MARCELO DE AZEVEDO E SOUZA MUNHOZ

**UTILIZAÇÃO DE BLENDA POLIMÉRICAS NO REPARO DE
DEFEITOS CRANIANOS DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção de título de mestre em Ciências.

Área de Concentração: Bioengenharia

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Rodrigues da Cunha

São Carlos

2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTA TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

M963u MUNHOZ, MARCELO DE AZEVEDO E SOUZA
UTILIZAÇÃO DE BLENDA POLIMÉRICAS NO REPARO DE
DEFEITOS CRANIANOS DE RATOS / MARCELO DE AZEVEDO E
SOUZA MUNHOZ; orientador MARCELO RODRIGUES DA CUNHA.
São Carlos, 2013.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação
Interunidades Bioengenharia e Área de Concentração em
Bioengenharia -- Escola de Engenharia de São Carlos;
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Instituto de
Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo,
2013.

1. Osseointegração. 2. colágeno. 3. quitosana. 4.
hidroxiapatita. 5. regeneração óssea. 6. materiais
biocompatíveis. I. Título.

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia
EESC / FMRP / IQSC

Marcelo de Azevedo e Souza Munhoz

Título: "Utilização de blendas poliméricas no reparo de defeitos cranianos de ratos".

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS
- GRADUAÇÃO INTERUNIDADES BIOENGENHARIA -
EESC/FMRP/IQSC DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
CIÊNCIAS NA ÁREA DE BIOENGENHARIA.

Aprovado em: 13/12/2013

Prof. Dr. Marcelo Rodrigues da Cunha (Orientador) Faculdade de Medicina de Jundiaí - FMJ

Resultado: Aprovado

Assinatura: [Assinatura]

Prof. Dr. Itibagi Rocha Machado

Faculdade de Medicina de Jundiaí - FMJ

Resultado: Aprovado

Assinatura: [Assinatura]

Profa. Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis

Instituto de Química de São Carlos - USP

Resultado: aprovado

Assinatura: [Assinatura]

Homologado em: ____/____/____

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus familiares:

- *Meus Avós, Rui e Ita (in memorian);*
- *Meu pai, Paulo. Minha mãe, Beatriz e meu irmão Gustavo;*
- *Minha esposa, Ana Paula e meus filhos, Luiza e Pedro.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Itibagi Rocha Machado pela contribuição na minha formação acadêmica, profissional e pessoal. Obrigado pela amizade e por ter acreditado no meu trabalho desde o primeiro momento.

Ao Prof. Dr. Marcelo Rodrigues da Cunha pela orientação, sabedoria, amizade e paciência na confecção desta dissertação.

À Profa. Dra Ana Maria de Guzzi Plepis pela oportunidade, ensinamentos e auxílio na elaboração deste estudo.

À Dra. Virgínia da Conceição Amaro Martins pela cooperação, esclarecimentos e o desenvolvimento dos biomateriais deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sérgio Akinobu Yoshioka pela cordialidade e participação neste estudo.

Aos professores da Bioengenharia, que me mostraram uma outra visão da vida acadêmica.

À Faculdade de Medicina de Jundiaí pelo suporte técnico proporcionado neste estudo. À Damaris pela dedicação e participação nos cuidados dos animais no biotério.

Ao meu amigo Helton Hirata, pelo companheirismo e incentivo durante todo o caminho do mestrado.

Aos meus amigos, parentes e colegas que participaram e compreenderam a minha ausência em algumas oportunidades.

Resumo

MUNHOZ, M.A.S. **Utilização de blendas poliméricas no reparo de defeitos cranianos de ratos**, 2013. 75f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia – EESC / FMRP / IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013

Na clínica ortopédica e traumatológica existem diversos desafios clínicos envolvendo as extensas perdas de tecido ósseo, relacionados primordialmente com causas traumáticas, tumorais, congênitas e infecciosas. No tratamento, podem ser utilizados os enxertos autólogos, homólogos, xenólogos e os enxertos periostais. Os substitutos sintéticos, conhecidos como biomateriais, também são uma boa alternativa. O objetivo deste trabalho foi avaliar o processo de neoformação óssea durante o reparo de defeitos ósseos, provocados experimentalmente no crânio de animais enxertados com blenda polimérica, constituída de colágeno de tendão bovino e quitosana associada à hidroxiapatita. Foram utilizados 30 ratos (*Rattus norvegicus*, *Wistar*), machos, com peso aproximado de 330 gramas e 4 meses de idade. Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para a criação de defeito ósseo no osso parietal esquerdo da calota craniana para o preenchimento com os biomateriais pesquisados. Foram divididos em 3 grupos com 10 animais cada, sendo um grupo controle sem a implantação de biomaterial, outro com implantação de blenda de colágeno e quitosana e o último com a utilização desta blenda em associação com hidroxiapatita. Cada grupo foi subdividido em dois subgrupos com 5 animais de acordo com o tempo do sacrifício pós-operatório, sendo com 3 semanas nos grupos de G1 a G3 e com 8 semanas de G4 a G6. Após o sacrifício, as calotas cranianas foram retiradas para foto documentação macroscópica e exames radiográficos. Em seguida, as amostras foram submetidas aos procedimentos histotécnicos de confecção das lâminas para avaliação histológica da neoformação óssea no local cirúrgico. A pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética da Faculdade de Medicina de Jundiaí, protocolo nº 301/12. As análises macroscópicas e radiográficas demonstraram a biocompatibilidade das blendas utilizadas. Histologicamente, houve discreta neoformação óssea em continuidade com as margens da lesão óssea, porém predominou a presença de tecido conectivo na área cirúrgica. As blendas poliméricas apresentaram biocompatibilidade com o tecido receptor, porém com baixa capacidade osteogênica devido à permanência do defeito ósseo. Não houve a sua osteointegração em virtude da presença de tecido conectivo em grande quantidade e adjacente ao implante.

Palavras-chave: Osseointegração, colágeno, quitosana, hidroxiapatita, regeneração óssea, materiais biocompatíveis.

Abstract

MUNHOZ, M.A.S., Use of polymer blends in the repair of cranial defects in rats, 2013. 75f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia – EESC / FMRP / IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013

In orthopedics and traumatology there are several clinical challenges involving extensive bone loss, primarily related to trauma, tumors, congenital and infectious diseases. These conditions can be usually treated by autologous, periosteal, homologous and xenologous grafts. A good alternative is to use synthetic biomaterials as substitute. The aim of this study was to evaluate the process of bone formation during repair of bone defects experimentally induced in animals skull, grafted by a polymer blend consisting of bovine tendon collagen and chitosan associated with hydroxyapatite. A total of 30 rats (*Rattus norvegicus*, Wistar) male, weighing approximately 330 grams and 4 months old was used. The animals underwent the surgical procedure for the creation of defect in the left parietal bone of the skull. They were divided into 3 groups of 10 animals each: a control group without biomaterials implantation, another with a blend of collagen and chitosan and the latest with the use of this blend in association with hydroxyapatite. Each group was subdivided into two subgroups of 5 animals according to the sacrifice schedule after surgery. The groups were named G1, G2 and G3 when the sacrifice occurred after 3 weeks postoperative and G4, G5 and G6 after eight weeks. After sacrifice, the calvarias were removed for macroscopic photo documentation and radiographic examinations. Then the samples were subjected to histotechnical procedures for histological evaluation of new bone formation at the surgical site. The study was approved by the ethics committee of the Faculdade de Medicina de Jundiaí (protocol # 301/12). The macroscopic and radiographic analysis demonstrated the biocompatibility of the blends. Histologically, there was a slight bone formation in continuity with the edges of the bone lesion, but the predominant presence of connective tissue in the surgical area. The polymer blends showed biocompatibility with the host tissue but low osteogenic capacity due to the bone defect. There was no osseointegration due to the presence of connective tissue in large quantity adjacent to the implant.

Keywords: Osseointegration, collagen, chitosan, hydroxyapatite, bone regeneration, biocompatible materials.

LISTA DAS FIGURAS

Figura 1. Diagrama de formação e estrutura do colágeno.....	18
Figura 2. Estrutura química da quitina e esquemática da quitosana.....	20
Figura 3. Procedimento cirúrgico da criação da lesão óssea craniana no rato.....	27
Figura 4. Vista macroscópica inferior das calotas cranianas retiradas.....	31
Figura 5. Radiografia das calotas cranianas de animais sacrificados.....	32
Figura 6. Fotomicrografia da área periférica da lesão craniana na coloração com Tricrômico de Masson nos grupos sacrificados com três semanas de pós-operatório (G4 a G6).....	34
Figura 7. Fotomicrografia em maior aumento da área periférica da lesão craniana na coloração com Tricrômico de Masson dos grupos sacrificados com três semanas de pós-operatório (G1 a G3).....	35
Figura 8. Fotomicrografia da área central da lesão craniana na coloração com Tricrômico de Masson nos grupos sacrificados com três semanas de pós-operatório (G1 a G3).....	36
Figura 9. Fotomicrografia da área periférica da lesão craniana na coloração com Picrosirius Red nos grupos sacrificados com três semanas de pós-operatório (G1 a G3).....	37
Figura 10. Fotomicrografia da área central da lesão craniana na coloração com Picrosirius Red nos grupos sacrificados com três semanas de pós-operatório (G1 a G3).....	38

Figura 11. Fotomicrografia da área periférica da lesão craniana na coloração com Tricrômico de Masson nos grupos sacrificados com oito semanas de pós-operatório (G4 a G6).....	40
Figura 12. Fotomicrografia da área periférica da lesão craniana em maior aumento na coloração com Tricrômico de Masson nos grupos sacrificados com oito semanas de pós-operatório (G4 a G6).....	41
Figura 13. Fotomicrografia da área central da lesão craniana na coloração com Tricrômico de Masson dos grupos sacrificados com oito semanas de pós-operatório (G4 a G6).....	42
Figura 14. Fotomicrografia da área periférica da lesão craniana na coloração com Picrosirius Red dos grupos sacrificados com oito semanas de pós-operatório (G4 a G6).....	43
Figura 15. Fotomicrografia da área central da lesão craniana na coloração com Picrosirius Red dos grupos sacrificados com oito semanas de pós-operatório (G4 a G6).....	44
Figura 16. Gráfico da análise morfométrica de G1 a G6 demonstrando o percentual de osso neoformado de cada grupo.....	45
Figura 17. Fotografia de microscopia de varredura eletrônica das blendas poliméricas de colágeno e quitosana.....	73
Figura 18. Fotografia de microscopia de varredura eletrônica das blendas poliméricas de colágeno, quitosana e hidroxiapatita.....	74

LISTA DAS ABREVIATURAS

B	Blenda
BMP	Proteínas Morfogenéticas do Osso
F	Osso Frontal
GAG	Glicosaminoglicano
G1	Grupo 1
G2	Grupo 2
G3	Grupo 3
G4	Grupo 4
G5	Grupo 5
G6	Grupo 6
HA	Hidroxiapatita
MEC	Matriz Extracelular
O	Osso Occipital
OI	Osso Imaturo
PE	Osso Parietal Esquerdo
PD	Osso Parietal Direito
TC	Tecido Conectivo

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

Lista de figuras

Lista de abreviaturas

1. Introdução	12
1.1 Enxerto ósseo autólogo	13
1.2 Enxertos homólogos e heterólogos	14
1.3 Substancias sintéticas: Biomateriais.....	15
1.4 Colágeno.....	17
1.5 Quitosana.....	19
1.6 Quitosana e Hidroxiapatita.....	21
1.7 Hidroxiapatita.....	21
1.8 Blendas.....	22
 2. Objetivos.....	 24
2.1 Objetivos gerais.....	24
2.2 Objetivos específicos.....	24
 3. Material e Métodos.....	 25
3.1 Confecção dos biomateriais.....	25
3.2 Estudo experimental.....	25
3.3 Técnica cirúrgica para criação da falha óssea craniana.....	26
3.4 Sutura dos tecidos e medicação.....	28
3.5 Controle pós-operatório.....	28
3.6 Análise macroscópica.....	28
3.7 Análise radiográfica.....	28
3.8 Análise histológica por microscopia de luz transmitida (ótica).....	29
3.9 Análise histológica por microscopia de luz polarizada.....	29
3.10 Análise morfométrica.....	30
3.11 Análise estatística.....	30

4. Resultados.....	31
4.1 Análise macroscópica.....	31
4.2 Análise radiográfica.....	32
4.3 Análise histológica.....	33
4.3.1 Animais eutanasiados em 3 semanas de pós-operatório.....	33
4.3.2 Animais eutanasiados em 8 semanas de pós-operatório.....	39
4.4 Análise morfométrica.....	45
4.5 Análise estatística.....	46
5. Discussão.....	47
6. Conclusões.....	58
7. Referências.....	59
Anexo A - Preparação das matrizes.....	70
Anexo B - Carta de Aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Jundiaí.....	75

1. INTRODUÇÃO

Na ortopedia, traumatologia, cirurgia plástica reconstrutora e odontologia existem diversos desafios clínicos envolvendo as extensas perdas de tecido ósseo decorrentes de várias causas, como as anomalias congênitas, tumores ósseos que necessitem de ressecções amplas, traumas de alta energia, sequela de infecções ósseas, fraturas segmentares ou gravemente cominuídas, soltura asséptica de implantes e anormalidades esqueléticas adquiridas (ABDEL, 2006; CUNHA et al., 2008; DIMITRIOU et al., 2012; MAINI et al., 2000; PALEY; MAAR, 2000). O reparo destas lesões ósseas depende de alguns pré-requisitos biológicos essenciais para consolidação, tais como a presença de células osteogênicas, fatores de crescimento, suporte para adesão, crescimento e proliferação celular. Estas condições podem ser atendidas através da utilização de substitutos ósseos naturais ou sintéticos que proporcionem um ambiente favorável para a cicatrização óssea (DIMITRIOU et al., 2011; ZIMMERMANN; MOGHADDAM, 2011).

Existem vários procedimentos cirúrgicos no tratamento das lesões ósseas extensas, porém estão usualmente estabelecidos o transporte ósseo e a distração osteogênica, além dos diferentes tipos de enxertos ósseos autólogos e a osteossíntese interna e externa (DIMITRIOU et al., 2011; KARARGYRIS et al., 2013; MAINI et al. 2000; PALEY; MAAR, 2000; PATIL; MONTGOMERY, 2006; SPIEGL et al., 2013; WATANABE et al., 2007). Outros recursos também estão disponíveis, como a utilização de células mesenquimatosas e osteoprogenitoras, aspirado de medula óssea, homoenxertos, fatores de crescimento ósseo e vascular, selantes, proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), xenoenxertos e enxertos periostais (BLOKHUIS; CALORI; SCHMIDMAIER, 2013; CUNHA et al., 2008; DOMINGOS, 2002; DIMITRIOU et al., 2012, MACHADO, 2012; SHARMA et al., 2012). Como alternativa, também podem ser favoravelmente utilizados os substitutos ósseos sintéticos conhecidos como biomateriais, visto a sua biocompatibilidade e osteocondutividade. Assim, várias substâncias naturais ou fabricadas vêm sendo exploradas pela Engenharia Tecidual na tentativa de desenvolver o melhor material que possa rapidamente estimular ou proporcionar um ambiente adequado para o crescimento de um novo tecido ósseo, necessário ao reparo do defeito esquelético,

além de reduzir a necessidade do uso de enxerto ósseo autólogo em grande quantidade (CUNHA et al., 2008).

1.1 Enxerto ósseo autólogo

Enxertos ósseos autólogos são partes ou fragmentos de osso retirados do próprio paciente, geralmente da crista ilíaca e transplantados para o local receptor que está necessitando de preenchimento tecidual (RATNER et al., 2013). São considerados o padrão-ouro para quase todas as indicações de preenchimento de defeitos no esqueleto humano (BLOKHUIS; ARTS, 2011; MAUFFREY et al. 2011). A sua indicação se deve ao fato de não apresentar rejeição imunológica, além de proporcionar o melhor efeito osteocondutivo, osteogênico e osteoindutor (CUNHA, 2001). Existem vários tipos de enxertos autólogos, incluindo o esponjoso, o córtico-esponjoso, o cortical vascularizado e o periostal (BLOKHUIS; ARTS, 2011; ZIMMERMANN; MOGHADDAM, 2011).

Enxertos autólogos córtico-esponjosos podem oferecer suporte estrutural para dispositivos de osteossíntese implantados. Fornecem suporte mecânico eficiente conforme são incorporados ao osso circunjacente receptor. No entanto, são reabsorvidos e possuem disponibilidade e viabilidade limitada. Estes enxertos são principalmente osteocondutores, apesar dos osteoblastos sobreviventes apresentarem algumas propriedades osteogênicas (ZIMMERMANN; MOGHADDAM, 2011). O enxerto autólogo esponjoso apresenta a vantagem de ter células osteoprogenitoras potenciais que são transferidas para o sítio receptor, além de sua excelente taxa de sucesso e baixo risco de doenças transmissíveis. Além disso, a ultraestrutura do osso esponjoso pode ser alterada durante o processo de transplante, permitindo o crescimento interno de novos vasos sanguíneos e a infiltração de novos osteoblastos essenciais para a regeneração óssea imediata. Entretanto, a vantagem teórica de promover osteogênese do enxerto esponjoso pode ser diminuída devido às células no interior do enxerto não sobreviverem mais do que duas horas após a sua retirada do local doador. (MAUFFREY et al. 2011;ZIMMERMANN; MOGHADDAM, 2011).

Enxertos vascularizados corticais consolidam rapidamente na interface hospedeiro-enxerto e sua remodelação é semelhante à do osso normal em uma fratura recente. Estes não sofrem reabsorção e revascularização, portanto, oferecem

resistência superior durante as primeiras seis semanas. (ZIMMERMANN; MOGHADDAM, 2011).

O emprego clínico dos enxertos periostais está baseado em sua capacidade de transportar células osteoprogenitoras, presentes na camada interna do periósteo, sendo importantes para o crescimento ósseo nos casos de fraturas (CARIA, 1999).

Independente do tipo de enxerto ósseo autólogo, há as desvantagens que limitam o seu uso como a morbidade no local doador, volume limitado da área doadora, risco de infecção no local doador, aumento de sangramento e prolongamento do tempo cirúrgico e anestésico (CARIA, 1999; DIMITRIOU, 2011; ZIMMERMANN; MOGHADDAM, 2011). Adicionalmente, o enxerto esponjoso não fornece suporte estrutural imediato pois é integrado rapidamente e somente alcança o equivalente de sustentação mecânica de um enxerto cortical no período de seis a doze meses. (MAUFFREY et al. 2011; ZIMMERMANN; MOGHADDAM, 2011).

1.2 Enxertos Homólogos e Heterólogos

Os enxertos ósseos homólogos são retirados de indivíduos da mesma espécie (cadáveres) e os heterólogos são retirados de espécies diferentes. Estes enxertos não apresentam as complicações da área doadora e teoricamente não possuem limites de quantidade ou forma. Entretanto, existem poucos centros de bancos de tecido ósseo e há o risco de reação de rejeição imunológica (CHRISTOPHER, 2002; GIANNOUDIS et al. 2005).

Enxerto ósseo obtido de cadáveres apresenta capacidade osteoindutiva devido à presença de proteínas morfogenéticas e osteocondutiva, mas com deficiência nas propriedades osteogênicas, visto a ausência de células vivas, além da estocagem do tecido ser um fator limitador. Suas maiores vantagens são a disponibilidade em várias formas e tamanhos, como também não haver problemas com a quantidade e dor no local doador. Porém, ainda existe alguma controvérsia em relação à transmissão de doenças infecciosas, o que limita muito a sua viabilidade e aplicabilidade clínica (GIANNOUDIS et al. 2005; ZIMMERMANN; MOGHADDAM, 2011).

Diante das desvantagens dos enxertos ósseos autólogos, homólogos e heterólogos, vem crescendo as pesquisas sobre os biomateriais a serem utilizados

como boa alternativa nos procedimentos cirúrgicos de restauração de defeitos ósseos (CUNHA et al, 2008).

1.3 Substâncias sintéticas: Biomateriais

Entre os substitutos ósseos sintéticos ou naturais, destacam-se as cerâmicas (GOSHIMA et al., 2012; MOREIRA, 2000; OOMS et al., 2003; ROOHANI-ESFAHANI et al., 2010; SHAH; EDGE; CLARK, 2009; TORRES et al., 2013); polímeros (MIDDLETON; TRIPTON, 2000); matrizes de colágeno (LOCILENTO, 2012; MOREIRA, 2005); proteínas morfogenéticas do osso (ISSA, 2009; MACHADO, 2012); malhas de vidro bioativos (BLENCKÈ, 1978; BOCCACCINI, 2005); selantes (MACHADO, 2012); osso desmineralizado como o Bio-Oss® (AMARAL, 2013), entre outros biomateriais já pesquisados nas terapias regenerativas (CUNHA et al., 2008; DIMITRIOU et al., 2011; GIANNOUDIS et al., 2005; LONG JR. et al., 2007; MAUFFREY et al., 2011).

O conceito fundamental que norteia o uso destes materiais sintéticos ou naturais nas terapias regenerativas ósseas é a obtenção da osteointegração, que pode ser definida como a conexão do tecido ósseo e o biomaterial implantado sem que haja a produção de tecido conectivo interposto (KONIG Jr., 2010; LEGEROS; CRAIG, 1993).

A osteoindução consiste em um conjunto de sinais químicos, humorais ou físicos que iniciam e sustentam os vários estágios do processo de regeneração óssea. Está relacionada com uma linhagem celular que se diferencia numa sequência de eventos que culminam com a formação de osso. (HAK, 2007; MOREIRA, 2005; RATNER et al., 2013).

Segundo Albrektsson e Johansson (2001), a osteoindução é o processo em que um estímulo, como um implante ou fratura, induz a diferenciação de células mesenquimatosas em osteoprogenitoras que, por sua vez, diferenciam-se em osteoblastos para iniciar a osteogênese pela secreção de matriz orgânica, como o colágeno. O estímulo neste tecido promove a liberação de fatores de crescimento ósseo e vascular que guiam a diferenciação e organização celular (KONIG JR., 2010).

A osteocondução representa a habilidade de uma substância de suporte ou implante em permitir a adesão de células osteoblásticas à sua superfície ou no seu

interior (RATNER et al., 2013). O crescimento ósseo se dá por aposição pela superfície do biomaterial. Na prática, a osteocondução depende da prévia osteoindução, pois o implante de um biomaterial deve proporcionar a indução de células indiferenciadas. Desta maneira, fica difícil em algumas situações, diferenciar entre indução e condução óssea, devido à inter-relação entre elas, apesar de não serem fenômenos totalmente idênticos (ALBREKTSSON; JOHANSSON, 2001; KONIG JR., 2010).

A capacidade de promover osteocondução depende primordialmente do suprimento vascular local, fatores biológicos de crescimento ósseo, reações teciduais do local receptor e as características do biomaterial como sua forma geométrica, porosidade e a capacidade de sua reabsorção gradativa pela substituição do osso neoformado (JANICKI; SCHMIDMAIER, 2011). Como exemplos de materiais osteoindutores e/ou osteocondutores destacam-se as matrizes ósseas desmineralizadas, as BMPs e o colágeno (MAUFFREY et al., 2011; ZIMMERMANN; MOGHADDAM, 2011).

A matriz óssea desmineralizada apresenta potencial osteocondutivo e osteoindutivo, mas não capacidade osteogênica, devido ao seu processamento. Não induz reação local de corpo estranho devido à estrutura do osso ser destruída durante a desmineralização. A atividade biológica da matriz óssea desmineralizada é provavelmente atribuída às proteínas e aos vários fatores de crescimento presentes na matriz extracelular. Estes fatores ficam disponíveis no local receptor pelo processo de mineralização. Essas matrizes são preparadas por extração ácida de aloenxertos e mantêm o colágeno e proteínas ósseas importantes para a regeneração tecidual (ZIMMERMANN; MOGHADDAM, 2011).

As proteínas morfogenéticas ósseas humanas, como a BMP-7 e BMP-2, têm apresentado, em ensaios clínicos prospectivos randomizados, a capacidade osteoindutora em casos de não união de tíbia na mesma proporção do enxerto ósseo autólogo. São caracterizadas pelo imenso potencial osteoindutivo na cascata de eventos da condro-osteogênese durante a formação e consolidação óssea, incluindo a quimiotaxia, a proliferação mesenquimal de células progenitoras e sua diferenciação em linhagem cartilaginosa ou osteogênica (MACHADO, 2012; ZIMMERMANN; MOGHADDAM, 2011).

De acordo com Zimmermann e Moghaddam (2011), a capacidade

osteogênica da BMP pode ser alterada devido ao armazenamento, processamento e aos métodos de esterilização, podendo variar em cada doador, no entanto sua concentração é menor que no osso humano normal.

Apesar da BMP apresentar capacidade de osteoindução, é necessário um material carreador para aplicação destas proteínas, a fim de poder disponibilizá-la por um período de tempo maior, já que se difunde rapidamente do sítio em que foi aplicada, abreviando, portanto, seu papel osteogênico (FUJIMURA et al., 1995).

Dentre os carreadores, comumente utilizados, estão as matrizes ósseas e os compostos de colágeno, visto ser um componente orgânico natural do osso, bem como o protótipo ideal de uma substância osteocondutora (BHAKTA et al., 2013; DAWSON et al., 2009; GEIGER; LI; FRIESS, 2003; MARTIN et al., 2013; SARBAN et al., 2009).

1.4. Colágeno

A matriz extracelular (MEC) do osso é composta por 90% de proteínas de colágeno, principalmente do tipo I (97%), do tipo V (3%) e 10 % de proteínas não colágenas como a osteocalcina, osteonectina, proteoglicanos, fibronectina, fatores de crescimento, proteínas morfogenéticas, e outros (CUNHA, 2011; RATNER, 2013).

A estrutura da MEC consiste em macromoléculas agrupadas em elementos fibrilares, composta principalmente por colágeno e não fibrilares, em que se destacam os glicosaminoglicanos (GAGs), ligados aos proteoglicanos, que auxiliam na interligação com outros tecidos. As propriedades mecânicas e fisiológicas variam de acordo com a quantidade e proporção destes componentes (ANASTASIA 2013; LACERDA; PLEPIS; GOISSIS, 1998; MOREIRA, 2005).

O papel da MEC atualmente é considerado relevante na regulação do comportamento celular ao seu redor. Assim, matriz extracelular artificial vem sendo utilizada como suporte, simulando o ambiente intersticial dos seres vivos, permitindo adesão e crescimento celular. É considerada uma boa opção na terapia regenerativa com polímeros naturais presentes na matriz extracelular, incluindo o

colágeno (ANASTASIA 2013; IATECOLA, 2012; LACERDA; PLEPIS; GOISSIS, 1998; MOREIRA, 2005).

A molécula de colágeno é longa, rígida e apresenta configuração espacial de hélice tripla, formada pelo enrolamento de 3 cadeias de polipeptídios, unidas entre si, por meio de ligações de hidrogênio, nas quais um resíduo de glicina se repete sempre a cada três aminoácidos na sequência (CUNHA, 2006; PLEPIS; GOISSIS; DAS-GUPTA, 1996). A figura 1 apresenta esquematicamente a estrutura do colágeno.

Figura 1. Diagrama de formação e estrutura do colágeno; a) fórmula estrutural dos aminoácidos mais comuns à molécula do colágeno; b) estrutura primária da molécula do colágeno; c) representação da estrutura secundária da molécula de colágeno, com a configuração espacial de uma hélice tripla (extraído e modificado de MOREIRA et al., 2004).

O colágeno de origem bovina e equina, principalmente do tipo I, devido à sua abundância e propriedades físicas e biológicas, têm sido utilizados em várias aplicações clínicas (CUNHA, 2006). Apresentam-se como desvantagens seu custo extremamente alto no processo de purificação, a variabilidade, quando usado

isoladamente no tamanho das fibras, impurezas e densidade de ligações cruzadas que estabilizam a estrutura de suas fibrilas (MOREIRA et al., 2013).

Além destes, existem a baixa resistência mecânica à tração e ineficácia, quando implantado em locais receptores infectados (CUNHA, 2006). Algumas modificações nas propriedades químicas do colágeno podem ser necessárias para superar essas desvantagens. Essas alterações incluem o aumento de ligações cruzadas para melhorar a força de tensão, a associação do colágeno a outros materiais e até mesmo a adição de fatores de crescimento, glicosaminoglicanos e outras moléculas, como a elastina, à sua estrutura. Estas modificações ao mesmo tempo melhoram a estabilidade mecânica e diminuem a biodegradabilidade, protegendo a reabsorção pelo organismo (MOREIRA et al., 2004; MOREIRA et al., 2013).

Adicionalmente, o aumento na carga negativa na molécula de colágeno melhora as suas propriedades de pizeletricidade, sendo essencial para o processo da osteogênese durante o reparo ósseo (LACERDA; PLEPIS; GOISSIS, 1998; GOISSIS et al. 1999; MOREIRA et al., 2013).

A utilização dos polímeros naturais, como o colágeno, tem sido demonstrada como uma importante função de regulação do fenótipo celular, simulando a matriz extracelular. Pesquisas *in vivo* e *in vitro* recentes comprovaram as vantagens e propriedades biocompatíveis, osteoindutoras e osteocondutoras do colágeno, quando aplicado nas terapias de regeneração óssea (CUNHA, 2008; MOREIRA, et al. 2013).

Outros polímeros também vem se destacando na bioengenharia óssea, como a quitosana, que permite a adesão e proliferação celular (MOREIRA, 2005).

Quando os componentes de colágeno e quitosana são utilizados em associação, formam as blendas poliméricas, tornando-se uma combinação interessante como método alternativo nas terapias regenerativas (MEINING et al., 1996; TONHI; PLEPIS, 2002; SILVA et al., 2007; WANG; RAO; STEGEMANN, 2013).

1.5. Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo catiônico produzido através da desacetilação da quitina encontrado no exoesqueleto de crustáceos, moluscos e insetos, (BUMGARDNER, et al. 2007; LOCILENTO, 2012; VENKATESAN; KIM, 2010). Este processo proporciona que a sua molécula seja mais solúvel em soluções aquosas diluídas em ácidos orgânicos e inorgânicos.

O grau de desacetilação do polissacarídeo determina a diferença entre quitina e quitosana. O polímero é considerado quitosana quando é alcançado o índice mínimo de 50% de desacetilação. O grau de desacetilação pode ser determinado por vários métodos, incluindo a espectroscopia de absorção no infravermelho, espectroscopia de ultravioleta, titulação condutimétrica e outros (LOCILENTO, 2012; VENKATESAN; KIM, 2010).

A quitosana tem propriedades estruturais com semelhanças aos glicosaminoglicanos. Na matriz extracelular nativa, os proteoglicanos e glicosaminoglicanos apresentam uma função importante na estrutura fibrilar do colágeno em função de proporcionar estabilidade mecânica e resistência compressiva (HORN; MARTINS; PLEPIS, 2009). A quitosana, além de ser abundante e de baixo custo, é também um ótimo adsorvente de metais pesados, possui capacidade para formar complexos com íons de metais de transição, devido à presença de grupos amino em sua estrutura (JANEGITZ et al. 2007), como mostra a figura 2.

Figura 2. Estrutura química da quitina e esquemática da quitosana (extraído e modificado de LOCILENTO, 2012).

Uma importante perspectiva de aplicação clínica da quitosana é a liberação controlada de drogas através de nanopartículas. Está descrita ainda sua atuação na

área de suplementos alimentares, com objetivo de diminuir os níveis de colesterolemia. Possui propriedades osteogênicas, além de ser biocompatível e biodegradável (BUMGARDNER, et al. 2007). Apresenta capacidade de ser processada em estruturas porosas que permitam a proliferação celular na regeneração tecidual. (LOCILENTO, 2012; SILVA et al., 2007; TONHI; PLEPIS, 2002).

Além disso, tem índice de degradação e atividades hemostáticas adequadas. Está relatada a sua propriedade bacteriostática, inibindo germes Gram positivos e negativos e no tratamento de gengivites. Alguns relatos indicam o uso de cimentos de quitosana em defeitos ósseos em animais, com presença de formação óssea (SHUE et al. 2012). Outro aspecto positivo está relacionado ao processamento de camarões, lulas e caranguejos, acarretando a diminuição da poluição dos mares advinda da pesca comercial (VENKATESAN; KIM, 2010).

1.6 Quitosana e Hidroxiapatita

Os materiais do tipo compósitos, que consistem na combinação de diferentes materiais no sentido de aumentar as propriedades mecânicas e físico-químicas, têm uma importância crescente nos dias atuais na Engenharia de Tecidos (AFFONSO, 1998; VENKATESAN; KIM, 2010).

A quitosana é flexível, mas não possui característica mecânica capaz de suportar as cargas de forma semelhante ao osso natural. No entanto, a adição de materiais cerâmicos melhora a sua capacidade de contribuir no reparo de defeitos ósseos. Conforme comprovado, os materiais de fosfato de cálcio são osteocondutores e mimetizam a porção inorgânica do osso natural, justificando a associação da quitosana e hidroxiapatita (HA) no sentido de proporcionar características estruturais e funcionais mais próximas ao tecido ósseo (VENKATESAN; KIM, 2010).

1.7. Hidroxiapatita

A hidroxiapatita é uma das formas mais estáveis de cálcio e fosfato e está presente no osso como um dos componentes principais (60 a 65%). A cerâmica de

hidroxiapatita, como o β -trifosfato de cálcio, tem sido utilizada como material de substituição óssea há mais de três décadas (HAK, 2007). A sua composição química é muito próxima à fase mineral do osso e justifica a origem de sua excelente biocompatibilidade. Este aspecto estrutural fornece à hidroxiapatita características fundamentais no processo de auxiliar o reparo ósseo. A hidroxiapatita pode ser utilizada nas formas de grânulos, cimentos e blocos ou cunhas pré-formadas, que podem ser densas ou porosas (CUNHA, 2001; SOPYAN et al., 2007). É composta por um material inorgânico, não-metálico, de estrutura cristalina e geralmente processado sob altas temperaturas (ZIMMERMANN; MOGHADDAM, 2011).

A maioria das cerâmicas é de aspecto duro, mas com porosidade frágil. Porém, a sua osteocondutividade permite a proliferação, migração e a expressão fenotípica das células ósseas, levando à formação aposicional de osso novo. A reabsorção é determinada por diversos fatores, como as condições do leito receptor, dos osteoclastos e células gigantes-celulares. (ZIMMERMANN; MOGHADDAM, 2011). Salienta-se o fato de esta reabsorção ser extremamente lenta quando usadas *in vivo*, sendo considerada osteocondutora primordialmente (LONG JR. et al., 2007).

Destacam-se também, a sua capacidade de ser armazenada por longos períodos de tempo, baixo risco de transmissão de doenças, disponibilidade em várias formas e tamanhos, e quantidade ilimitada (ZIMMERMANN; MOGHADDAM, 2011).

Amaral (2013), comparou a utilização da hidroxiapatita com outros biomateriais em defeito crítico de calvária de ratos e concluiu que ela tem grande potencial de ser utilizada no preenchimento de falhas ósseas.

As desvantagens são relacionadas à sua falta capacidade de apresentar estabilidade cortical e não ser osteoindutiva ou osteogênica por si própria (ZIMMERMANN; MOGHADDAM, 2011).

1.8. Blendas

As blendas poliméricas são constituídas da mistura de, pelo menos, dois polímeros ou copolímeros, sem que haja qualquer reação química entre eles. Desta maneira, o colágeno e a quitosana, associada ou não à hidroxiapatita, têm sido bastante utilizados nas terapias reconstrutivas, pois são polímeros biocompatíveis, atóxicos e biodegradáveis, além de possuírem inúmeras propriedades biológicas.

Podem ser aplicados sob forma de gel, filme, esponja, hidrogel e outros. Mostraram-se promissores no uso como curativos para cicatrização, regeneração tecidual e na liberação controlada de fármacos (LOCILENTO, 2012).

Esponjas de quitosana e colágeno têm demonstrado possuir maior resistência à degradação enzimática, se comparadas a esponjas isoladas de colágeno ou quitosana. Também constatou-se que a quitosana promove um aumento da resistência biomecânica das esponjas, agindo também como biomateriais osteocondutores (LOCILENTO, 2012).

A combinação de polímeros biocompatíveis e reabsorvíveis com materiais cerâmicos pode imitar a função natural do osso. A combinação de biomateriais como quitosana e hidroxiapatita tem um potencial promissor nas terapias regenerativas. Entretanto, ainda existem problemas relacionados à sua capacidade de suporte mecânico. O desenvolvimento de pesquisas sobre a eficácia destes compostos abrirá grandes possibilidades para o futuro da engenharia de tecido ósseo (VENKATESAN; KIM, 2010).

O principal estímulo desta pesquisa experimental reside na busca de resultados que auxiliem na avaliação de biocompósitos agindo em associação na reparação de falhas ósseas. Atualmente, existe uma necessidade enorme de desenvolver produtos que respondam às demandas dos pacientes atingidos por diversas formas de defeitos ósseos.

A literatura apresenta material focado principalmente no uso isolado dos biomateriais. A ideia de combinar vários polímeros permite-nos supor que obteremos respostas mais efetivas do ponto de vista da consolidação e regeneração do tecido ósseo.

2. OBJETIVOS.

2.1. Objetivo geral

- Analisar qualitativa e quantitativamente a viabilidade da utilização de blendas poliméricas no processo de neoformação óssea ocorrida durante o reparo de defeitos provocados experimentalmente na calota craniana de ratos.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar a biocompatibilidade das blendas poliméricas;
- Avaliar a capacidade osteogênica das blendas poliméricas;
- Determinar a presença ou não da osteointegração das blendas;
- Caracterizar a morfologia do osso neoformado através da observação da constituição celular e birrefringência das fibras colágenas;
- Quantificar o volume ósseo relativo neoformado na área cirúrgica do crânio dos animais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Confeção Dos Biomateriais

As blendas poliméricas utilizadas nesta pesquisa foram desenvolvidas pelo Grupo de Bioquímica e Biomateriais do Instituto de Química de São Carlos - USP (anexo A).

3.2 Estudo Experimental

Foram utilizados 30 ratos (*Rattus norvegicus*, Wistar) machos com aproximadamente 12 semanas de idade, peso médio de 300g, fornecidos pelo Centro Multi-Institucional de Bioterismo (CEMIB/UNICAMP) e mantidos no biotério da Faculdade de Medicina de Jundiaí. Os animais receberam ração balanceada (ração Purina) e água *ad-libitum*. O ambiente teve a temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e ciclo claro/escuro de 12/12 horas, sendo o início do período de claro às 07 horas. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Jundiaí (CEUA/FMJ), protocolo 301/12 (anexo B). Os animais foram distribuídos em 6 grupos com 5 animais cada, sendo:

Grupo 1 (G1): ratos com falha no osso parietal esquerdo, sem preenchimento de implante (grupo controle). Sacrificados com 3 semanas de pós-operatório.

Grupo 2 (G2): ratos com falha no osso parietal esquerdo, preenchida com blenda polimérica de colágeno e quitosana. Sacrificados com 3 semanas de pós-operatório.

Grupo 3 (G3): ratos com falha no osso parietal esquerdo, preenchida com blenda polimérica de colágeno e quitosana associada à hidroxiapatita. Sacrificados com 3 semanas de pós-operatório.

Grupo 4 (G4): ratos com falha no osso parietal esquerdo, sem preenchimento de implante (grupo controle). Sacrificados com 8 semanas de pós-operatório.

Grupo 5 (G5): ratos com falha no osso parietal esquerdo, preenchida com blenda polimérica de colágeno e quitosana. Sacrificados com 8 semanas de pós-operatório.

Grupo 6 (G6): ratos com falha no osso parietal esquerdo, preenchida com blenda polimérica de colágeno e quitosana associada à hidroxiapatita. Sacrificados com 8 semanas de pós-operatório.

3.3 Técnica Cirúrgica para Criação da Falha Óssea Craniana

Inicialmente, os animais foram anestesiados com a solução anestésica de Coopazine (Xylazina) como sedativo, analgésico e relaxante muscular e Dopalen (Ketamina) como anestésico geral, fornecido pela Agibrands do Brasil LTDA- Campinas, SP, Brasil, na proporção de 1:1 e na dose de 0,10 mg / 100 gramas de massa corpórea, via intramuscular (CUNHA et al., 2008). Também foi aplicada em ambos os olhos dos animais, durante a cirurgia, uma gaze estéril embebida em soro fisiológico a 0,9% com o objetivo de prevenir o ressecamento das córneas.

Os animais foram colocados em decúbito ventral e realizada a tricotomia e assepsia da região da calvária a ser operada. A pele foi incisada longitudinalmente e afastada lateralmente para expor os ossos parietais. O periósteo foi incisado e descolado com material cirúrgico apropriado e através de uma broca cirúrgica do tipo trefina, acoplada a um minimotor (ELTEC LB-100), foi realizada uma lesão com 5 mm de diâmetro (BOHNING; DAVENPORT; JEANSONNE, 1999; BOSCH; MELSEN; VARGERVIK, 1998; LI et al., 2011; POTIJANYAKUL et al., 2010; PEREIRA et al., 2012; RODRIGUEZ et al., 2011, ROJBANI et al., 2011) no osso parietal esquerdo da calota craniana dos ratos, ocupando praticamente toda a largura do referido osso desde sua borda lateral até sua borda medial na sutura sagital (interparietal). As membranas poliméricas foram implantadas preenchendo completamente a falha provocada, exceto nos grupos controle (G1e G4), conforme demonstrado na figura 3.

Figura 3. Procedimento cirúrgico da criação da lesão óssea craniana no rato. a) incisão cutânea na região calota craniana; b) acesso ao osso parietal esquerdo c) trefina utilizada na confecção da falha óssea; d) falha óssea no parietal esquerdo com preservação da dura mater encefálica; e) seta indicando blenda polimérica; f) blenda implantada e preenchendo o espaço da falha óssea.

3.4 Sutura dos Tecidos e Medicação

Após a implantação da membrana ou não, como no caso do grupo-controle, foi realizada a sutura dos tecidos, sendo o periósteo e a pele reposicionados com fio de seda 5.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil). Em seguida, cada animal recebeu uma dose de 0,1mg/100g de peso do antibiótico Pentabiotic Veterinário Pequeno Porte (Fort Dodge®, Campinas, SP, Brasil). No local da ferida cutânea da região cirúrgica foi aplicado o antibiótico Rifamicina Spray. Também foi administrado o analgésico Paracetamol na dose de 20 mg/Kg de peso do animal, por via oral, a cada 8 horas durante a primeira semana pós cirúrgico (LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2009).

3.5 Controle Pós-operatório

Os animais operados ficaram isolados em gaiolas separadas, e receberam ração comum e água *ad libitum*. A limpeza das gaiolas foi realizada com troca da maravalha três ou até quatro vezes na semana, quando necessário. Além disso, foram monitorados constantemente no pós-cirúrgico (LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2009), tomando os cuidados com o estresse e dor.

3.6 Análise Macroscópica

Após a eutanásia dos animais com anestesia intraperitoneal, seguida de inalação de gás carbônico, as calotas cranianas foram abordadas cirurgicamente. As calotas cranianas foram fotodocumentadas e retiradas com uma serra oscilatória do modelo Taymin, YDJZ-IID.

3.7 Análise Radiográfica

As calotas cranianas dos animais foram radiografadas com aparelho Odel 300 miliamperes, foco com 100 miliamperes, tempo de 0,06 segundos e radiação de 40 Kv. As imagens radiográficas foram digitalizadas pelo sistema Agfa e visualizadas com objetivo de avaliar a integridade da falha óssea e áreas adjacentes (CUNHA et al., 2011; VITAL; BORGES; FONSECA, 2006).

3.8 Análise Histológica por Microscopia de Luz Transmitida (Ótica)

As amostras foram imersas no fixador de medula óssea (Allkimia®) por 10 dias e, em seguida no Descalcificador (Allkimia®). Após o período de descalcificação, entre 10 e 20 dias, a ação do ácido foi neutralizada por 24 horas em uma solução de sulfato de sódio a 5%. Em sequência, foram desidratadas em série crescente de álcoois: 70% (durante o período noturno), 80%, 85%, 90%, 95% e 100%. Após esta etapa, foram colocadas em partes iguais de álcool e xilol (durante o período noturno) e diafanizados em xilol, com trocas a cada 2 horas, sendo executadas três trocas; e, em seguida, incluídos em parafina. De cada amostra foram realizados cortes semisseriados de 5 µm de espessura e corados com os seguintes corantes:

- Hematoxilina e eosina: para marcação do tecido ósseo original, osso neoformado e diferenciação das células ósseas;
- Tricrômico de Masson: para diferenciação do osso maduro original, corado em vermelho, e do osso neoformado (jovem), corado em azul. Esta técnica tradicional para tecido conjuntivo cora também fibras colágenas em azul, destacando-as dos outros elementos do tecido.

O estudo qualitativo das lâminas permitiu avaliar o reparo da falha óssea através da observação das características do osso neoformado na área de criação do defeito ósseo, bem como diferenciar o osso existente original. Foi utilizado Fotomicroscópio NIKON ECLIPSE E200 e as imagens digitais foram analisadas através de objetivas com 4, 10 e 40 vezes de aumento.

3.9 Análise Histológica por Microscopia de Luz Polarizada

Após a preparação dos cortes, estes também foram corados com o método histoquímico de Picrosirius Red (solução aquosa saturada de ácido pícrico adicionada de 0,1g de vermelho da Síria F3b, Sírius red F3B-Bayer) para avaliação

dos constituintes fibrilares da matriz extracelular na área da lesão óssea (ISSA et al., 2009).

Os colágenos tipo I, II e III mostram interferências de cores e intensidades de birrefringências diferentes. O tipo I forma fibras espessas e sua birrefringência gera cores que vão do vermelho ao amarelo e representa um marcador molecular do estágio inicial de diferenciação osteoblástica (COHEN Jr., 2006). O tipo III forma fibras finas com tons esverdeados. O tipo II pode estar associado ao tipo I, sendo mais amarelo (JUNQUEIRA et al., 1979).

3.10 Análise Morfométrica

Esta análise baseou-se no método de estereologia, o qual permitiu determinar parâmetros tridimensionais de um tecido por meio de contagem de pontos de imagens bidimensionais. A quantificação do osso neoformado foi avaliada por estereologia, de acordo com o princípio de Delesse, observando-se a fórmula $V_v = P_p/P_t$ (%), em que: V_v é a densidade de volume ou volume relativo; P_p é a quantidade de pontos (intersecção de linhas) sobre o osso neoformado; P_t é o número total de pontos do sistema (MANDARIM-DE-LACERDA, 1999). Estas medidas foram realizadas através de uma ocular 10X, contendo um retículo de integração quadrilátero com 100 pontos acoplados ao microscópio de luz NIKON ECLIPSE E200.

3.11 Análise Estatística

Os valores obtidos para as análises do percentual do volume ósseo neoformado foram submetidos ao teste Anova, seguida de Tukey (MONTGOMERY, 1991; NOGUTI, 2010).

4. RESULTADOS

4.1 Análise Macroscópica

Em todos os grupos estudados, não foi observada, na área receptora do implante, nenhuma alteração patológica, como processo inflamatório, não união, erosão óssea, lesão ulcerativa, cisto, infecção, massa ou outros sinais característicos de rejeição imunológica.

Observou-se também a integridade da conformação óssea da região da calota craniana, bem como o contorno definido das margens da lesão óssea e a ausência de calo ósseo visível macroscopicamente. Ficou nítida a permanência do defeito ósseo criado experimentalmente, o que indica a ausência de reparo total da lesão óssea.

Nos grupos G2, G3, G5 e G6 observou-se uma área central diferenciada correspondente à blenda polimérica implantada de aspecto esbranquiçado e intacta, demonstrando que não houve absorção e degradação (figura 4).

Figura 4. Vista macroscópica inferior das calotas cranianas retiradas. Grupos sacrificados com 3 (G1 a G3) e 8 semanas (G4 a G6) de pós-operatório. Note a integridade anatômica da falha óssea (seta) em todos os grupos e a permanência das blendas (B) implantadas nos grupos G2, G3, G5 e G6. Indicados: G1 e G4 (falha óssea vazia), G2 e G5 (preenchida com blenda), G3 e G6 (blenda mais hidroxiapatita), PE (osso parietal esquerdo), PD (osso parietal direito), F (osso frontal), O (osso occipital).

4.2 Análise radiográfica

Nas áreas das lesões ósseas dos grupos G1 e G4, verificou-se ausência de radiopacidade central e periférica. Nos grupos G2 e G3, verificou-se a presença de radiopacidade nas bordas, sendo estas características mais acentuadas nos grupos G5 e G6. Ficou evidente o aspecto radiodenso na região central em G3 e G6, devido à presença da hidroxiapatita na blenda. Na interface osso-implante dos grupos G2, G3, G5 e G6, verificaram-se imagens radiolúcidas indicativas da proliferação de tecido conjuntivo e pouca neoformação óssea (IATECOLA, 2012). Em nenhum grupo foi observada presença de rarefação óssea de aspecto infeccioso ou outras condições clínicas sugestivas de incompatibilidade das blendas com o tecido ósseo receptor (figura 5).

Figura 5. Radiografia das calotas cranianas de animais sacrificados. Grupos com 3 (G1 a G3) e 8 semanas (G4 a G6) de pós-operatório. Notou-se-se as falhas ósseas (setas) sem evidência de rarefação indicativa de processo infeccioso. Em G3 e G6, observou-se a radiopacidade central mais acentuada devido ao implante da blenda associada com hidroxiapatita e o contorno radiolúcido da interface osso/implante.

4.3 Análise histológica

4.3.1 Animais sacrificados com 3 semanas de pós-operatório (G1 a G3)

Em todos os grupos, ocorreu a permanência da lesão óssea criada experimentalmente, devido à discreta neoformação óssea e abundante tecido conectivo (figuras 6, 7 e 8). Notou-se também a ausência de necrose das bordas da lesão óssea e ausência de infiltrados inflamatórios (figura 6).

O prolongamento da pequena neoformação óssea ocorreu em continuidade com as margens da lesão óssea a partir do osso original, mas não promoveu a união das bordas extremas da lesão óssea. O osso jovem apresentou-se com característica trabeculada e de natureza imatura, devido à disposição irregular das lacunas ovaladas, contendo osteócitos de núcleo pouco condensado e volumoso, caracterizando uma neoformação óssea celularizada (figuras 6 e 7).

No grupo G2 verificou-se maior projeção do osso jovem a partir das bordas da lesão em direção à falha óssea. Em G3, destaca-se a presença da blenda polimérica com as partículas de hidroxiapatita, estando o biomaterial com aspecto mais compacto e denso (figura 6).

No centro da área cirúrgica, ocorreu o predomínio de tecido conectivo neoformado, sendo mais disperso e delgado em G1 e mais volumoso e espesso nos grupos G2 e G3, devido à presença das blendas poliméricas. Não ocorreram pontos isolados de neoformação óssea em meio deste tecido conjuntivo que preencheu o centro da lesão óssea (figura 8).

Quanto à birrefringência do colágeno do tecido ósseo neoformado, notou-se a predominância do tipo I, visto a presença de fibras espessas e predomínio de cores que vão do vermelho ao amarelo.

Fibras de colágeno tipo III, expressas em verde, foram presenciadas na área do osso original das bordas da lesão óssea (figura 9). No centro da lesão óssea com predomínio de tecido conectivo e ausência de neoformação óssea, observou-se melhor birrefringência do colágeno tipo I e III no grupo G2, enquanto que no G3 ficou pouco visível a proliferação de fibras colágenas pelo interior da blenda, apresentando-se de forma compacta e densa pela presença do aglomerado de partículas de hidroxiapatita (figura 10).

Figura 7. Fotomicrografia em maior aumento da área periférica da lesão craniana na coloração com Tricrômico de Masson dos grupos sacrificados com três semanas de pós-operatório (G1 a G3). Notou-se osso neoformado de natureza imatura devido à presença de várias e desorganizadas lacunas ovaladas alojando osteócitos (setas). Aumento: 40 vezes.

Figura 8. Fotomicrografia da área central da lesão craniana na coloração com Tricrômico de Masson nos grupos sacrificados com três semanas de pós-operatório (G1 a G3). Notou-se tecido conectivo (TC) delgado e disperso em G1 e mais espesso e concentrado nos grupos G2 e G3 pela presença dos compostos das blendas utilizadas nos implantes. Aumentos: 4 e 10 vezes.

Figura 9. Fotomicrografia da área periférica da lesão craniana na coloração com Picrosirius Red nos grupos sacrificados com três semanas de pós-operatório (G1 a G3). Evidenciou-se a birrefringência das fibras colágenas tipo I de tom vermelho no osso neoformado (setas), projetando-se do osso original (O). Aumento: 10vezes.

Figura 10. Fotomicrografia da área central da lesão craniana na coloração com Picrosirius Red nos grupos sacrificados com três semanas de pós-operatório (G1 a G3). Observou-se a birrefringência do colágeno (setas) no tecido conectivo do centro da lesão óssea em G2. Em G3, discreta presença de fibras de colágeno tipo I invaginando no interior da blenda utilizada (HA). Aumento: 10vezes.

4.3.2 Animais sacrificados com 8 semanas de pós-operatório (G4 a G6)

Em todos os animais, notou-se a não regeneração total da lesão óssea, sendo caracterizada pela pouca neoformação óssea e abundante tecido conectivo (figura 11). O osso neoformado periférico projetou-se das margens da lesão óssea e em continuidade com o osso original.

Além disso, apresentou características de natureza imatura e também focos de maturação óssea, caracterizado pela aparência cortical e com poucas e organizadas lacunas alongadas alojando osteócitos. Não houve osteointegração das blendas em G5 e G6 por haver a presença de tecido conectivo interposto na interface osso/implante (figuras 11 e 12).

No centro da lesão houve concentração de tecido conectivo neoformado e, no caso de G5 e G6, misturou-se com a composição das blendas utilizadas. Em G6, a blenda apresentou-se de forma compacta e densa por haver a presença da concentração da hidroxiapatita utilizada. Não ocorreram focos de neoformação óssea em meio do tecido fibroso predominante (figuras 11 e 13).

Em relação à birrefringência do osso neoformado, ocorreu a presença de colágeno tipo I em tom vermelho nas áreas principalmente de natureza ainda imatura e tipo III de tom verde nas áreas de maturação óssea (figura 14).

No centro da lesão, a birrefringência do colágeno presente no tecido conectivo foi do tipo I, sendo menos acentuado e mais disperso em G5 (figura 15).

Figura 11. Fotomicrografia da área periférica da lesão craniana na coloração com Tricrômico de Masson nos grupos sacrificados com oito semanas de pós-operatório (G4 a G6). Notou-se osso neoformado (setas) de natureza imatura e madura projetando-se da margem do osso original (O) e abundante tecido conectivo (TC) na lesão óssea. Em G6, destacou-se o aspecto compacto da blenda associada à hidroxiapatita (HA). Aumentos: 4 e 10 vezes.

Figura 12. Fotomicrografia da área periférica da lesão craniana em maior aumento na coloração com Tricrômico de Masson nos grupos sacrificados com oito semanas de pós-operatório (G4 a G6). Notou-se osso neoformado com lacunas alojando osteócitos (seta). Em G6, notou-se a hidroxiapatita (HA) e tecido conectivo (TC) na interface osso/implante. Aumento: 40 vezes.

Figura 13. Fotomicrografia da área central da lesão craniana na coloração com Tricrômico de Masson dos grupos sacrificados com oito semanas de pós-operatório (G4 a G6). Notou-se tecido conectivo (TC) acentuado em G4 e G5 e menos presente em G6 devido a concentração de hidroxiapatita (HA) utilizada na blenda e sem sinais de reabsorção. Aumentos: 4 e 10 vezes.

Figura 14. Fotomicrografia da área periférica da lesão craniana na coloração com Picrosirius Red dos grupos sacrificados com oito semanas de pós-operatório (G4 a G6). Notou-se a birrefringência das fibras colágenas tipo I de tom vermelho do osso neoformado (setas) de aspecto ainda imaturo e colágeno tipo III em verde nas áreas de maturação óssea e no osso original (O). Aumento: 10 vezes.

Figura 15. Fotomicrografia da área central da lesão craniana na coloração com Picrosirius Red dos grupos sacrificados com oito semanas de pós-operatório (G4 a G6). Observou-se a birrefringência do colágeno I em vermelho (setas) presente no tecido conectivo (TC) do centro da lesão óssea. Em G6, as fibras de colágeno contornavam as partículas de hidroxapatita (HA). Aumento: 10 vezes.

4.4 Análise Morfométrica

As médias e desvios-padrão do volume percentual relativo de osso neoformado no defeito craniano dos grupos sacrificados com três semanas de pós-operatório (G1 a G3) foram 8.66 ± 0.81 , 21.16 ± 0.75 , 18.83 ± 0.75 , enquanto que, naqueles sacrificados após oito semanas (G4 a G6), foram 11.00 ± 1.67 , 20.50 ± 1.76 e 19.33 ± 2.25 respectivamente (gráfico 1).

Figura 16. Gráfico da análise morfométrica de G1 a G6 demonstrando o percentual de osso neoformado de cada grupo.

4.5 Análise estatística

Em relação ao tempo de sacrifício dos animais estudados (3 e 8 semanas), a análise estatística mostrou que os valores encontrados nos grupos-controle sem implante (G1 e G4) foram semelhantes entre si, porém menores ($p < 0.01$), quando comparados aos grupos que receberam as blendas poliméricas (G2, G3, G5 e G6). Além disso, não houve diferença estatística ao comparar as médias entre os grupos que tiveram os defeitos ósseos enxertados com os dois tipos de blendas no período de três semanas de pós operatório (G2 e G3), bem como no período de oito semanas (G5 e G6).

Ao fazer a comparação entre os períodos de tempo padronizados na pesquisa, observou-se que para os grupos-controle (G1 e G4) não houve diferença estatística. Da mesma forma, tal fato repetiu-se em G2 e G5, os quais receberam a blenda polimérica, e em G3 e G6, que receberam a blenda polimérica associada a hidroxiapatita.

5. Discussão

Na conceituação moderna, biomateriais não devem ter como função apenas o preenchimento de espaço, mas sim estimular uma resposta biológica específica, a qual depende de algumas propriedades particulares intrínsecas do material, como a distribuição eletrônica, arranjo tridimensional, conformação molecular, propriedades pizoelétricas, porosidade e as propriedades físico-químicas específicas.

O desenvolvimento desses biomateriais é baseado nos mecanismos que controlam a função que se deseja substituir e na relação estrutural do material com a propriedade que se pretende obter (RATNER, 2013).

Entre os biomateriais sintéticos utilizados nas recentes pesquisas e atendendo às exigências de biocompatibilidade e bioatividade, destacam-se as cerâmicas, como fosfato de cálcio e hidroxiapatita (MOREIRA, 2000; OOMS et al., 2003; SHAH; EDGE; CLARK, 2009; ROOHANI-ESFAHANI et al., 2010; GOSHIMA et al., 2012; TORRES et al., 2013), polímeros, incluindo o polimetilmetacrilato (GAUTAM et al., 2012), poli L-ácido láctico (CORAÇA et al., 2008; LEE et al., 2013; LI et al., 2011) e ácido poliglicólico (PATRASCU et al., 2013) selantes de fibrina (MACHADO, 2012), malhas de vidro bioativa (BLENCKÈ, 1978); entre outros. Estas pesquisas demonstraram a biocompatibilidade, bem como o nível da capacidade osteogênica e osteointegradora dos materiais no processo de regeneração tecidual. Entretanto, cada biomaterial já estudado ainda apresenta algumas desvantagens ou limitações, o que significa que ainda não existe o material sintético ideal para a reconstrução óssea.

Diante disso, justificam-se as várias pesquisas inovadoras no campo da Engenharia Tecidual. Nesta pesquisa, foram testados *in vivo*, componentes de colágeno, quitosana e hidroxiapatita associados, na expectativa de potencializar os aspectos funcionais positivos de cada biomaterial.

A biocompatibilidade é um dos principais aspectos a serem considerados no processo de utilização dos biomateriais e está relacionada à capacidade de um material desencadear uma resposta adequada do hospedeiro, numa aplicação específica (AFFONSO, 1998; RATNER, 2013). A biocompatibilidade de um material não inclui apenas os fenômenos de interação entre os tecidos circunjacentes do local receptor e o implante. Relaciona-se, também, com a sua biofuncionalidade durante as solicitações às quais são submetidos. A superfície do material é o local que interage em primeiro lugar com os fluidos orgânicos e, com o decorrer do processo de cicatrização tecidual, é a área onde vão ocorrer todos os fenômenos de regeneração óssea que levam à manutenção e ao sucesso clínico do implante (AFFONSO, 1998).

Chesnutt et al. (2009) estudaram o processo de produção de osteocalcina por osteoblastos *in vitro* e a formação óssea *in vivo* com a utilização de compósitos de suporte utilizando quitosana e hidroxiapatita. Demonstraram que este composto apresentou biocompatibilidade e osteocondutividade em defeitos ósseos provocados em calvária de ratos e ressaltaram o seu potencial regenerativo na área de engenharia de tecidos. Neste estudo, verificou-se a biocompatibilidade das blendas poliméricas implantadas no sítio receptor, visto a ausência macroscópica, radiográfica e histológica de necrose vascular e processos inflamatórios e infecciosos que caracterizam rejeição imunológica semelhante a corpo estranho.

Macroscopicamente, observou-se também a permanência e a integridade das blendas utilizadas após 3 e 8 semanas implantadas na calota craniana de ratos.

Segundo Billström et al. (2013), um enxerto de suporte ideal deve não só manter, induzir e restaurar as funções biológicas, mas também ter as características certas no que diz respeito à degradação, à absorção celular, à ligação celular, flexibilidade e principalmente a não imunogenicidade.

Shors (1999), acrescentou que o sucesso da implantação dos biomateriais está relacionado com a viabilidade do local receptor em permitir o crescimento ósseo e a estabilidade do implante, sem a presença de macro movimentos que possam interferir no processo de consolidação.

Corroborando com estas afirmações, observou-se, pelas análises macroscópicas e imagens radiopacas das radiografias do centro da lesão dos animais dos grupos G2, G3, G5 e G6, a preservação no local implantado das blendas poliméricas na área receptora.

Nas análises radiográficas, observou-se imagem de natureza radiolúcida no interior da falha óssea dos grupos G1 e G4 que não receberam implante e na interface osso/implante nos grupos G2, G3, G5 e G6 que receberam as blendas poliméricas. Esta característica radiológica se deve à proliferação de abundante tecido conectivo ou neoformação óssea em pequena quantidade. Segundo Fehlberg (2001), em todo processo de reparação óssea, desenvolve-se, inicialmente, tecido conjuntivo no foco da lesão e osso jovem imaturo, cuja radiopacidade é insuficiente para ser perceptível ao exame radiográfico. Desta maneira, os resultados radiológicos observados foram similares aos descritos na literatura (VITAL et al. 2006; CUNHA et al. 2011). No centro da lesão craniana dos grupos G3 e G6, notou-

se imagem mais densa, devido à presença da hidroxiapatita na blenda.

Dimitriou et al. (2012) relataram, como qualidade benéfica na utilização de biomateriais, a capacidade de produzir imagens radiográficas com aspecto radioluscente e desta forma permitir a avaliação e monitoramento da formação óssea no processo regenerativo da falha óssea. Na análise radiográfica do presente estudo, notou-se discreta radiopacidade das bordas da área receptora nos grupos que receberam as blendas poliméricas, principalmente nos animais sacrificados com 8 semanas de pós-operatório, demonstrando assim um aspecto de formação e maturação de tecido ósseo. As imagens dos grupos 1 e 4 não evidenciaram áreas de radiopacidade que indicassem formação de tecido ósseo conforme esperado, devido à ausência de implantes nestes animais.

Além disso, em todos os grupos, não se observou rarefação óssea indicativa de processos infecciosos como a osteomielite, indicando assim a biocompatibilidade dos biomateriais pelas análises radiológicas. Também não ocorreu abaulamento da superfície externa da tábua óssea na área cirúrgica como característica de uma formação de calo ósseo, confirmando assim a lentidão do processo biológico de neoformação óssea, o que também ficou evidenciada com as análises histológicas.

No estudo histológico, não foram observadas áreas de necrose óssea e infiltrados inflamatórios, contribuindo para corroborar a biocompatibilidade dos biomateriais já constatados nos achados macroscópicos e radiográficos. Estas características histológicas foram ressaltadas por Ratner (2013), o qual considera a presença de células inflamatórias e células gigantes como indicativas de reação de corpo estranho características de incompatibilidade biológica do enxerto. Amaral (2006), testou a citotoxicidade *in vitro* e a biocompatibilidade *in vivo* do colágeno,

quitosana e hidroxiapatita e concluiu que os biomateriais avaliados não apresentaram evidências de citotoxicidade *in vitro* e mostraram biocompatibilidade *in vivo*.

Desta maneira, em virtude das evidências apontadas nas pesquisas citadas e combinadas com os resultados deste estudo, podemos afirmar que as blendas utilizadas se prestam ao preenchimento de lesões em ossos de origem intramembranosa como no parietal, mesmo que o tecido ósseo formado seja de quantidade inferior e não tenha proporcionado a regeneração completa do defeito ósseo.

Em contrapartida, o sucesso de qualquer tipo de implante ou enxerto não depende apenas da biocompatibilidade e do tipo de material. Características como dimensões, propriedades da superfície e do sítio receptor, traumatismos durante o ato cirúrgico e o movimento da interface osso/implante devem ser levadas em consideração para que possam determinar o grau de eficácia na osteointegração do material (DUBOIS et al., 1999).

Além disso, a adesão celular a superfícies estranhas exerce profunda influência na integração biológica de implantes e no crescimento celular. A ligação da célula de ancoragem ao substrato é o primeiro passo nos processos de interação entre célula e superfície do material instalado. No caso dos biomateriais ortopédicos, a interação entre osteoblastos formadores de osso e o substrato pode influenciar a natureza da interface entre implante e osso neoformado (DUBOIS et al., 1999).

Nas análises histológicas das áreas cirúrgicas dos grupos que receberam as blendas, não houve invólucro ósseo e sim conectivos das referidas matrizes. Ficou marcante a presença de tecido conectivo na interface osso/implante até a oitava

semana e não houve sinal evidente de que haveria preenchimento da falha, provocada por tecido ósseo. Na zona de transição conectivo/osso, verificou-se a presença de poucos osteoblastos, discreta camada osteoide formada e abundante tecido conectivo, sugerindo pouca atividade metabólica e descaracterizando o processo de osteointegração do biomaterial, conforme relatado por König Jr. (2010).

Legeros e Craig (1993) relataram que, além do contato direto entre osso e implante conhecido como osteointegração, existe também outro tipo de integração com a camada de tecido fibroso interposto ao implante e osso, conhecido como fibro-óssea, significando a ausência de osteointegração total do biomaterial utilizado. Esta característica histológica foi a mais observada nos resultados desta pesquisa.

Quanto à discreta neoformação óssea observada nas análises histológicas e morfométricas, notou-se que, naqueles que receberam as blendas, alguns processos ósseos de forma alongada partiam do osso original em direção à blenda, resultante da osteocondução provocada pela presença do enxerto.

Salientou-se, nestas áreas de neoformação óssea, a presença característica de colágeno do tipo I. Este tipo de tecido foi o mais frequentemente encontrado no tecido de reparação, conforme demonstrado pela técnica da birrefringência do colágeno com luz polarizada. Porém, existem vários fatores que estão relacionados ao desempenho satisfatório de reparo tecidual, incluindo a constituição, morfologia e o processo de fabricação dos biomateriais. Não menos importantes, são as condições locais e a embriologia do tecido ósseo receptor.

Affonso (1998) assinalou, como um fator determinante no êxito da integração do implante nos tecidos orgânicos, a contaminação superficial do material enxertado.

A presença de resíduos na superfície do biomaterial pode alterar a sua composição química e condicionar significativamente o sucesso clínico.

Konig Jr. (2010), relatou a influência dos agentes tóxicos derivados dos biomateriais sobre a funcionalidade e a viabilidade celular após a sua implantação no hospedeiro, podendo ocasionar a diminuição e morte celular, devido à ausência de atividade metabólica, desintegração estrutural (membrana celular) e lise celular. Outros pesquisadores salientaram que a reabsorção é uma característica desejada aos biomateriais, nos quais o processo de degradação é concomitante à reposição do osso em formação (BOYDE, et al., 1999; OOMS, et al, 2003; SCHLIEPHAKE; KAGE, 2001). Nos resultados deste estudo, ao contrário, as blendas permaneceram intactas e naquelas associadas com hidroxiapatita (grupos G3 e G6), notou-se um aspecto mais compacto e denso pelo aglomerado da hidroxiapatita utilizada, dificultando não só o crescimento ósseo, mas também a proliferação de novas fibras de colágeno do tecido conectivo.

Schliephake e Kage (2001) comprovaram uma melhora da regeneração óssea, usando cerâmicas reabsorvíveis e material composto de polímero. Concluíram que o equilíbrio entre degradação e formação óssea é muito delicado e processos químicos, junto com reações celulares durante a degradação, podem agir como antagonistas à formação de tecido ósseo complementar.

Segundo Hannink e Chris Arts (2011), além do grau de degradação do biomaterial implantado, a porosidade também é extremamente importante, visto que deve ocorrer crescimento celular ósseo através dos poros, promovendo a osteointegração. O tamanho mínimo recomendado para invasão vascular e regeneração óssea é de 100-150 μm para macroporos e, em relação ao tamanho

mínimo, ainda com 50 µm seria possível a osteocondução (BLOKHUIS; ARTS, 2011; SOPYAN et al., 2007). Alguns autores advogam tamanho de poros entre 200 a 500 µm para colonização de osteoblastos, crescimento fibrovascular e deposição de tecido ósseo. No entanto, a literatura não é conclusiva em relação ao tamanho ideal dos poros. Outro aspecto relevante é a interconectividade entre os poros, a fim de permitir a invasão de células tipo osteoblastos e fixação celular. (HANNINK; CHRIS ARTS, 2011; SOPYAN et al., 2007). Estas conexões entre os poros permitem também a circulação, trocas de líquidos corporais e a difusão de íons. Poros sem conexão não participam destes eventos fisiológicos necessários ao processo regenerativo (SOPYAN et al., 2007).

Na análise histológica desta pesquisa, acreditamos que a porosidade das blendas não foi a ideal no sentido de permitir a proliferação celular óssea, visto que o osso neoformado concentrava-se nas margens da lesão óssea. As blendas tiveram em sua região central a interposição de tecido fibroso de forma mais abundante.

No caso dos grupos G3 e G6 levanta-se também a questão do tamanho de cristais de hidroxiapatita e da baixa interconectividade dos poros ter influenciado na osteogênese. Conforme observado nas figura 16 e 17 do anexo I, o elevado tamanho de alguns de poros pode ter comprometido a invasão de vasos e consequente proliferação celular regenerativa.

Desta maneira, novas pesquisas, quanto ao processo de absorção, porosidade e quantidade da mineralização tornam-se necessárias, visto que na literatura existem relatos com resultados promissores de regeneração óssea usando polímeros naturais como colágeno, quitosana ou a combinação de ambos, porém de

características e processos químicos de fabricação diferentes, podendo interferir diretamente nas suas propriedades regenerativas, quando utilizadas na Engenharia de Tecidos (ANASTASIA 2013; MOREIRA, 2005; VENKATESAN; KIM, 2010).

Cunha et al. (2008) observaram boa neoformação óssea, ao utilizar matrizes de colágeno polianiónico implantadas em defeitos provocados no fêmur de ratos e resultados promissores deste biomaterial também foram relatados por Moreira (2013), ao observar in vitro, a proliferação de células ósseas sobre essas matrizes.

Em comum, as pesquisas acima utilizaram matrizes aniônicas tratadas em 72 e 96 horas de tratamento por hidrólise alcalina e tais modificações tridimensionais melhoraram as propriedades fisiológicas das matrizes, refletindo na sua capacidade osteogênica e bioativa.

Nesta pesquisa, foram utilizados polímeros de colágeno tratados em 96 horas de hidrólise alcalina, fato que não permite supor que tenha contribuído negativamente para os resultados relativos à osteointegração observada.

Polímeros naturais como a quitosana estão se tornando cada vez mais importantes como biomateriais de suporte para engenharia de tecido ósseo através do reconhecimento de sua biofuncionalidade e excelente biocompatibilidade com o ambiente do corpo humano. Ao longo das duas últimas décadas, a quitosana tem sido testada em aplicações biomédicas devido à sua elevada biocompatibilidade, biodegradabilidade, a estrutura porosa, aptidão para crescimento celular interno, osteocondução e natureza antibacteriana intrínseca (VENKATESAN; KIM, 2010).

A quitosana por si só não pode mimetizar todas as propriedades do osso natural, mas, quando associada a outros polímeros ou cerâmicas, pode constituir um composto capaz de proporcionar a reparação de lesões ósseas. Conforme

comprovado, os biomateriais de fosfato de cálcio são osteocondutores por imitar a porção inorgânica do osso natural, enquanto os biomateriais de quitosana e hidroxiapatita são promissores em imitar a porção orgânica, bem como a porção inorgânica do osso natural. Assim, vários estudos têm sido realizados com estes compósitos para a engenharia de tecido ósseo, uma vez que foi demonstrada capacidade de promover o crescimento de células osteoblásticas (VENKATESAN; KIM, 2010).

Apesar da baixa neoformação óssea observada nas áreas enxertadas com as blendas poliméricas, conforme resultado da análise morfométrica e estatística, ainda notou-se que os valores foram maiores na comparação com os grupos que não receberam enxertos na lesão óssea. Diante deste fato e pela satisfatória composição microestrutural das blendas poliméricas revelada pela microscopia eletrônica de varredura, infere-se que fatores extrínsecos também podem influenciar na intensidade da osteogênese em casos de enxertia óssea. Entre eles, destaca-se a origem embriológica do tecido ósseo estudado, pois segundo Camilli et al (2004), Prolo e Oklund (1991) e Sasano et al (1995), os ossos intramembranosos, como o crânio, são menos osteogênicos, quando comparados ao fêmur e tíbia, que são de origem endocondral e apresentam a camada interna do perióstio com células osteoprogenitoras capazes de proporcionar uma maior neoformação óssea.

Também se notou que não houve diferença estatística entre os períodos de três e oito semanas, reforçando a hipótese da lenta capacidade osteogênica dos ossos intramembranosos. Com isto, tão importante quanto à composição química, física e estrutural do biomaterial para estimular e acelerar o processo do reparo ósseo, também deve ser considerado os fatores externos ao biomaterial como o tipo de osso em que ocorre a enxertia, trauma cirúrgico da implantação dos enxertos,

revascularização e preservação da camada osteogênica do periósteo após o procedimento cirúrgico.

Devido a todas estas características acima, a viabilidade dos polímeros de colágeno e quitosana ainda merecem ser melhor investigados pelos centros de pesquisas que os fabricam e nas aplicações *in vivo*, visto que nesta pesquisa não foram obtidos resultados promissores quanto ao volume de osso neoformado para o tipo de blendas confeccionadas e implantadas na calota craniana de ratos. Desta maneira, a busca do biomaterial ideal para enxertia ainda é claramente um desafio, pois o processo de osteointegração com reparo ósseo aceitável depende não somente da constituição química e do arranjo tridimensional dos biomateriais, mas também das características estruturais do sítio receptor do enxerto.

6. Conclusões

- As blendas poliméricas demonstraram biocompatibilidade nos defeitos ósseos, provocados na calota craniana de ratos, devido à ausência de infiltrado celular característico de processo inflamatório;
- As blendas demonstraram baixa capacidade osteogênica, devido à permanência da lesão óssea, provocada experimentalmente nos animais;
- Não houve a osteointegração das blendas, devido ao abundante tecido conectivo formado na área receptora;
- Houve predominância de fibras de colágeno, primordialmente do tipo I no osso neoformado;
- Não houve diferença morfométrica quanto à capacidade osteogênica entre as blendas poliméricas sem e com a hidroxiapatita, independente do tempo do sacrifício pós-operatório.

7. Referências¹

ABDEL-AAL, A. M. Ilizarov bone transport for massive tibial bone defects. **Orthopedics**, v. 29, n. 1, p. 70-74, 2006.

AFONSO, A. S. **Interação entre biomateriais e tecido ósseo**. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto. Porto, 1998.

ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **Eur Spine J.**, v. 10, p. 96-101, 2001.

AMARAL, M. B. **Citotoxicidade in vitro e biocompatibilidade in vivo de compósitos a base de hidroxiapatita, colágeno e quitosana**. Dissertação de Mestrado, Bioengenharia/USP, São Carlos/SP, 2006.

AMARAL, M. B. **Capacidade De Regeneração Óssea De Biomateriais Em Defeito Crítico De Calvária: Análise Histológica E Microtomografia Computadorizada**. Tese de Doutorado, Bioengenharia/USP, São Carlos/SP, 2013.

ANASTASIA, L.; ROTA, P.; ANASTASIA, M.; ALLEVI, P. Chemical structure, biosynthesis and synthesis of free and glycosylated pyridinolines formed by cross-link of bone and synovium collagen. **Org Biomol Chem.**, v. 11, n. 35, p. 5747-5771, 2013.

BHAKTA, G.; LIM, Z. X.; RAI, B.; LIN, T.; HUI J. H.; PRESTWICH, G. D.; VAN WIJNEN, A. J.; NURCOMBE, V.; COOL, S. M. The influence of collagen and hyaluronan matrices on the delivery and bioactivity of bone morphogenetic protein-2 and ectopic bone formation. **Acta Biomater.**, v. 13, p. 347-354, 2013.

BILLSTRÖM, G. H.; BLOM, A. W.; B.; LARSSON, S.; BESWICK, A. D. Application of scaffolds for bone regeneration strategies. **Injury, Int. J. Care Injured**, v. 44, p. 28–33, 2013. Supplement 1.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

BLENCKÈ, B. A. Compatibility and long-term stability of glass-ceramic implants. *J Biomed Mater Res.*, v. 12, n. 3, p. 307-316, 1978.

BLOKHUIS, T. J.; ARTS, J. J. Bioactive and osteoinductive bone graft substitutes: Definitions, facts and myths. *Injury, Int. J. Care Injured*, v. 42, p. 26–29, 2011. Supplement 2.

BLOKHUIS, T. J.; CALORI, G. M.; SCHMIDMAIER, G. Autograft versus BMPs for the treatment of non-unions: what is the evidence? *Injury, Int. J. Care Injured*, v. 44, p. 40-42, 2013. Supplement 1.

BOCCACCINI, A. R.; BLAKER, J. J. Bioactive composite materials for tissue engineering scaffolds. *Expert Rev Med Devices*; v. 2, p. 303-312, 2005.

BOHNING B. P.; DAVENPORT, W. D.; JEANSONNE, B. G. The effect of guided tissue regeneration on the healing of osseous defects in rat calvária. *J Endod*, v. 25, p. 81- 84, 1999.

BOSCH, C.; MELSEN, B.; VARGERVIK, K. Importance of the critical-size bone defect. Testing bone-regenerating materials. *J Craniofac surg.* v. 9, p. 310-316, 1998.

BOYDE, A.; CORSI, A.; QUARTO, R.; CANCEDDA, R.; BIANCO, P. Osteoconduction in large macroporous hydroxyapatite ceramic implants: evidence for a complementary intergration and desintegration mechanism. *Bone*, v. 24, n. 6, p. 579-589, 1999.

BUMGARDNER, J. D.; CHESNUTT, B. M.; YUAN, Y.; APPLEFORD, M.; OH, S.; MCLAUGHLIN, R.; ELDER, S. H.; ONG, J. L. The integration of chitosan-coated titanium in bone: an in vivo study in rabbits. *Implant Dent.*, v. 16, n. 1, p. 66-79, 2007.

CAMILLI, J. A.; CUNHA, M. R.; BERTRAN, C. A.; KAWACHI, E. Y. Subperiosteal hydroxyapatite implants in rats submitted to ethanol ingestion. *Arch Oral Biol*; v. 49, n. 9, p. 747–53, 2004.

CARDOSO, M. A. **Contribuição ao estudo da reação de desacetilação de quitina: estudos da desacetilação assistida por ultra-som de alta potência.** Tese (Doutorado em Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

CARIA, P. H. F. **Enxerto periosteal e hidroxiapatita no tratamento da falha óssea produzida na maxila de ratos.** Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, 1999.

COHEN Jr., M. M. The new bone biology: Pathologic, Molecular and Clinical Correlates. **American Journal of Medical Genetics**, v. 140A, p. 2646-2706, 2006.

CORAÇA, D. C.; DUEK, E.A.; PADOVANI, C. A.; CAMILLI, J. A. Osteointegration of poly (L:-lactic acid) PLLA and poly (L:-lactic acid) PLLA/Polly (ethylene oxide) PEO implants in rat tibial. **J. Mater Sci. Mater Med.**, v. 19, n.7, p. 2699-2704, 2008.

CHESNUTT, B. M.; YUAN, Y.; BUDDINGTON, K.; HAGGARD, W. O.; BUMGARDNER, J. D. Composite chitosan/nano-hydroxyapatite scaffolds induce osteocalcin production by osteoblasts in vitro and support bone formation in vivo. **Tissue Eng.**, v. 15, pt A, n. 9, p. 2571-2589, 2009.

CUNHA, M. R. **Implantes subperiosteais de hidroxiapatita em ratos submetidos à ingestão crônica de álcool.** Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2001.

CUNHA, M. R. **“Implantes Tridimensionais De Colágeno Polianiónico Em Falhas Ósseas Produzidas No Fêmur De Ratas Ovariectomizadas”.** Tese de Doutorado. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2006.

CUNHA, M. R.; SANTOS JR., A. R.; GOISSIS, G.; GENARI, S. C. Implants of polyanionic collagen matrix in bone defects of ovariectomized rats. **J Mater Sci: Mater Med**, v.19, p. 1341–1348, 2008.

CUNHA, M. R., GUSHIKEN, V. O., MARDEGAN ISSA, J. P.; IATECOLA, A.; PETTIAN, M.; SANTOS JR., A. R. Osteoconductive capacity of hydroxyapatite implanted into the skull of diabetics. **J Craniofac Surg.**, v. 22, n.6, p. 2048-2052, 2011.

CHRISTOPHER, G. F. Bone-grafting and bone-graft substitutes. **J. Bone Joint Surg. Am.**, v. 84, n. 3, p. 454-464, 2002.

DAWSON, E.; BAE, H.; BURKUS, J. K.; STAMBOUGH, J. L.; GLASSMAN, S. D. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 on an absorbable collagen sponge with an osteoconductive bulking agent in posterolateral arthrodesis with instrumentation. **J Bone Joint Surg Am.**, v. 91, p. 1604-1613, 2009.

DIMITRIOU, R.; JONES, E.; MCGONAGLE, D.; GIANNOUDIS, P. V. Bone regeneration: current concepts and future directions. **BMC Medicine**, v. 9, n.66, p. 1-10, 2011.

DIMITRIOU, R.; MATALIOTAKIS, G.; GIANNOUDIS, P. V. The role of barrier membranes for guided bone regeneration and restoration of large bone defects: current experimental and clinical evidence. **BMC Medicine**, v. 10, n. 81, p. 1-24, 2012.

DOMINGOS, D. A. Aplicação em cirurgia ortopédica do poder osteogênico do periósteo na infância. **Rev. Bras. Ortop.**, v. 37, n. 10, p. 415-423, 2002.

DUBOIS, J. C.; SOUCHIER, C.; COUBLE, M. L.; EXBRAYAT, P.; LISSAC, M. An image analysis method for the study of cell adesion to biomaterials. **Biomaterials**, v. 20, p. 1841-1849, 1999.

FEHLBERG, A. F. **Hidroxiapatita sintética na regeneração da falha óssea provocada em fratura 62oné6262te de terço intermédio de 62oné62 imobilizada pela fixação percutânea em cães.** Dissertação de Mestrado, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 2001.

FUJIMURA, K.; BESSHO, K.; KUSUMOTO, K.; OGAWA, Y., IIZUKA, T. Experimental studies on bone inducing activity of composites of atelopeptide type collagen as a carrier for ectopic osteoinduction by rhBMP-2. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 208, p. 316-322, 1995.

GAUTAM, R.; BESSHO, K.; KUSUMOTO, K.; OGAWA, Y.; IIZUKA T. Biocompatibility of polymethylmethacrylate resins used in dentistry. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater.**; v. 100, n. 5, p. 1444-1450, 2012.

GEIGER, M.; LI, R. H.; FRIESS, W. Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2. **Adv Drug Deliv Rev.**, v. 55, n.12, p. 1613-1629, 2003.

GIANNOUDIS, P. V.; DINOPOULOS, H.; TSIRIDIS, E. Bone substitutes: An update. **Injury, Int. J. Care Injured**, v. 36S, p. S20-S27, 2005.

GOISSIS, G.; PICCIRILLI, L.; PLEPIS, A. M. G.; DAS-GUPTA, D. K. Preparation and Characterization of Anionic Collagen: P(VDF/TrFE) Composites. **Polymer Engineering And Science**, v. 39, n. 3, p. 474-482, 1999.

GOSHIMA, K.; NAKASE J.; XU, Q, MATSUMOTO K.; TSUCHIYA, H. Repair of segmental bone defects in rabbit tibia promoted by a complex of β -tricalcium phosphate and hepatocyte growth factor. **J Orthop Sci.**, v. 17, n. 5, p. 639-648, 2012.

HAK, D. J. The Use of Osteoconductive Bone Graft Substitutes in Orthopaedic Trauma. **J Am Acad Orthop Surg**, v. 15, p. 525-36, 2007.

HANNINK, G.; CHRIS ARTS, J. J. Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: What is optimal for bone regeneration? **Injury, Int. J. Care Injured**, v. 42, p. S22-S25, 2011.

HORN, M. M.; MARTINS, V. C. A.; PLEPIS, A. M. G. Interaction of anionic collagen with chitosan: Effect on thermal and morphological characteristics. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 239-243, 2009.

HORN, M. M.; MARTINS, V. C. A.; PLEPIS, A. M. G. Determinação da energia de ativação em hidrogéis poliméricos a partir de dados termogravimétricos. **Polímeros**, v. 20(3), p. 201-204, 2010.

IATECOLA, A. **Osteointegração de enxerto autógeno associado ao selante de fibrina e estimulado pela laserterapia no reparo de falhas ósseas provocadas na calvária de ratos**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Jundiaí, Jundiaí, 2012.

ISSA, J. P. Collagen fibers evaluation after rhBMP-2 insertion in critical-sized defects. **Micron**, v. 40, n. 5-6, p. 560-562, 2009.

JANEGITZ, B. C.; JANEGITZ, B. C.; LOURENÇÃO, B. C.; LUPETTI, K. O.; FATIBELLO-FILHO, O. Desenvolvimento de um método empregando quitosana para remoção de íons metálicos de águas residuárias. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 879-884, 2007.

JANICKI, P.; SCHMIDMAIER, G. What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. **Injury, Int. J. Care Injured**, v. 42, p. S77-81, 2011.

JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem. J.**, v. 11, n. 4, p. 447-455, 1979.

KARARGYRIS, O.; POLYZOIS, V. D.; KARABINAS, P.; MAVROGENIS, A. F.; PNEUMATICOS, S. G. Papineau debridement, Ilizarov bone transport, and negative-pressure wound closure for septic bone defects of the tibia. **Eur J Orthop Surg Traumatol**. 2013.

KONIG Jr., B. **Implantologia e osteointegração; quanto à pesquisa em cerâmicas, aplicações clínicas e outros materiais**. São Paulo, Editora Rocca, 2010.

LACERDA, C. A.; PLEPIS, A. M. G.; GOISSIS, G. Hidrólise Seletiva De Carboxiamidas De Resíduos De Asparagina E Glutamina Em Colágeno: Preparação E Caracterização De Matrizes Aniônicas Para Uso Como Biomateriais. **Química Nova**, v. 21, n. 3, p. 267-271, 1998.

LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIA, V. G. M.; KO, G. M. **Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório**. Editora Atheneu, São Paulo, 2009.

LI, J.; HONG, J.; ZHENG, Q.; GUO, X.; LAN, S.; CUI, F.; PAN, H.; ZOU, Z.; CHEN, C. Repair of rat cranial bone defects with nHAC/PLLA and BMP-2-related peptide or rhBMP-2. **J Orthop Res. Nov**, v. 29, n. 11, p. 1745-1752, 2011.

LEE, J. B.; PARK, H. N.; KO, W. K.; BAE, M. S.; HEO, D. N.; YANG, D. H.; KWON, I. K. Poly(L-Lactic Acid)/Hydroxyapatite Nanocylinders As Nanofibrous Structure For Bone Tissue Engineering Scaffolds. **J Biomed Nanotechnol.**, v. 9, n. 3, p. 424-429, 2013.

LEGEROS, R. Z.; CRAIG, R. G. Strategies to affect bone remodeling: osteointegration. **J. BONE MINER RES.**, v. 8, n. 2, p. 583-596, 1993.

LOCILENTO, D. A. **Preparo, obtenção e caracterização de esponjas quitosana/colágeno para liberação controlada de extrato de semente de uva.** Dissertação de Mestrado. Bioengenharia. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

LONG JR., W. G.; EINHORN, T. A.; KOVAL, K.; MCKEE, M.; SMITH, W.; SANDERS, R.; WATSON, T. Bone Grafts and Bone Graft Substitutes in Orthopaedic Trauma Surgery. **The journal of bone & joint surgery**, v. 89-a, n. 3, p. 649-658, 2007.

MACHADO, E. G. **Aplicação de um novo selante de fibrina combinado com as proteínas rhBMP-2 (morfogenética recombinante) e P-I (hevea brasiliensis) no reparo de defeitos na tíbia de ratos.** Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Jundiaí, Jundiaí, 2012.

MAINI, L.; CHADHA, M.; VISHWANATH, J.; KAPOOR, S.; MEHTANI, A.; DHAON, B. K. The Ilizarov method in infected nonunion of fractures. **Injury, Int. J. Care Injured**, v. 31, n. 7, p. 509-517, 2000.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. What's the interest of normal and pathological morphological to be quantitative? The exemple of the stereology. **Braz. J. Morphol.**, v. 16, n. 2, p. 131-139, 1999.

MARTIN, N. R.; PASSEY, S. L.; PLAYER, D. J.; KHODABUKUS, A.; FERGUSON, R. A.; SHARPLES, A. P.; MUDERA, V.; BAAR, K.; LEWIS, M. P. Factors affecting the structure and maturation of human tissue engineered skeletal muscle. **Biomaterials.**, v. 34, n. 23, p. 5759-5765, 2013.

MAUFFREY, C.; SELIGSON, D.; LICHTHE, P.; PAPE, H. C.; AL-RAYYAN, M. Bone graft substitutes for articular support and metaphyseal comminution: What are the options? **Injury, Int. J. Care Injured**, v. 42 p. S35–S39, 2011.

MEINIG, R. P.; RAHN, B.; PERREN, S. M.; GOGOLEWSKI, S.; Bone regeneration with resorbable polymeric membranes: treatment of diaphyseal bone defects in the rabbit radius with poly (L-lactide) membrane. **J. Orthop Trauma.**, v. 10, p. 178-90, 1996.

MIDDLETON, J. C.; TIPTON, A. J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. **Biomaterials**, v. 21, n. 23, p. 2335-2346, 2000.

MONTGOTMEY, D. C. **Desing and analysis of experiments**. Ed. John Wiley and Sons, Inc. Canadá, 3.ed., p.649, 1991.

MOREIRA, A. S. B. **Estudo da influência das dimensões dos grânulos de hidroxiapatita na integração óssea**. Dissertação de Mestrado. Bioengenharia. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

MOREIRA, P. L.; AN, Y. H.; SANTOS JR., A. R.; GENARI S. C. In vitro analysis of anionic collagen scaffolds for bone repair. **J. Biomed Mater Res.**, v. 71B, p. 229-237, 2004.

MOREIRA, P. L. □ **Avaliação *in vitro* dos processos de proliferação e diferenciação de células osteoblásticas e a mineralização sobre matrizes aniônicas de colágeno para reparo ósseo**. Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2005.

MOREIRA, P. L.; GENARI S. C.; GOISSIS, G.; GALEMBECK, F.; AN, Y. H.; SANTOS JR., A. R. Bovine osteoblasts cultured on polyanionic collagen scaffolds: An ultrastructural and immunocytochemical study. **J Biomed Mater Res Part B**, v.101B, p. 18– 27, 2013.

NOGUTI, J. **Estudo do efeito do ozônio diluído em água na reparação óssea através de avaliação imunoistoquímica**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, , São Paulo, 2010.

OOMS, E. M.; WOLKE, J. G.; VAN DER WAERDEN, J. P.; JANSEN, J. A. Use of injectable calcium phosphate cement for the fixation of titanium implants: an experimental study in goats. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 66, p. 447-456, 2003.

PALEY, D., MAAR, D. C. Ilizarov bone transport treatment for tibial defects. **J Orthop Trauma.**; v. 14, n. 2, p. 76-85, 2000.

PATIL, S.; MONTGOMERY, R. Management of complex tibial and femoral nonunion using the Ilizarov technique, and its cost implications. **J Bone Joint Surg Br.**, v. 88, n. 7, p. 928-932, 2006.

PATRASCU, J. M.; KRÜGER, J. P.; BÖSS, H. G.; KETZMAR, A. K.; FREYMAN, U.; SITTINGER, M.; NOTTER, M.; ENDRES, M.; KAPS, C. Polyglycolic acid-hyaluronan scaffolds loaded with bone marrow-derived mesenchymal stem cells show chondrogenic differentiation in vitro and cartilage repair in the rabbit model. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater.** v. 101, n. 7, p. 1310-1320, 2013.

PEREIRA, N. T.; ISSA, J. P.; NASCIMENTO, C. D.; PITOL, D. L.; ERVOLINO, E.; CUNHA, M. R.; PEDRAZZI, V. Effect of Alveolex on the bone defects repair stimulated by rhBMP-2: Histomorphometric Study. **Microscopy Research and Technique**; v. 75, p. 36-41, 2012.

PLEPIS, A. M. G.; GOISSIS, G.; DAS-GUPTA, D. K. Dielectric and Pyroelectric Characterization of Anionic and Native Collagen. **Polymer Engineering And Science**, v. 36, n. 24, p. 2932-2938, 1996.

POTIJANYAKUL, P.; SATTAYASANSKUL, W.; PONGPANICH, S.; LEEPONG, N.; KINTARAK, S. Effects of enamel matrix derivative on bioactive glass in rat calvarium defects. **J Oral Implantol.**, v. 36, n. 3, p. 195-204, 2010.

PROLO, D. J.; OKLUND, S. The use of bone grafts and alloplastic materials in cranioplasty. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 268, p. 271-278, 1991.

RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. **Biomaterials Science. An introduction to Materials in Medicine.** Third edition. Canada: Elsevier, 2013.

RODRIGUEZ, R.; KONDO, H.; NYAN, M.; HAO, J.; MIYAHARA, T.; OHYA, K.; KASUGAI, S. Implantation of green tea catechin α -tricalcium phosphate combination enhances bone repair in rat skull defects. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater.**, v. 98B, n. 2, p. 263-271, 2011.

ROJBANI, H.; NYAN, M.; OHYA, K.; KASUGAI, S. Evaluation of the osteoconductivity of α -tricalcium phosphate, β -tricalcium phosphate, and hydroxyapatite combined with or without simvastatin in rat calvarial defect. **J Biomed**

Mater Res A., v. 98, n. 4, p. 488-498, 2011.

ROOHANI-ESFAHANI, S. I. The influence hydroxyapatite nanoparticle shape and size on the properties of biphasic calcium phosphate scaffolds coated with hydroxyapatite-PCL composites. **Biomaterials.**, v. 31, n. 21, p. 5498-5509, 2010.

SARBAN, S.; SENKOYLU, A.; ISIKAN, U. E.; KORKUSUZ, P.; KORKUSUZ, F. Can RhBMP-2 containing collagen sponges enhance bone repair in ovariectomized rats: a preliminary study. **Clin. orthop. relat. res.**, v. 467, p. 3113-20, 2009.

SASANO, Y.; KAMAKURA, S.; NAKAMURA, M.; SUZUKI, O.; MIZOGUCHI, I.; AKITA, H.; KAGAYAMA, M. Subperiosteal implantation of octacalcium phosphate (OCP) stimulates both condrogeneses and osteogenesis in tibia, but onlay osteogenesis in the parietal bone of a rat. **The Anatomical Record**, v. 242, p. 40-46, 1995.

SCHLIEPHAKE, H.; KAGE, T. Enhancement of bone regeneration using resorbable ceramics and a polymer-ceramic composite material. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 56, n. 1, p. 128-136, 2001.

SHAH, N; EDGE. A. J.; CLARK, D. W. Hydroxyapatite-ceramic-coated femoral components in young patients followed-up for 16 to 19 years: an update of a previous report. **J Bone Joint Surg Br.**, v. 91, n. 7, p. 865-869, 2009.

SHARMA, A.; MEYER, F.; HYVONEN, M.; BEST, S. M.; CAMERON, R. E.; RUSHTON, N. Osteoinduction by combining bone morphogenetic protein (BMP)-2 with a bioactive novel nanocomposite. **Bone Joint Res.**, v. 1, n. 7, p.145-51, 2012.

SHORS, E. C. Coralline bone graft substitutes. **Orthopedic Clinics of North America**, v. 30, n. 4, p. 599-613, 1999.

SHUE, L.; YUFENG, Z.; MONY, U. Biomaterials for periodontal regeneration. A review of ceramics and polymers. **Biomatter.** v. 2, n. 4, p. 271–277, 2012.

SILVA, G. M.; MARTINS, V. C. A.; PLEPIS, A. M. G. **Mineralização de Esponjas. de Quitosana e Quitosana e Colágeno**, editora ISS, Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, 2007.

SOPYAN, I.; MEL, M.; RAMESHC, S.; KHALID, K. A. Porous hydroxyapatite for artificial bone applications. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 8, p. 116–123, 2007.

SPIEGL, U.; PÄTZOLD, R.; FRIEDERICH, J.; HUNGERER, S.; MILITZ, M.; BÜHREN, V. Clinical Course, Complication Rate And Outcome Of Segmental Resection And Distraction Osteogenesis After Chronic Tibial Osteitis. **Injury, Int. J. Care Injured**, v. 44, n. 8, p. 1049-1056, 2013.

TONHI E.; PLEPIS A. M. G. Obtenção e caracterização de blendas colágeno-quitosana. **Quím. Nova**, v. 25, n. 6, p. 943-948, 2002.

TORRES, A. L.; GASPAR, V. M.; SERRA, I. R.; DIOGO, G. S.; FRADIQUE, R.; SILVA, A. P.; CORREIA, I. J. Bioactive polymeric-ceramic hybrid 3D scaffold for application in bone tissue regeneration. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.**, v. 33, n. 7, p. 4460-4469, 2013.

TSAIH, M. I. N. L.; CHEN, R. H. Molecular weight determination of 83% degree of decetylation chitosan with non-gaussian and wide range distribution by high-performance size exclusion chromatography and capillary viscometry. **Journal of Applied Polymer Science**. v. 7, p. 1905-1913, 1999.

VENKATESAN, J.; KIM, S. K. Chitosan Composites for Bone Tissue Engineering-An Overview. **Mar Drugs**, v. 8, n. 8, p. 2252–2266, 2010.

VITAL, C. C.; BORGES, A. P. B.; FONSECA, C. C. Biocompatibilidade e comportamento de compósitos de hidroxiapatita em falha óssea na ulna de coelhos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 58, p. 175, 2006.

WANG, L. ; RAO, R. R.; STEGEMANN, J. P. Delivery of mesenchymal stem cells in chitosan/collagen microbeads for orthopedic tissue repair. **Cells Tissues Organs**. v. 197, n. 5, p. 333-343, 2013.

WATANABE, K.; TSUCHIYA, H.; SAKURAKICHI, K.; TOMITA, K. Bone transport using hydroxyapatite loaded with bone morphogenetic protein in rabbits. **J Bone Joint Surg [Br]**, v. 89-B, p.1122-1129, 2007.

ZIMMERMANN, G. A.; MOGHADDAM, A. Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. **Injury, Int. J. Care Injured**, v. 42, p. S16–21, 2011.

Anexo A – Preparação das matrizes

Obtenção do Gel de Colágeno

Tendão de origem bovina foi lavado com solução salina 0,9% (NaCl) e água destilada, picotado e imerso em uma solução alcalina (hidrólise) por um período de 96 h a temperatura não maior que 25 °C. Esta solução contém sais (sulfatos e cloretos) e hidróxidos de metais alcalinos e alcalinos terrosos, conforme procedimento usual do Grupo de Bioquímica e Biomateriais do Instituto de Química de São Carlos - USP.

Após este período de tempo, o tendão foi equilibrado em outra solução, contendo sulfatos e cloretos dos íons Na^+ , K^+ e Ca^{2+} . O excesso de sais foi removido por lavagens em 3% de solução de ácido bórico, água desionizada, seguida por solução de EDTA a 0,3% e água desionizada (LACERDA; PLEPIS; GOISSIS, 1998). O colágeno foi extraído com uma solução de ácido acético com pH de 3,5. A concentração foi determinada por liofilização (modelo Dryer modulyo - Edwards), obtendo-se um valor de 0,93%.

Obtenção do gel de quitosana

Para obtenção da quitosana foi utilizado a β -quitina, extraída do gládio de lula (*Loligo* spp), obtido em Cananeia – SP, por Miami pescados. A partir do gládio de lula até obtenção da quitosana, ocorreram as seguintes etapas (HORN; MARTINS; PLEPIS, 2010):

O gládio de lula foi lavado para eliminar resíduos, secos, triturados e separados com peneira, obtendo-se partículas uniformes. Ao pó obtido adicionou-se solução de HCl 0,55 mol L⁻¹ mantido à temperatura ambiente por 2 horas com agitação mecânica constante, para se obter a desmineralização. O procedimento foi repetido mais uma vez e, em seguida o material foi lavado com água desionizada até a neutralidade, em torno de 10 dias, e, por fim, seco.

Após a desmineralização, adicionou-se ao sólido obtido solução de NaOH 0,3 mol L⁻¹. Com agitação constante e temperatura controlada à 80°C, mantido por 1 h, sendo o procedimento repetido mais uma vez. O sólido foi lavado como anteriormente até a neutralidade e seco.

Para a desacetilação da β -quitina, adicionou-se uma solução de NaOH 40%, com agitação constante e temperatura controlada de 80°C em atmosfera de nitrogênio (N₂) por 3 h, sendo repetido novamente o procedimento. O sólido resultante foi outra vez lavado até a neutralidade e seco, obtendo-se a quitosana.

A quitosana obtida teve um grau de acetilação de $8,82 \pm 0,30\%$ (CARDOSO, 2008) e massa molar de $2,31 \times 10^5$ g mol⁻¹ (TSAIH; CHEN, 1999).

Uma solução de quitosana a 1% (g/g) foi preparada a partir da dissolução do pó de quitosana (obtido pelo método descrito acima), em solução aquosa de ácido acético a 1% (g/g), mantida sob agitação mecânica por 24 h.

Preparação da Hidroxiapatita (HA)

A síntese da hidroxiapatita foi feita, seguindo o método de JARCHO et al. Preparou-se uma solução de Ca(NO₃)₂·4H₂O pH entre 11,0 e 12,0 com hidróxido de amônio concentrado (Solução I). Preparou-se a seguir uma solução de (NH₄)₂HPO₄ com pH entre 11,0 e 12,0 (Solução II).

A solução de cálcio (Solução I) foi vigorosamente agitada e mantida sob fluxo constante de N₂, sendo, em seguida, adicionada, lentamente, a solução de fosfato (Solução II), produzindo uma suspensão com precipitado de forma gelatinosa, que foi agitado durante 40 horas à temperatura ambiente, sempre sob fluxo constante de N₂.

Após este tempo, deixou-se a suspensão ser decantada com posterior remoção do sobrenadante. O sólido resultante foi lavado com água deionizada várias vezes até que o pH do sobrenadante se tornasse constante. A suspensão de HA formada foi centrifugada a 4000 rpm por 15 minutos a 20°C, filtrada e seca em estufa à 90°C durante um período de 24 horas. Após este período a HA foi triturada e separada em peneiras de 60 e 100 mesh. O rendimento total do processo foi de 95%.

Preparação das Esponjas

Foi preparada uma mistura de gel de colágeno e solução de quitosana na proporção 2:1, respectivamente. Esta mistura foi desaerada em dessecador, sob vácuo, sendo dividida em duas partes. Com a primeira foram pesadas 40 amostras de, aproximadamente, 100 mg cada, sendo colocadas em moldes de Teflon®, congeladas em nitrogênio líquido e submetidas à liofilização (modelo Dryermodulyo - Edwards) cerca de 9 h, obtendo assim os materiais em forma de esponjas.

À segunda parte, foi adicionado HA (tamanho de partícula menor que 100mesh), para cada 10g de mistura foi adicionado 1,2 g de HA, homogeneizado, sendo então pesadas 40 amostras de aproximadamente 100mg cada e colocadas em moldes de Teflon®, congeladas em nitrogênio líquido e submetidas à liofilização (modelo Dryermodulyo - Edwards) cerca de 9 h.

Após a confecção, as amostras foram submetidas às técnicas de microscopia eletrônica de varredura e fotodocumentadas (figuras 17 e 18).

As esponjas foram esterilizadas em oxido de etileno antes da sua utilização nos procedimentos cirúrgicos.

Figura 17. Fotografia de microscopia de varredura eletrônica das blendas poliméricas de colágeno e quitosana (a, b e c) e associadas à hidroxiapatita em (d). Aumentos de 200 (a), 500 (b), 1000 (c) e 20000 (d) vezes.

Figura 18. Fotografia de microscopia de varredura eletrônica das blendas poliméricas de colágeno, quitosana e hidroxiapatita. Aumentos de 200 (a), 500 (b) e 1000 (c) vezes.

Anexo B - Carta de Aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Jundiaí

FACULDADE DE MEDICINA DE JUNDIAÍ

Autarquia Municipal criada por Lei Municipal Nº 1506 de 12 de março de 1968 C.N.P.J. Nº 50.985.266/0001-09
Reconhecimento Federal Decreto Nº 71656 de 04/01/1973

Rua Francisco Telles, 250 - Fone: (11) 4587-1095 - Fax: (11) 4587-1376 - Cx. Postal 1295 - CEP 13202-550 - Jundiaí - SP

COMITÊ DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS

Jundiaí, 17 de outubro de 2013.

Ilustríssimo Senhor
MARCELO RODRIGUES DA CUNHA

Ref.: Aprovação de Projeto de Pesquisa

TÍTULO: "UTILIZAÇÃO DE BLENDA POLIMÉRICAS NO REPARO DE DEFEITOS CRANIANOS DE RATOS"

Prezado Pesquisador

O Comitê de Ética para Uso de Animais – CEUA desta Faculdade, em reunião no dia 17 de outubro, no cumprimento de suas atribuições e após revisão ao seu protocolo de pesquisa em epígrafe, emitiu o parecer APROVANDO o seguinte documento:

>> Protocolo para Uso de Animais em Pesquisa nº 301/2012

Lembramos a V.Sa. que é necessário enviar a este CEUA relatórios de eventos adversos, caso estes venham a ocorrer, assim como relatório final com os resultados da pesquisa, para finalização do processo. Quaisqueis dúvidas estamos à disposição.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Eduardo José Caldeira
Vice-coordenador do Comitê de Ética para Uso de Animais

Prof. Dr. Eduardo José Caldeira
Morfologia e Patologia Básica
FMJ