é amplamente empregada e aceita como medida de massa molar média do polímero (CARDOSO 2008).

O hidrogel de quitosana/glicerol fosfato apresentou alta viscosidade, coloração amarelada e límpida em estado líquido. Quando aquecido e formado o gel, apresentou-se turvo.

A alta viscosidade do hidrogel em estado líquido facilita sua deposição durante procedimentos artroscópicos, evitando que o líquido esorra. Entretanto, uma alta viscosidade pode dificultar a homogeneização das células no biomaterial. Este fato não foi observado, uma vez que as células encontravam-se homogeneamente distribuídas com 24 horas de incubação.

A turbidez do hidrogel de quitosana/glicerol fosfato está associada ao seu grau de desacetilação, homogeneidade na distribuição dos monômeros (BERGER et al., 2008) e peso molecular (ZHOU et al., 2011). Desta forma, a turbidez observada com a formação do hidrogel era esperada, devido ao alto grau de desacetilação obtido na preparação do polímero.

O hidrogel de quitosana/glicerol fosfato apresenta uma micro estrutura irregular e na avaliação por microscopia eletrônica de varredura desse trabalho evidenciou estrutura laminar e padrão de reticulação irregular, contendo poros de diversos tamanhos, corroborando com os achados de Crompton et al. (2009) e Abarrategi et al. (2010).

Quando recém-formado o hidrogel de quitosana/glicerol fosfato apresenta uma reticulação frágil, mas durante a incubação sua reticulação se fortalece (QIU et al., 2011). Esta característica foi evidenciada quando analisamos os hidrogéis incubados por 24 horas, 7 dias e 21 dias. Apesar de não terem sido realizados testes mecânicos específicos, os biomateriais incubados por sete dias mostravam-se nitidamente mais firmes do que os incubados por 24 horas. Entretanto, aos 21 dias o hidrogel apresentou alteração em seu volume e liberação de uma fração líquida junto ao meio. Estas características sugerem que o hidrogel de quitosana/glicerol fosfato apresentava acentuada degradação ao final do experimento. Isto pode ser observado também através da histologia, onde é possível ver reticulações heterogêneas e quebra da arquitetura do hidrogel. A degradação enzimática *in vitro* do hidrogel de quitosana/glicerol fosfato pode ocorrer em apenas nove dias (MOURA et al., 2009).

Os dois protocolos de esterilização utilizados no presente trabalho mostraram algumas limitações. Inicialmente o hidrogel de quitosana/glicerol fosfato foi submetido à esterilização por radiação gama. Apesar da esterilização por radiação gama não gerar calor, durante o processo de esterilização o material gelificou. Provavelmente isto ocorreu por ser uma

solução termossensível, e durante o processo a solução pode ter sido exposta a temperatura acima da temperatura crítica de polimerização.

A esterilização da solução de quitosana em autoclave e a filtragem do β -glicerol fosfato foi uma maneira fácil e prática de se obter um material estéril ao final do processo. Outra vantagem é que esta técnica pode ser facilmente realizada em um hospital, situação diferente da esterilização por radiação gama.

Algumas considerações devem ser feitas com relação ao processo de esterilização do hidrogel de quitosana/glicerol fosfato. Segundo San Juan et al. (2007), que estudaram o efeito de diferentes tipos de esterilização sobre as características físicas da quitosana, tanto a esterilização por radiação gama como por autoclave alteraram o peso molecular do polímero. Entretanto, apesar dos autores terem estudado soluções de quitosana com diferentes graus de desacetilação, não foi citada qualquer interferência do grau de desacetilação neste processo.

Jarry et al. (2002) estudaram o efeito da esterilização por autoclave e por radiação gama sobre o hidrogel de quitosana/glicerol fosfato quando adicionado aditivos polióis a solução. Os autores citaram que apesar de não ter sido completamente eliminada, a adição de polióis no hidrogel permitiu uma menor despolimerização deste quando autoclavado. Este fato não foi observado durante a esterilização por radiação gama. Outro dado apontado pelos autores foi que o hidrogel de quitosana/glicerol fosfato quando adicionado de poliol tem sua força mecânica aumentada.

As interações responsáveis pela transição do estado líquido para o estado de gel do hidrogel de quitosana/glicerol fosfato são hipotetizadas como: repulsão eletrostática entre as cadeias de quitosana carregadas; atrações eletrostáticas entre cargas opostas do grupamento amina e do grupamento fosfato; e a atração hidrofóbica e criação de pontes de hidrogênio entre as cadeias de quitosana (CHENITE et al., 2000; RUEL-GARIEPY et al., 2000).

Ganji, Abdekodaie e Ramazani (2007) estudaram o efeito de diferentes concentrações de quitosana e glicerol fosfato no tempo de gelificação do hidrogel. Os autores afirmaram que o tempo necessário para a gelificação do hidrogel de quitosana/glicerol fosfato é inversamente proporcional à

concentração da quitosana, do sal de glicerol fosfato e do grau de desacetilação da quitosana.

No presente estudo, utilizando-se o teste de inversão do tubo, observou que o gel hidrogel de quitosana/glicerol fosfato levou mais de 20 minutos para gelificar a 37°C. Resultado semelhante ao encontrado por Qiu e colaboradores (2011), que observaram a formação do gel apenas com 60 minutos de incubação. Entretanto, tempos menores de gelificação foram citados na literatura (GANJI; ABDEKHODAIE; RAMAZANI, 2007; ZHOU et al., 2011). As variações no tempo de gelificação encontrado nos diferentes trabalhos podem ser explicadas pelo fato de existirem diferenças nas concentrações da quitosana e do glicerol fosfato, bem como diferença no grau de desacetilação dos hidrogéis estudados.

O tempo de gelificação é determinante para o uso deste biomaterial em técnicas cirúrgicas minimamente invasivas. O hidrogel deve ser capaz de permitir a mistura de células e a injeção em estado líquido e gelificar rápido o suficiente para ser empregado clinicamente (AMINI; NAIR, 2012).

Quando preparado como matriz para o cultivo celular observou a formação de gel em tempo menor. A explicação para tal comportamento ainda não esta clara, porém pode estar relacionada à quantidade de material utilizado para o teste de inversão dos tubos, que foi maior do que o utilizado para o cultivo, ou a própria heterogeneidade do polímero.

O hidrogel de quitosana/glicerol fosfato, quando resfriado e mantido a 4°C, não retornou ao seu estado sólido. Este resultado contraria os estudos realizados por Chenite et al. (2000), que estudou a característica reológica desta solução, e observou a tendência do gel em retornar ao estado líquido quando resfriado. Uma das explicações para este fato é que, em altas concentrações de glicerol fosfato, ocorre um predomínio das ligações de ponte de hidrogênio entre as cadeias de quitosana e da quitosana com moléculas de água através do efeito de neutralização do glicerol fosfato. Como as ligações de ponte de hidrogênio não variam conforme a temperatura, o resfriamento do gel não altera a sua estrutura (GANJI; ABDEKHODAIE; RAMAZANI, 2007). Clinicamente, este comportamento pode ser interessante para a aplicação deste biomaterial em reparos de cartilagem, pois os pacientes poderiam ser

submetidos à crioterapia no período pós-cirúrgico sem receio de se liquefazer a matriz celular.

No presente estudo, foram utilizados três tipos celulares da espécie equina; as células-tronco de tecido adiposo, polpa dentária e saco vitelínico. Estas células foram cultivadas, caracterizadas morfolologicamente e utilizadas no presente trabalho. A caracterização imunofenotípica das células-tronco de tecido adiposo e polpa dentária serão realizadas em projeto futuro e não eram objetivos deste estudo.

As células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo são amplamente estudadas na espécie equina. Muitos trabalhos visam seu uso terapêutico para o tratamento de tendinites, desmites e lesões articulares (KISIDAY et al., 2008; FRISBIE et al., 2009; CARVALHO et al., 2011;).

Segundo Ribeiro (2009), as células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo de equinos apresentam formato fusiforme e ficam fortemente aderidas a placa. Estas características também foram observadas no presente trabalho.

As células-tronco mesenquimais derivadas de polpa dentária foram descritas em ratos e humanos (YAMAMURA, 1985; GRONTHOS et al., 2000; KERKIS et al., 2006). Entretanto, este parece ser o primeiro trabalho a descrever a extração, cultivo e caracterização morfológica deste tipo celular na espécie equina.

As células-tronco mesenquimais derivadas da polpa dentária equina possuem característica fibroblastóide alongada, fusiforme, com núcleo grande e centralizado, assemelhando-se as características descritas por Silva (2011) em relação às células de origem humana.

As células de saco vitelínico apresentaram formato fibroblastóide e aderência ao plástico, semelhante ao descrito por Francioli (2012). Com exceção desta última, que já havia sido isolada, caracterizada e diferenciada, as células não foram caracterizadas imunofenotipicamente, o que nos limita em afirmar que estas são células-tronco mesenquimais. Porém, a característica fibroblastóide e a aderência ao plástico sugerem fortemente que se trata de células-tronco mesenquimais (STEWART; STEWART, 2012).

Os três tipos celulares obtiveram boa taxa de proliferação, sendo que o número necessário para a realização do experimento foi alcançado já na

sétima passagem. Esta característica parece ser importante uma vez que células que necessitam de um número muito grande de passagens tem perda de sua multipotencialidade e na taxa de proliferação (BYDLOWSKI et al., 2009).

Os hidrogéis podem servir como excelente matriz para o reparo do tecido esquelético através de suas propriedades biomiméticas e da alta concentração de água em seu meio, tornando compatível com as células (AMINI; NAIR, 2012). Apesar do grande interesse da utilização de hidrogel objetivando o tratamento de lesões de cartilagem, poucos estudos são encontrados na literatura com relação à espécie equina.

Scharwz et al. (2011) caracterizaram células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo da espécie equina e canina incubadas em hidrogel de agarose. Os autores não observaram nenhum efeito negativo do hidrogel sobre o crescimento celular.

Kopesky et al (2010) utilizou o hidrogel de peptídeos para analisar a capacidade das células-tronco de medula óssea em produzir neo-cartilagem. Este mesmo hidrogel foi utilizado em estudo para avaliar as propriedades estruturais do agrecam produzido por células-tronco de medula óssea equina (LEE et al., 2010).

Fortier et al. (2002) investigaram a utilização de hidrogel associado a condrócitos e fatores de crescimento para o reparo de cartilagem em equinos. Seus resultados sugerem que a associação dos condrócitos e dos fatores de crescimento junto ao hidrogel permite um melhor reparo da cartilagem articular.

Em estudo realizado por Martins (2010), utilizando o hidrogel de quitosana/glicerol fosfato para tratamento de defeitos osteocondrais em equinos, observou-se que os animais não apresentaram resposta inflamatória, sendo o gel considerado biocompatível. Porém, o tecido formado foi semelhante ao grupo controle. O que contraria os achados de Chevrier et al (2007), que encontrou melhora na qualidade do tecido formado com o uso de hidrogel de quitosa/glicerol fosfato em defeitos osteocondrais de ovelhas.

A discrepância destas observações pode estar relacionada à diferença no tamanho das espécies, uma vez que o hidrogel de quitosana/glicerol fosfato é um hidrogel físico, e por isso mecanicamente fraco.

Com exceção do trabalho acima citado (MARTINS, 2010), nenhum outro trabalho utilizando o hidrogel de quitosana/glicerol fosfato foi realizado utilizando-se a espécie equina. Desta forma, o presente trabalho ficou limitado em discutir seus resultados, sendo necessário o confronto dos dados com células de outras espécies ou com hidrogéis de outra natureza.

A morfologia celular é regulada pela organização interna de seu citoesqueleto, bem como pela ligação entre as células e entre a célula e a matriz extracelular (LECUIT, 2005).

As células presentes no hidrogel de quitosana/glicerol fosfato tiveram sua morfologia avaliada através de microscopia utilizando-se lâminas coradas com a técnica de Hematoxilina/Eosina. Todos os tipos celulares comportaram-se de forma semelhante conforme a morfologia celular. Houve um predomínio de células com formato arredondado já nas primeiras 24 horas, que se manteve até o final do experimento.

Este formato parece ser predominante em células suspensas em matriz de suporte tipo hidrogel e está relacionado à maciez do biomaterial. Esta é considerada uma das grandes vantagens do uso de hidrogéis como *scaffold* para o reparo de cartilagem, uma vez que as células encapsuladas mantêm formato esférico e não se diferenciam (KOCK; DONKELAAR; ITO, 2012).

Richardson et al. (2008) cultivaram células-tronco mesenquiais de humanos em hidrogel de quitosana/glicerol fosfato e observaram morfologia arredondada das células, expressão gênica para colágeno tipo II e SOX-9, e deposição de matriz extracelular contendo glicosaminoglicanos, sugerindo a diferenciação das células-tronco mesenquiais em condrócitos. Isto ocorreu sem o uso de meio de diferenciação condrogênico, sugerindo uma influência do hidrogel na diferenciação das células-tronco mesenquiais humanas em condrócitos.

Entretanto, no presente estudo não foi observada a produção de colágeno pelas células-tronco cultivadas através da técnica de coloração de picrossírius e do tricromo de Masson e a deposição de glicosaminoglicanos na matriz extracelular não foi analisada no presente trabalho, sendo motivo de investigação futura.

O hidrogel de quitosana/glicerol fosfato parece exercer efeito sobre as células-tronco estimulando sua proliferação. Ahmadi e Bruinj (2007) cultivaram

células-tronco mesenquimais de ovelha em meios contendo diferentes concentrações de quitosana e glicerol fosfato. Foi observado um incremento na proliferação celular conforme o aumento da concentração de quitosana. Para Inui, Tsujikubo e Hirano (1995) isto se deve a uma potencialização da quitosana sobre fatores de crescimento como o fator de crescimento derivado de plaquetas. Porém, neste mesmo estudo (AHMADI; BRUINJ, 2007), foi notado efeito inverso quando a concentração de glicerol fosfato era maior do que 10%. Isto foi relacionado ao aumento da osmolaridade no meio, prejudicando a homeostase celular.

No presente trabalho foi notada uma diminuição da quantidade de células presentes no biomaterial ao longo do tempo e apesar dos três tipos celulares terem se comportado de forma semelhante, esta redução foi mais significativa nas células-tronco de tecido adiposo. As células de saco vitelínico mantiveram-se em quantidade semelhante quando comparado os momentos 24 horas e sete dias.

Acredita-se que a diminuição da quantidade de células presentes no biomaterial ao longo do tempo possa estar associada à degradação que este material sofreu durante o experimento. Provavelmente, o biomaterial degradou-se em velocidade maior do que as células conseguiram realizar a deposição de matriz extracelular, levando assim a uma perda das células durante a troca do meio. Entretanto, este fato ainda não pode ser completamente esclarecido, uma vez que não foi observada presença de células no meio de cultura durante a troca.

As células-tronco de saco vitelínico mantiveram-se em mesma quantidade quando comparados o momento 24 horas e o momento sete dias. Este fato pode estar relacionado à sua origem, que difere das outras fontes celulares, sugerindo que estas células apresentem maior quantidade de sítios de ligação.

Um estudo comparou o efeito da adição de gelatina na construção de matriz de suporte a base de quitosana na forma de membrana, matriz porosa e hidrogel. Neste estudo fibroblastos foram incluídos no hidrogel de quitosana/glicerol fosfato e quitosana/gelatina/glicerol fosfato e tiveram uma significativa redução de suas quantidades aos dez dias de incubação. Os

autores atribuíram este fato a baixa capacidade de ligação entre as células e a quitosana.

6 CONCLUSÃO

Com o presente trabalho pode-se observar que o hidrogel de quitosana/glicerol fosfato apresentou a formação de uma matriz de suporte irregular e com propriedades mecânicas fracas. Uma correção no processo de desacetilação e melhorias em suas propriedades físicas serão necessárias para o emprego deste biomaterial como matriz de suporte na engenharia tecidual de cartilagem.

O hidrogel de quitosana/glicerol fosfato permitiu que as células cultivadas mantivessem sua morfologia celular e não pareceu exercer efeitos tóxicos para as células-tronco de equinos. Porém, uma baixa adesão das células neste tipo de biomaterial foi observada, o que pode limitar seu uso. A associação de outros materiais reticulantes pode suprir esta deficiência.

REFERÊNCIAS

- ABARRATEGI, A.; LOPIZ-MORALES, Y.; RAMOS, V.; CIVANTOS, A.; LÓPEZ-DURAN, L.; MARCO, F.; LÓPEZ-LACOMBA, J. L. Chitosan scaffolds for osteochondral tissue regeneration. **J Biomed Mater Res Part A**. v. 95^a, p. 1132-1141, 2010.
- AGRAWAL, P.; STRIJKERS, G. J.; NICOLAY, K. Chitosan-based systems for molecular imaging. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 62, p. 42–58, 2009.
- AHMADI, R.; BUIJN J. D. Biocompatibility and gelation of chitosan-glycerol phosphate hydrogels. **J Biomed Mater Res**. v. 86, p. 824-832, 2008.
- AIBA, S. Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosans. **Int J Biolog Macromol**, v. 14, p. 225–228, 1992.
- AMINI, A. A.; NAIR, L. S. Injectable hydrogels for bone and cartilage repair. **Biomed Mater**. V.7, p. 1-13, 2012.
- ANASTASIOU, A.; SKIOLDEBRAND, E.; EKMAN, S.; HALL, L. D. Ex vivo magnetic resonance imaging of the distal row of equine carpal bones: assessment of bone sclerosis and cartilage damage. **Vet Radiol Ultrasound**, v.44, p.501-512, 2003.
- BAE, D. K.; YOON, K. H.; SONG, S. J. Cartilage healing after microfracture in osteoarthritic knees. **Arthroscopy**, v. 22, p. 367-374, 2006.
- BEDI, A.; FEELEY, B. T.; WILLIAMS, R. J. Manegement of Articular Cartilage Defects of the Knee. **J Bone Joint Surg Am**. v. 92, p. 994-1009, 2010.
- BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M.; FELT, O.; GURNY, R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 57, p. 35–52, 2004.
- BIANCO, P.; ROBEY, P. G. Stem cells in tissue engineering. **Nature**, v. 414, n. 6859, p. 118-121, 2001.
- BOUCARD, N.; VITON, C.; DOMARD, A. New aspects of the formation of physical hydrogels of chitosan in a hydroalcoholic medium. **Biomacromolecules**, v. 6, p.3227–3237, 2005.
- BRANT, A. J. C. **Preparação e caracterização de hidrogéis a partir de misturas de quitosana e poli (N-vinil-2-Pirrolidona)**. 2008. 169f, Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- BREINAN, H. A.; MARTIN, S. D.; HSU, H. P.; SPECTOR, M. Healing of canine articular cartilage defects treated with microfracture, a type-II collagen matrix, or cultured autologous chondrocytes. **J Orthop Res**, v. 18, p. 781-789, 2000.
- BRITTBERG, M.; LINDAHL, A.; NILSSON, A.; OHLSSON, C.; ISAKSSON, O.; PETERSON, L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. **New Engl J Med**. v. 331, p. 889–895, 1994.
- BRYANT, S. J.; BENDER, R. J.; DURAND, K. L.; ANSETH, K. S. Encapsulating chondrocytes in degrading PEG hydrogels with high modulus: engineering gel structural changes to facilitate cartilaginous tissue production. **Biotech and Bioeng**, v. 86, n. 7, p. 747-755, 2004.
- BURDICK, J. A.; PRESTWICH, G. D. Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. **Adv Mater**, v. 23, n. 12, p. 41–56, 2011.

- BYDLOWSKI, S. P.; DEBES, A. A.; MASELLI, L. M. F.; JANZ, F. L.;
Característica biológicas das células-tronco mesenquimais. **Rev Bras Hematol Hemoter**. v. 31, p. 25-35, 2009.
- CARDOSO, M. B. Contribuição do estudo da reação de desacetilação da quitina: estudos da desacetilação assistida por ultra-som de alta potência. 2008. 103f. **Tese (Doutorado)** – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008
- CARVALHO, A. M.; ALVES, A. L. G.; OLIVEIRA, P. G. G.; ÁLVAREZ, L. E. C.; AMORIM, R. L.; HUSSNI, C. A.; DEFFUNE, E. Use of Adipose Tissue –Derived Mesenchymal Stem Cells for Experimental Tendinitis Therapy in Equines. **J Equine Vet Sci**. v.31, p. 26-34, 2011.
- CHATELET, C.; DAMOUR, O.; DOMARD, A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. **Biomaterials**, v. 22, p. 261–268, 2001.
- CHEN, R. R.; SILVA, E. A.; YUEN, W. W.; BROCK, A. A.; FISCHBACH, C.; LIN, A. S.; GULDBERG, R. E.; MOONEY, D. J. Integrated approach to designing growth factor delivery systems. **FASEB J**, v. 21:3896–3903, 2007.
- CHENITE, A.; CHAPUT, C.; WANG, D.; COMBES, C.; BUSCHMANN, M. D.; HOEMANN, C. D.; LEROUX, J. C.; ATKINSON, B. L.; BINETTE, F.; SELMANI, A. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. **Biomaterials**, v. 21, p. 2155–2161, 2000.
- CHEVRIER, A.; HOEMANN, C. D.; SUN, J.; BUSCHMANN, M. D. Chitosan-glycerol phosphate/blood implants increase cell recruitment, transient vascularization and subchondral bone remodeling in drilled cartilage defects. **OsteoArthritis Cartilage**. v. 15, p. 316-327, 2007.
- CHO, Y. W.; JANG, J.; PARK, C. R.; KO, S. W. Preparation and solubility in acid and water of partially deacetylated chitins. **Biomacromolecules**, v. 1, p. 609–614, 2000.
- CHU, C. R. Chondral and Osteochondral Injuries: mechanisms of injury and repair response. **Op Tech in Orthop**. v. 11, n. 2, p. 70-75, 2001.
- CROMPTON, K. E.; FORSYTHE, J. S.; HORNE, M. K.; FINKELSTEIN, D. I.; KNOTT, R. B. Molecular level and microstructural characterization of thermally sensitive chitosan hydrogels. **Soft Matter**. V. 5, p. 4704-4711, 2009.
- CUERO, R. G.; OSUJI, G.; WASHINGTON, A. N-carboxymethylchitosan inhibition of aflatoxin production: role of zinc. **Biotech Letters**, v. 13, 441–444, 1991.
- DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R. M.; CHIELLINI, E. Chitosan – A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Prog in Polyme Sci**. v. 36, p. 981-1014, 2011.
- DELISE, A. M.; FISCHER, L.; TUAN, R. S. Cellular interactions and signaling in cartilage development. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 8, n. 5, p. 309–334, 2000.
- DMITRIEV, B. A.; KNIREL, Y. A.; KOCHETKOV, N. K. Selective cleavage of glycosidic linkages: studies with the O-specific polysaccharide from *Shigella dysenteriae* type 3. **Carbohydr Res**, n. 40, p. 365–372, 1975.

- DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D. J.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, p. 315–317, 2006.
- DORNISH, M.; HAGEN, A.; HANSSON, E.; PECHEUR, C.; VERDIER, F.; SKAUGRUD, O. Safety of PROTASAN™: Ultrapure chitosan salts for biomedical and pharmaceutical use. In: DOMARD, A.; ROBERTS, G.A.F.; VÅRUM, K.M. **Advances in Chitin Science**, vol.II. Lyon, França: Jacques Andre Publisher, 1997. p.664-671.
- FENG, Q. L.; WU, J.; CHEN, G. Q.; CUI, F. Z.; KIM, T. N.; KIM, J. O. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **J Biomed Mater Res**, v. 52, p. 662–668, 2000.
- FORTIER, L. A.; MOHAMMED, H. O.; LUST, G.; NIXON, A. J. Insulin-like growth factor-I enhances cell-based repair of articular cartilage. **J Bone Joint Surg**, v. 84, n. 2, p. 276-288, 2002.
- FORTIER, L. A.; NIXON, A. J.; LUST, G. Phenotypic expression of equine articular chondrocytes grown in three-dimensional cultures supplemented with supraphysiologic concentrations of insulin-like growth factor-1. **Am J Vet Res**, v. 63, p. 301-305, 2002.
- FRANCIOLLI, A. L. R. Medicina veterinária regenerativa: multipotencialidade das células da membrana amniótica e do saco vitelino no modelo equino (*Equus caballus*, Linnaeus 1758). 2012. 191f. **Tese (Doutorado em Ciências)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2012.
- FRENKEL, S. R.; CLANCY, R. M.; RICCI, J. L.; DI CESARE, P. E.; REDISKE, J. J.; ABRAMSON, S. B. Effects of nitric oxide on chondrocyte migration, adhesion, and cytoskeletal assembly. **Arthritis Rheum**, v. 39, n. 11, p. 1905–1912, 1996.
- GANJI, F.; ABDEKHODAIE, M. J.; RAMAZANI, A. Geletion time and degradatiron rate of chitosan-based injectable hydrogel. **J Sol-Gel Sci tech.** v. 42, p. 47-53, 2007.
- GERENTES, P.; VACHOUD, L.; DOURY, J.; DOMARD, A. Study of a chitinbased gel as injectable material in periodontal surgery. **Biomaterials**, v. 23, p. 1295–1302, 2002.
- GIKAS, P. D.; ASTON, W. J.; BRIGGS, T. W. Autologous chondrocyte implantation: where do we stand now? **J Orthop Sci**, v. 13, p. 283-292, 2008.
- GRONTHOS, S.; MANKANI, M.; BRAHIM, J.; ROBEY, P. G.; SHI, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proc Nat Acad Sci Unit Stat Am**, v. 97, p. 13625-13630, 2000.
- GUO, Z.; CHEN, R.; XING, R.; LIU, S.; YU, H.; WANG, P.; LI, C.; LI, P. Novel derivatives of chitosan and their antifungal activities in vitro. **Carbohydr Res**, v. 341, n. 3, p. 351–354, 2006.
- GUPTA, D.; TATOR, C. H.; SHOICHET, M. S. Fast-gelling injectable blend of hyaluronan and methylcellulose fos intrathecal, localized delivery to the injured cord. **Biomaterials**. v. 27, p. 2370-2379, 2006.

- HADWIGER, L. A.; KENDRA, D. F.; FRISTENSKY, B. W.; WAGONER, W. Chitosan both activates genes in plants and inhibits RNA synthesis in fungi. In: MUZZARELLI, R.A.A.; JEUNIAUX, C.; GOODAY, C.W., Eds. **Chitin in nature and technology**. New York, NY: Plenum Press, 1986. p. 209–214.
- HIRANO, S.; TSUCHIDA, H.; NAGAO, N. N-acetylation in chitosan and the rate of its enzymic hydrolysis. **Biomaterials**, v. 10, p. 574–576, 1989.
- HOEMANN, C. D.; HURTIG, M.; ROSSOMACHA, E.; SUN, J.; CHEVRIER, A.; SHIVE, M. S.; BUSCHMANN, M. D. Chitosan-glycerol phosphate/blood implants improve hyaline cartilage repair in ovine microfracture defects. **J Bone J Surg**, v. 87, n. 12, p. 2671–2686, 2005.
- HSU, S. C.; DON, T. M.; CHIU, W. Y. Free radical degradation of chitosan with potassium persulfate. **Polym Degrad Stab**, v. 75, p. 73–83, 2002.
- HUANG, M.; KHOR, E.; LIM, L. Y. Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation. **Pharm Res**, v. 21, p. 344–353, 2004.
- HUURNER, M.; SCHELBERGEN, R.; BLATTES, R.; BLOM, A.; MUNTER, W.; GREVERS, L. C.; JEANSON, J.; NOEL, D.; CASTEILLA, L.; JORGENSEN, C.; BERG, W.; LENT, P. E. M. Antiinflammatory and Chondroprotective Effects of Intraarticular Injection of Adipose-Derived Stem Cells in Experimental Osteoarthritis. **Arthritis Rheum**, v. 64, p. 3604–3613, 2012.
- INUI, H.; TSUJIKUBO, M.; HIRANO, S. Low molecular weight chitosan stimulation of mitogenic response to platelet-derived growth factor in vascular smooth muscle cells. **Biosci, Biotech, and Biochem**, v. 59, n.11, p. 2111–2114, 1995.
- JARRY, C.; LEROUX, J. C.; HAECK, J.; CHAPUT, C.; Irradioating or Autoclavin Chitosan/Poluol Solutions: Effect on Thermogelling Chitosan- β -Glycerophosphate Systems. **Chem Pharm Bull**. v. 50, n.10, p. 1335–1340, 2002.
- JAYAKUMAR R, NWE N, TOKURA S, TAMURA H. Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. **Int J Biol Macromol**, v. 40, p. 175–181, 2007.
- JEFERRY, A. K. Articular Cartilage and the Orthopaedic Surgeon: part 1 Structure and Function. **Current Orthop**. v. 8, p. 38–44, 1994.
- JUMAA, M.; FURKERT, F. H.; MULLER, B. W. A new lipid emulsion formulation with high antimicrobial efficacy using chitosan. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 53, p. 115–123, 2002.
- KAFIENAH, W.; JAKOB, M.; DÉMARTEAU, O.; FRAZER, A.; BARKER, M. D.; MARTIN, I.; HOLLANDER, A. P. Three-dimensional tissue engineering of hyaline cartilage: comparison of adult nasal and articular chondrocytes. **Tissue Eng**, v. 8, p. 817–826, 2002.
- KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 62, p. 3–11, 2009.
- KERKIS, I.; KERKIS, A.; DOZORTSEV, D.; STUKART-PARSONS, G. C.; MASSIRONI, S. M. G.; PEREIRA, L. V.; CAPLAN, A. I.; CERRUTI, H. F. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and embryonic stem cell markers. **Cells Tissue Organs**, v. 184, p.105–116, 2006.

KIESWETTER, K.; SCHWARTZ, Z.; ALDERETE, M.; DEAN, D. D.; BOYAN, B. D. Platelet derived growth factor stimulates chondrocyte proliferation but prevents endochondral maturation. **Endocrine**, v. 6, p. 257-264, 1997.

KISIDAY, J. D.; KOPESKY, P. W.; EVANS, C. H.; GRODZINSKY, A. J.; MCILWRAITH, C. W.; FRISBIE, D. D. Evaluation of adult equine bone marrow- and adipose-derived progenitor cell chondrogenesis in hydrogel cultures. **J Orthop Res**, v. 26, n. 3, p. 322-331, 2008.

KOCK, L.; VAN DONKELAAR, C. C.; ITO, K. Tissue engineering in functional articular cartilage: current status. **Cell Tissue Res**. V. 347, p. 613-627, 2012

KOPESKY, P. W.; LEE, H. Y.; VANDERPLOEG, E. J.; KISIDAY, J. D.; FRISBIE, D. D.; PLAAS, A. H. K.; ORTIZ, C.; GRODZINSKY, A. J. Adult Equine Bone Marrow stromal Cells produce a cartilage-like ECM mechanically superior to animal-matched adult chondrocytes. **Matrix Biol**. v. 29, p. 427-438, 2010.

KOH, C. J.; ATALA, A. Tissue engineering, stem cells, and cloning: opportunities for regenerative medicine. **J Am Soc Nephrol**, v. 15, n. 5, p. 1113-1125, 2004.

LAHIJI, A.; SOHRABI, A.; HUNGERFORD, D. S.; FRONDOZA, C. G. Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes. **J Biomed Mater Res**, v. 51:586-595, 2000.

LANGER, R.; VACANTI, J.P. Tissue engineering. **Science**, v. 260, n. 5110, p. 920-926, 1993.

LAPORTA, F. T.; RICHTER, A.; SGAGLIONE, N. A.; GRANDE, D. A. Clinical Relevance of scaffolds for Cartilage Engineering. **Orthop Clin N Am**. v.43, p. 245-254, 2012.

LECUIT, T. Adhesion remodeling underlying tissue morphogenesis. **Trends Cell Biol**, v. 15, n. 1, p. 34-42, 2005.

LEE, D. A.; BADER, D. L. Compressive strains at physiological frequencies influence the metabolism of chondrocytes seeded in agarose. **J Orthop Res**, v. 15, n. 2, p. 181-188, 1997.

LOHMANN, C. H.; SCHWARTZ, Z.; NIEDERAUER, G. G.; CARNES, D. L. J. R.; DEAN, D. D.; BOYAN, B. D. Pretreatment with platelet derived growth factor-BB modulates the ability of costochondral resting zone chondrocytes incorporated into PLA/PGA scaffolds to form new cartilage in vivo. **Biomaterials**, v. 21, p. 49-61, 2000.

MARTINS, E. A. N. Estudo da biocompatibilidade do gel de quitosana associada ao fosfato de glicerol para reparação de defeitos osteocondrais induzidos experimentalmente na tróclea do *talus* de eqüinos. 2010. 153 f. **Tese (Doutorado em Ciências)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MCCULLOCH, E. A.; TILL, J. E. Perspectives on the properties of stem cells. **Nat Med**, v.11, n. 10, p. 1026-1028, 2005.

MCILWRAITH, C. W. Doenças das Articulações, Tendões, Ligamentos e Estruturas Relacionadas. In: **Claudicação em equinos segundo Stashak**. 2006. ROCA. 5° ed. São Paulo

- MIMA, S.; MIYA, M.; IWAMOTO, R.; YOSHIKAWA, S. Highly deacetylated chitosan and its properties. **J Applied Polym Sci**, v. 28, p. 1909–1917, 1983.
- MOLINARO, G.; LEROUX, J. C.; DAMAS, J.; ADAM, A. Biocompatibility of thermosensitive chitosan-based hydrogels: an in vivo experimental approach to injectable biomaterials. **Biomaterials**, v. 23, p. 2717–2722, 2002.
- MOURA, M. J.; FANECÁ, H.; LIMA, M. P.; GIL, M. H.; FIGUEIREDO, M. M. In situ Forming Chitosan Hydrogels Prepares via Ionic/Covalent Co-Cross-Linking. **Biomacromol**, v. 12, p. 3275–3284, 2011.
- MUZARELLI, R.A.A. **Chitin**. Oxford: Pergamon Press, 1977.
- NICODEMUS, G. D.; BRYANT, S. J. Cells Encapsulations in Biodegradable Hydrogels for Tissue Engineering Applications. **Tissue Eng**, v. 14, n. 2, p. 149–165, 2008.
- NIXON, A. J.; HAUPT, J. L.; FRISBIE, D. D.; MORISSET, S. S.; MCILWRAITH, C. W.; ROBBINS, P. D.; EVANS, C. H.; GHIVIZZANI, S. Gene-mediated restoration of cartilage matrix by combination insulin-like growth factor-I/interleukin-1 receptor antagonist therapy. **Gene Therapy**, v. 12, p. 177–186, 2005.
- OLSEN, B. R.; REGINATO, A. M.; WANG, W. Bone development. **Annual Rev Cell Dev Biol**, v. 16, p. 191–220, 2000.
- PEPPAS, N. A. **Hydrogels in medicine and pharmacy**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1986. 180 p.
- PUJALS, G.; SUNE-NEGRE, J. M.; PEREZ, P.; GARCIA, E.; PORTUS, M.; TICO, J. R.; MINARRO, M.; CARRIO, J. In vitro evaluation of the effectiveness and cytotoxicity of meglumine antimoniate microspheres produced by spray drying against *Leishmania infantum*. **Parasit Res**, v.102, n.6, p. 1243–1247, 2008.
- QUI, X.; YANG, Y.; WANG, L.; LU, S.; SHAO, Z.; CHEN, X. Synergistic interactions during thermosensitive chitosan- β -glycerophosphate hydrogel formation. **RSC Adv**, v.1, p. 282–289, 2011.
- RIBEIRO, G. Células-tronco Mesenquimais de Equinos: Isolamento, Cultivo e Caracterização. 2009. **Tese (Doutorado em Veterinária)** – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2009.
- RICHARDSON, T. P.; PETERS, M. C.; ENNETT, A. B.; MOONEY, D. J. Polymeric system for dual growth factor delivery. **Nat Biotech**, v.19:1029–1034, 2001.
- ROBERTS, G.A.F. **Chitin chemistry**. London: Macmillan, 1992.
- RUEL-GARIEPY, E.; CHENITE, A.; CHAPUT, C.; GUIRGUIS, S.; LEROUX, J. Characterization of thermosensitive chitosan gels for the sustained delivery of drugs. **Int J Pharm**, v. 203, n. 1–2, p. 89–98, 2000.
- SAN JUAN, A.; MONTEBAULT, A.; GILLET, D.; SAY, J. P.; ROUÏF, S.; BOUET, T.; ROYAUD, I.; DAVID, L. Degradation of chitosan-based materials after different sterilization treatments. **Mater Sci Eng**, v. 31, p. 2–5, 2007.

- SASHIWA, H.; SAIMOTO, H.; SHIGEMASA, Y.; OGAWA, R.; TOKURA, S. Distribution of the acetamide group in partially deacetylated chitins. **Carbohydr Polym**, v. 16, p. 291–296, 1991.
- SCHARWZ, C.; LEICHT, U.; DROSSE, I.; ULRICH, V.; LUIBL, V.; SCHIEKER, M.; ROCKEN, M. Characterization of adipose-derived equine and canine mesenchymal stem cells after incubation in agarose-hydrogel. **Vet Res Commun**. V. 35, p. 487-499, 2011.
- SUH, J. K.; SCHERPING, S.; MARUI, T.; STEADMAN, J. R. S.; WOO, S. L. Y. Basic science of articular cartilage injury and repair. **Op Tech Sports Med**. V. 3, n. 2, p. 78-86, 1995.
- SHU, X. Z.; ZHU, K. J. Controlled drug release properties of ionically crosslinked chitosan beads: the influence of anion structure. **Int J Pharm**, v. 233, p. 217–225, 2002.
- SIGNINI, R. **Estudos de obtenção, purificação e caracterização de quitosana**. 1998. **Dissertação** (Mestrado em Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
- SIGNINI, R.; CAMPANA-FILHO, S. P. Purificação e Caracterização da Quitosana Comercial. **Polím ciênc e tec**. Out/dez. p. 63-69, 1998.
- SPILLER, K. L.; MAHER, S. A.; LOWMAN, A. M. Hydrogel for the Repair of Cartilage Defects. **Tissue Eng**, v. 17, n. 4, p. 281-299. 2011.
- SPOTNITZ, W. D.; BURKS, S. Hemostats, sealants, and adhesives: components of the surgical toolbox. **Transfusion**, v. 48, n. 7, p. 1502–1516, 2008.
- SOUZA, V. F.; LIMA, L. M. C.; REIS, S. R. A.; RAMALHO, L. M. P.; SANTOS, J. N. Células-tronco: uma breve revisão. **Ci méd. biol**. v. 2, n. 2, p. 251-256, 2003
- STEWART, M. C.; STEWART, A. A. Mesenchymal stem cells: characteristics, source, and mechanism of action. **Vet Clin Equine**. v. 27, p. 243-261, 2011.
- SUH, J. K.; MATTHEW, H. W. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. **Biomaterials**, v. 21, n. 24, p. 2589–2598, 2000.
- THANOU, M.; VERHOEF, J. C.; JUNGINGER, H. E. Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 52, p.117–226, 2001.
- TODHUNTER, R. J. Anatomy and Phisiolgy of Sinovials Joint. in: McCILWRAITH, C. W.; TROTTER G. W. **Joint Disease in the Horse**. 1996. Saunders. Philadelphia
- TOMIHATA, K.; IKADA, Y. In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. **Biomaterials**, v. 18, p. 567–575, 1997.
- TORRES, M. A.; VIEIRA, R. S.; BEPPU, M. M.; SANTANA, C. C. Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente. **Polím Ciênc Tec**, v. 15, n. 4, p. 306 - 312, 2005

- VIAANTIER, C.; MRUGALA, D.; JORGENSEN, C.; GUICHEUX, J.; NOEL, D. Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. **Trends Biotech.** v. 27, n. 5, p. 307-314, 2009
- VIDAL, M. A.; KILROY, G. E.; LOPEZ, M. J.; JONHSON, J. R.; MOORE, R. M.; GIMBLE, J. M. Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. **Vet Surg** v. 36, p. 613-622, 2007
- WENCESLAU, C. V.; MIGLINO, M. A.; MARTINS, D. S.; AMBRÓSIO, C. E.; LIZIER, N. F.; PIGNATARI, G. C.; KERKIS, I. Mesenchymal progenitor cells from canine fetal tissues: yolk sac, liver, and bone marrow. **Tissue Eng.** v. 17, n. 12, p. 2165-2176, 2011.
- WILLIAMS, R. J. 3rd. **Cartilage repair strategies**. Totowa, NJ: Humana Press, 2007.
- WONG, M.; CARTER, D. R. Articular cartilage functional histomorphology and mechanobiology: a research perspective. **Bone**, v. 33, n. 1, p. 1-13, 2003.
- XIE, X.; WANG, Y.; ZHAO, C.; GUO, S.; LIU, S.; JIA, W.; TUAN, T. S.; ZHANG, C. Comparative evaluation of MSCs from bone marrow and adipose tissue seeded in PRP-derived scaffold for cartilage regeneration. **Biomaterials**. v. 33, p. 7008-7018, 2012.
- YAMAMURA, T. Differentiation of pulpal cells and inductive influences of various matrices with reference to pulpal wound healing. **J Dental Res**, v. 64, p. 530-540, 1985.
- YANG, Y. M.; HU, W.; WANG, X. D.; GU, X. S. The controlling biodegradation of chitosan fibers by N-acetylation in vitro and in vivo. **J Mater Sci Mater Med**, v. 18, p. 2117-2121, 2007.
- YI, H.; WU, L. Q.; BENTLEY W. E.; GHODSSI, R.; RUBLOFF, G. W.; CULVER, J. N.; PAYNE, G. F. Biofabrication with chitosan. **Biomacromol**, v. 6, p. 2881-2894, 2005.
- ZHANG, H.; NEAU, S. H. In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation. **Biomaterials**, v. 22, p. 1653-1658, 2001.
- ZHOU, H. Y.; ZHANG, Y. P.; ZHANG, W. F.; CHEN, X. G. Biocompatibility and characteristic of injectable chitosan-based thermosensitive hydrogel for drug delivery. **Carbohydr Polym**. v. 83, p. 1643-1651, 2011
- ZOLDNERS, J.; KISELEVA, T.; KAIMINSH, I. Influence of ascorbic acid on the stability of chitosan solutions. **Carbohydr Polym**, v. 60, n.2, p. 215-218, 2005.