

Saulo Cabral dos Santos

**AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DA ESPONJA
DE CHITOSAN/TRICÁLCIO FOSFATO NO
REPARO DE DEFEITOS ÓSSEOS EM
CALVÁRIA DE RATOS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Piracicaba, da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do Título de Doutor em
Clínica Odontológica – Área de Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Wilson Sallum

Co-orientador: Prof. Dr. Márcio Zaffalon Casati

PIRACICABA

2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

Sa59a	<p>Santos, Saulo Cabral dos. Avaliação da utilização da esponja de quitosân/tricálcio fosfato no reparo de defeitos ósseos em calvária de ratos. / Saulo Cabral dos Santos. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2007.</p> <p>Orientadores: Antônio Wilson Sallum, Márcio Zaffalon Casati. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Regeneração óssea. 2. Biomateriais. 3. Quitosân. I. Sallum, Antônio Wilson. II. Casati, Márcio Zaffalon. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">(mg/fop)</p>
-------	---

Título em Inglês: Evaluation of chitosan/tricalcium phosphate sponge utilization in rat calvarial bony defects repair

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Bone regeneration. 2. Biomaterials. 3. Chitosan

Área de Concentração: Periodontia

Titulação: Doutor em Clínica Odontológica

Banca Examinadora: Antônio Wilson Sallum, Suzana Peres Pimentel, Renato de Vasconcelos Alves, Reginaldo Bruno Gonçalves, Fernando Rodrigues Pinto

Data da Defesa: 16-10-2007

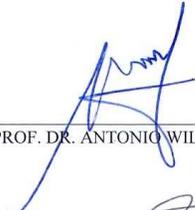
Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica



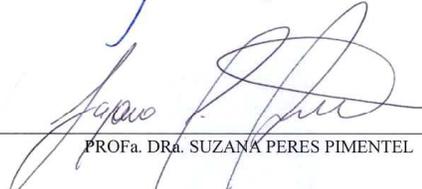
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 16 de Outubro de 2007, considerou o candidato SAULO CABRAL DOS SANTOS aprovado.



PROF. DR. ANTONIO WILSON SALLUM



PROFa. DRa. SUZANA PERES PIMENTEL



PROF. DR. RENATO DE VASCONCELOS ALVES



PROF. DR. REGINALDO BRUNO GONCALVES



PROF. DR. FERNANDO RODRIGUES PINTO

D E D I C O E S T E T R A B A L H O

Dedico este trabalho à minha querida companheira Patricia Ismael, pelo seu importante estímulo para que eu aqui chegasse, além do esforço sobre-humano de sozinha trabalhar, cuidar da nossa casa e do nosso amado filho, durante esses longos quatro anos que sofrida e geograficamente passamos distantes. Que Deus te recompense!

À Mateus e Artur, filhos amáveis e doces, que se privaram, neste período, de um direito inalienável: a presença do pai. Que a inteligência suprema vos protejam.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A Deus, pela fé que me propiciou permanecer de pé quando as pernas já não
mais me obedeciam!

Ao Mestre, Amigo e Educador Prof. Dr. Antônio Wilson Sallum que nos
permitiu a sua nobre companhia nesses últimos anos. Agradeço sua paciência, e
todo aprendizado diante da vossa sabedoria, maior que a periodontia, maior que a
odontologia. Meu muito obrigado. Deus o acompanhe!

À Marcelo Carvalho, Mirella Campos e Érico, Mônica Grazieli e Wagner Leal, pela
incomensurável ajuda em todas as etapas do meu trabalho e da minha vida em
Piracicaba, estabelecendo-se todos impreterivelmente em meu coração. Agradeço
profundamente! Que Deus vos iluminem!

À Marcelus, Durce e Marcelinha, pelo acolhimento recheado de amor, pelas
palavras banhadas de ternura e pelo afeto próprio das belas famílias, numa das
horas mais difíceis da minha vida, quero expressar minha mais profunda gratidão.

Que Deus vos conceda a Paz!

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr. Francisco Haiter Neto, onde cumpri uma etapa importante da minha existência.

Aos Caros Professores Doutores da área de Periodontia da FOP-UNICAMP, Enilson Antônio Sallum, Márcio Zaffalon Casati, Getúlio Nogueira Filho, Francisco Humberto Nociti Júnior, Sérgio de Toledo e Antônio Fernando Martorelli de Lima (*in memoriam*), inequívocos pilares de conhecimento que permanecerão para sempre em mim, representados em cada expressão de saber periodontal que se manifeste nas estradas da minha vida. Nosso mais sincero agradecimento. Deus tome vossos corações!

As(os) professoras(es) Suzana Pimentel, Renato de Vasconcelos Alves, Reginaldo Bruno Gonçalves e Sérgio de Toledo, Fernando Pinto e Poliana Mendes Duarte por terem aceitado em participar da banca de defesa e suplência, o que muito nos honra, enobrecendo esse simples trabalho com orientações que dignificarão minha vida profissional. Muito grato.

Aos professores Márcio Zaffalon Casati, Marcelo de Castro Meneghim e Rafael Leonardo Xediek Consani, pelas efetivas, importantes e fundamentais contribuições na banca de qualificação. Muito agradecido.

À Faculdade de Odontologia de Pernambuco, também conhecida como FOP, por ter sido o solo que me gerou enquanto profissional.

Ao Prof. Rodrigo Veras de Almeida, “Pai da Periodontia Pernambucana”, amigo com grande parcela de responsabilidade na minha trajetória acadêmica. Jamais o poderei esquecer, na sua sinceridade, e amizade lisa, limpa, sem segundas intenções ou artimanhas politiqueiras que tanto caracterizam o meio acadêmico e que me ajudaram de forma efetiva a mudar o rumo da minha história. De coração, meu obrigado profundo. Que Deus te dê forças e paz!

As incansáveis e imprescindíveis Eliete e Mariana, sustentáculo da periodontia da FOP/UNICAMP, meu muito obrigado pelas ajudas, colaborações, orientações que muitas vezes imperceptíveis aos olhos desatentos, foram e são fundamentais para o cotidiano desta disciplina e de nós alunos. Que Deus vos dê a Paz!

Aos demais funcionários da FOP/UNICAMP: Todos esses que de forma direta ou indireta permitem o bom funcionamento desta instituição. As(os) colegas do biotério, da esterilização, da secretaria, do CRA, da limpeza, da vigilância. Personagens muitas vezes invisíveis, mas imprescindíveis, que nos auxiliam sempre, o nosso muito obrigado. Que Deus vos abracem!

Aos meus pacientes, que se entregaram em minhas mãos de aprendiz, quero registrar meus agradecimentos sinceros. Que Deus os acompanhe!

Aos meus colegas do mestrado/doutorado, Benatti, Cléverson, Daiana, Érica, Gabriela, Marcelo, Roberta e Sandro, cada um(a) com sua beleza, seu conhecimento, sua experiência, enxertaram paulatinamente um pouco das suas qualidades que irei carregar dentro de mim para todo o sempre. Que Deus seja o alimento das vossas almas!

Aos meus colegas da periodontia, Beatriz, Cláudia, Daniela, Fabrícia, Fernanda, Kamille, Liana, Mauro, Renato, Thaís e Wagner pelas trocas de experiência de grande valor e pela contribuição efetiva na construção do meu espírito. Que Deus esteja sempre nas suas vidas!

Ao paulista Fábio, ao mineiro Cléverson e ao baiano Ricardinho, que junto comigo, pernambucano, vivemos na prática a beleza da diversidade de culturas, lembrando o poeta Chico Buarque no seu poema "Paratodos". Que Deus os siga sempre! Muito obrigado!

A Stênyo Tavares pela inestimável ajuda durante um momento profundamente difícil, onde o termo AMIGO pode se configurar na sua real concepção de você para comigo, que Deus esteja sempre contigo!

Aos alunos da graduação, especialmente os do segundo ano (em 2004), que me permitiram a oportunidade de exercitar a fabulosa experiência da troca em sala de aula, me acendendo a certeza de que sou um eterno aprendiz. Que Deus os ajude na construção dos seus sonhos!

A Enídice e Luís Antônio, meus “gurus” espirituais, pela ajuda e orientações nas horas difíceis, pelas oportunidades que me deram de espiritualizar-me. Que Deus continue a se fazer vivo através do nobre trabalho de vocês: ajudar a quem está aflito!

À Zaina, minha atual psicanalista, que deposita seu conhecimento a serviço da felicidade alheia, me ajudando na eterna busca da paz e do amor. Que Deus a envolva! À Edilene Queiroz, minha analista de 12 anos, pelo preparo do solo da minha alma para aqui ter chegado.

Aos amigos(as) da União Espírita de Piracicaba que me receberam de braços abertos nesta casa, me dando a oportunidade de aprender cada vez mais os reais valores da vida. Que Deus esteja convosco!

A Adriana, babá de Artur, que nesses anos supriu com presença, carinho e dedicação a minha ausência, meus agradecimentos. Que Deus vos guie.

A Mariêucia, minha ex-esposa, por assegurar a educação de nosso filho Mateus praticamente sozinha, enquanto eu aqui estava, distante, regando a árvore dos meus sonhos. Que Deus permaneça no teu caminho!

A minha filha Taís (*in memoriam*), quero agradecer o sentimento que me fizeste sentir quando fui Pai pela primeira vez. Fique com Deus!

A D. Maria da Guia, minha querida sogra, meu eterno agradecimento pelo esforço incomensurável e forte trabalho com meu filho Artur, auxiliando Patricia, para que eu pudesse dar esse importante salto na minha vida. Que Deus permaneça ao seu lado!

Ao Sr. Clodomir (*in memoriam*), meu caro sogro e economista, com quem tanto aprendi, nos esclarecedores diálogos sobre os problemas sociais. Que Deus floresça ainda mais no teu peito!

As minhas irmãs e irmãos, Leila, Aurélio, Lídia e Alcione pelos estímulos que me fizeram crescer ao longo dos anos. Que Deus jorre amor em vossos corações!

Aos meus grandes amigos(as) Tony, Duca e Kaká, Gil e Nadja, Arlindo e Teresinha, Zito e Menininha, Pedro e Sr. Vicente, pelos momentos de felicidade que construímos juntos, pela família que erguemos para além do sangue, pela

confiança, pelas trocas, pelo amor incondicional das nossas amizades. Que Deus viva entre nós!

As(os) amigas(os) do MOVPAZ-Piracicaba, Lau, Arjuna, Dr. Pacheco, Ana Flávia, Daniela, Fábio, Dino, Eliane, Guilbert, Gustavo Gameiro, Igor, Maria Lúcia, Vanilda, Fernando, Elena, Eline, Iva, Nilza e Norberto, Fátima, Giovana e Mariana que me fortaleceram o sonho de um mundo de Paz construído com o suor das nossas mãos.

Aos meus pais, Nilton e Icléa, pela oportunidade da existência! Que Deus brilhe em vossos corações!

Aos que passaram na minha vida e deixaram ao menos um grão de estímulo, sabedoria ou amor, que Deus não vos esqueça!



**“Não existe um caminho para a paz,
a paz é o caminho.”**

Mohandas Karamchand Gandhi

RESUMO

A grande busca da periodontia é regenerar nos indivíduos que portaram patologias periodontais as estruturas de suporte dental devastadas pela doença infecciosa. Nos últimos anos, materiais para enxertos ósseos vêm sendo testados e utilizados em larga escala com esse intuito. Embora o uso de osso autógeno seja comumente considerado o material de enxerto de primeira escolha, existe uma série de limitações ao seu uso. Nesse trabalho propusemos avaliar o efeito da esponja de quitosan/tricálcio fosfato, que é um bio-polímero natural não tóxico e biodegradável, no reparo de defeitos de tamanho crítico em calvária de ratos. Foram utilizados 20 ratos, machos, adultos, da linhagem Wistar. Confeccionaram-se, no osso parietal de cada animal, dois defeitos ósseos de tamanho crítico, com broca trefina de 5mm de diâmetro interno, um dos defeitos recebeu a esponja de quitosan (grupo teste) e o outro foi preenchido com osso autógeno particulado (grupo controle positivo). Após 60 dias, cortes histológicos foram executados observando-se, nos defeitos preenchidos com o quitosan, uma média de 37,79% de remanescentes da esponja. Numa análise linear destes defeitos, o preenchimento ósseo ocorreu numa média de $0,57 \pm 0,38$ mm. Nos defeitos preenchidos com osso autógeno (controle positivo), foi registrada uma média de 5,02mm de osso vital. Comparando os dois grupos experimentais em termos percentuais, observamos que no grupo teste o preenchimento com tecido ósseo foi menor que no grupo controle (7,72% e 68,75%) respectivamente, $p < 0,001$ no teste de Tukey). Dessa forma, conclui-se que a esponja de quitosan/tricálcio fosfato tem um deficiente efeito sobre o reparo ósseo em defeitos de calvária de ratos.

ABSTRACT

Periodontology great challenge is to aim the regeneration of periodontal *apparatus* previously exposed to periodontal disease. Bone substitutes have been extensively tested and used to obtain regeneration. Despite autogenous bone has been considered the gold standard material to perform these techniques there are some restrictions which limit its use. The objective of this study is to evaluate the chitosan/tricalcium phosphate sponge, a non-toxic natural and biodegradable biopolymer, in calvarian defects repair. Twenty adult male Wistar rats were used in this research. Two critical defects were prepared on the parietal bone of each animal using a trephine bur of 5mm inside diameter. One of the defects received chitosan sponge as treatment (test group) and the other was treated with particulate autogenous bone (positive control group). After 60 days the animals were sacrificed and the histological sections were obtained. It was observed in test group a mean remaining chitosan sponge of 37,79%. A linear analysis showed a $0,57\pm 0,38$ bone fulfilling mean of the test defects. In defects treated with autogenous bone (positive control group) the mean bone vital observed was 5,02mm. In percentual terms the defect bone fulfilling was less observed in test group rather than control group (7,72% and 68,75% respectively, Tukey test $p<0,001$). Chitosan/tricalcium phosphate sponge does not improve bone repair in rats calvarian defects.

Introdução	01
Revisão da Literatura	04
Proposição	18
Material e Métodos	19
Resultados	30
Discussão	37
Conclusão	41
Referências	42
ANEXOS	54

A periodontite é uma patologia que desencadeia um processo de perda de inserção periodontal como consequência da inflamação nos tecidos de suporte dos dentes. Essa doença normalmente envolve progressiva e destrutiva mudança que leva a perda de inserção do ligamento periodontal e osso alveolar. Estudos epidemiológicos indicam que 5% a 20% da população adulta apresentam formas severas dessa doença (Brown & Løe, 1993; Hugoson *et al.*, 1992).

O maior objetivo da terapia periodontal inclui a redução da bolsa, a regeneração funcional do aparato de inserção e a restauração do osso alveolar perdido. A meta terapêutica ideal deve ser a completa regeneração do periodonto de acordo com o previamente existente, alcançando os limites fisiológicos normais (Mellonig, 1980).

Os procedimentos regenerativos ósseos são essenciais nas cirurgias periodontais e em implantodontia. Materiais para enxertos ósseos têm sido utilizados e investigados largamente. Embora o uso de osso autógeno seja comumente considerado o material de enxerto de primeira escolha, existe uma série de limitações ao seu uso, como a quantidade disponível dos locais doadores, morbidade do local doador, deformidade e desconforto. Aloenxertos vêm sendo utilizados como alternativas ao auto enxerto (Yong-Moo *et al.*, 2000).

As estratégias de engenharia tecidual têm sido sugeridas como uma possível alternativa para autoenxertos convencionais. Recentes investigações têm aberto novas possibilidades para a construção de tecidos vitais autólogos *in vitro* usando biomateriais apropriados para guiar o desenvolvimento dos tecidos (Vacanti *et al.*, 1991; Cooper *et al.*, 1991; Atala *et al.*, 1992).

A utilização do quitosano (poly-N-acetyl glucosaminoglycan) em regenerações ósseas vem nos últimos anos ganhando particular interesse. O quitosano é um bio-polímero natural não tóxico e biodegradável (Sanford, 1989). Esse bio-polímero natural tem várias aplicações biomédicas. Muitos estudos prévios corroboram a habilidade do quitosano em melhorar a hemostasia (Malette *et al.*, 1983; Kind *et al.*, 1990; Klokkevold *et al.*, 1992; Klokkevold *et al.*, 1999) e a cicatrização das feridas (Muzzarelli *et al.*, 1988). Particularmente, o quitosano tem demonstrado aumentar a formação óssea *in vitro* (Klokkevold *et al.*, 1996) e *in vivo* (Borah *et al.*, 1992; Muzzarelli *et al.*, 1994; Klokkevold *et al.*, 1998).

Além dessas aplicações biomédicas, o quitosano tem se mostrado como um regulador na liberação de agentes bioativos, inclusive dos fatores de crescimento (Berscht *et al.*, 1994), antibióticos (Chandy & Sharma, 1993) e drogas anti-inflamatórias (Shiraishi *et al.*, 1993). Além disso o quitosano se adapta muito bem a materiais inorgânicos tais como o tricálcio fosfato (TCP) e a hidroxiapatita (HA). Pastas de quitosano contendo fosfato de cálcio têm sido introduzidas como material de enxertos para lesões ósseas (Ito *et al.*, 1994; Kawakami *et al.*, 1992).

As propriedades biológicas favoráveis do chitosan e sua disponibilidade em várias formas de apresentação incluindo pó, gel, soluções, esponjas, o faz um bom candidato para aplicações clínicas como condutor nas terapias periodontais e ósseo regenerativas.

O chitosan é um polímero natural biodegradável, não tóxico e não imunogênico, com estrutura química similar à da celulose, que vem mostrando efeitos benéficos no processo de cura e aumento na formação óssea. As suas propriedades biológicas e características estruturais apontam para a possibilidade de um bom substituto ósseo com arcabouço para a inserção celular, como demonstrado frente aos hepatócitos (Kawase *et al.*, 1997; Yagi *et al.*, 1997). Estas características biocondutoras, imunogênicas, bactericidas e quimioatrativas em conjunto com sua maleabilidade nas formas de apresentação, como pó, gel ou esponja trazem vantagens incomensuráveis para sua aplicabilidade na odontologia.

Revisão da Literatura

O tecido ósseo tem como função essencial o metabolismo do cálcio (Roberts *et al.*, 1992), sendo o mineral ósseo a primeira reserva metabólica do cálcio (Roberts *et al.*, 1991). Alguns ossos formam-se no mesênquima por ossificação intramembranosa, em outros casos, os modelos ósseos mesenquimais transformam-se em modelos cartilagosos de ossos que mais tarde irão ossificar-se por osteogênese endocondral. Existem diferenças importantes na cinética do processo de mineralização na ossificação endocondral e na ossificação intramembranosa (Dziedzic-Goclawska *et al.*, 1988).

Em circunstâncias fisiológicas, a formação do tecido ósseo é regulada, principalmente pela carga funcional (Martin & Burr 1989). Por outro lado, os mediadores biomecânicos do metabolismo do cálcio (hormônios da paratireóide, estrogênio, vitamina D, etc) predominam no controle da reabsorção óssea (Baron *et al.*, 1984).

O osso é um composto altamente ordenado de matriz orgânica e mineral inorgânico. A matriz óssea, chamada osteóide antes da mineralização, é principalmente um conjunto de fibras colágenas embebidas em substância fundamental. Esta última é um gel de água viscoso e complexos de glicoproteína/proteína. A substância fundamental também contém numerosos fatores orgânicos (citocinas, fatores de crescimento) que ajudam a controlar a

ativação celular, maturação da matriz e mineralização. Durante a mineralização, pequenos cristais de hidroxapatita são densamente acondicionados em uma série ordenada, de acordo com a orientação das fibras colágenas (Roberts *et al.*, 1987) estruturando-se de forma lamelar em densidades distintas o que determina os tipos cortical ou trabecular. O osso trabecular é formado por uma rede de lamelas ósseas, delimitando cavidades dentro das quais encontramos a medula óssea (Wheater *et al.*, 1987). Tanto o osso cortical quanto o trabecular contém células especializadas, matriz orgânica e fase mineral. Vários tipos de células são encontradas no tecido ósseo ou no estroma conjuntivo da medula óssea, no qual é rico em células tronco mesenquimais. Friedenstein (1976) descreveu cinco tipos de células diferentes que podiam se originar dessas células tronco: Osteoblastos, condroblastos, fibroblastos, adipócitos e mioblastos, de acordo com o tipo de sinal molecular que inicia a ativação da cascata de diferentes genes.

Os osteoblastos são células grandes (20-30 μ m) de forma poliédrica, com um citoplasma basofílico e com uma significativa quantidade de retículo endoplasmático rugoso e aparelho de Golgi. Têm origem nas células tronco mesenquimais da medula óssea, endóstio, perióstio e pericitos perivasculares (Canfield *et al.*, 2000). Os osteoblastos sintetizam a matriz orgânica ou material osteóide e expressam a alcalina fosfatase que permitirá a mineralização subsequente (Hernández-Gil *et al.*, 2006).

Fatores de crescimento e genéticos são fundamentais no controle da diferenciação da linha osteoblástica, sendo as proteínas morfogenéticas ósseas o

mais potente regulador da diferenciação osteoblástica das células tronco mesenquimais (Yamaguchi *et al.*, 2000).

Após a mineralização da matriz alguns osteoblastos permanecem aprisionados no seu interior, transformando-se em osteócitos. Os osteoblastos, osteoclastos e as células de revestimento ósseas são encontradas na superfície do osso, enquanto os osteócitos no seu interior (Hernández-Gil *et al.*, 2006).

Os osteócitos participam da síntese e mineralização da matriz osteóide, mas se acredita que sua principal função é controlar a remodelação óssea, detectando as variações de cargas, um fenômeno conhecido como mecanotransdução (Lanyon, 1993).

Os osteoclastos são células responsáveis pela reabsorção, apresentam-se multinucleadas e ricas em mitocôndrias e vacúolos. Os osteoclastos contêm fosfatase ácida o que permite a desfosforilação das proteínas, possuindo ainda receptores para a calcitonina (Hernández-Gil *et al.*, 2006). A matriz orgânica ou material osteóide é formado fundamentalmente por proteínas, especialmente colágeno (90%). A matriz mineralizada extracelular é considerada mais que um simples reservatório de cálcio e fósforo, visto que constitui uma reserva de proteínas que participam na regulação da diferenciação celular e na integridade e função do tecido ósseo (Young, 2003).

O componente mineral do osso representa 65% da massa óssea. Ele é formado por cálcio, fosfato e carbonato (em proporções de 10:6:1) na forma de pequenos cristais de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) e, com pequenas quantidades de magnésio, sódio, potássio, manganês e fluoreto. As proteínas com capacidade adesiva favorecem a mineralização, enquanto as proteoglicanas, magnésio e pirofosfatos agem como inibidores (Hernández-Gil *et al.*, 2006).

Os procedimentos regenerativos ósseos são essenciais nas cirurgias periodontais e em implantodontia. A regeneração óssea cria uma resposta nas quais vasos sanguíneos, células e matriz extracelular estão envolvidos. A importância dos vasos sanguíneos na osteogênese foi apontada por Trueta (1963), no qual descreveu que após um trauma, uma resposta inflamatória e um hematoma inicial é produzido, com células sanguíneas vermelhas, plaquetas e fibrina. As células liberam interleucinas e fatores de crescimento, regulando a migração de linfócitos, macrófagos, precursores osteoclásticos e células tronco. Esses sinais moleculares promovem a diferenciação também nas células endoteliais, fibroblastos, condroblastos e osteoblastos, criando um novo tecido fibrovascular os quais substitui o coágulo inicial. Esse é totalmente regulado por uma série de interações complexas entre fatores de crescimento, hormônios e citocinas. O suprimento vascular, síntese protéica e mineralização são todos fundamentais para esse processo.

O crescimento ósseo por meio da aposição do osso circunjacente caracteriza a osteocondução, portanto, este processo necessita da presença de

tecido ósseo ou de células mesenquimatosas diferenciadas (Misch, 2000). Os materiais de fosfato de cálcio exibem ausência total de toxicidade (Cameron *et al.*, 1977). Sua capacidade de se unirem ao osso e agirem como um substrato para o crescimento ósseo os transforma no material de escolha, caracterizado como osteocondutor e osteofílico, mas não osteogênico (Kent & Jarcho, 1995). O índice de reabsorção do fosfato de cálcio é afetado pelo tamanho das partículas, porosidade e composição do material. As partículas maiores demoram mais para reabsorver. Uma partícula de 250µm de tamanho reabsorve mais rápido do que outra partícula de 750µm (Cheung & Tofe, 1993).

A osteoindução envolve a formação de osso novo a partir das células osteoprogenitoras, derivadas das células mesenquimatosas primitivas, sob a influência de um ou mais agentes indutores que emanam da matriz óssea (Friedlander, 1987; Covey & Albright, 1989). Os materiais osteoindutores mais usados na odontologia são os aloenxertos e autoenxertos ósseos. Um aloenxerto ósseo é um tecido ósseo transplantado, da mesma espécie que o receptor mas de genótipo diferente. A principal vantagem dos aloenxertos é que eles eliminam a necessidade de um local doador. O tecido é obtido em cadáveres, é processado e então é armazenado sob várias formas (Buck & Malinin, 1994). Existem três tipos principais de aloenxertos ósseos: congelado, seco, e desmineralizado seco e congelado (Misch, 2000).

A osteogênese refere-se ao crescimento ósseo derivado das células viáveis, transferidas dentro do enxerto. O osso autógeno é o único material de

enxerto disponível com propriedades osteogênicas. A sua forma mais eficaz é osso esponjoso, que fornece a maior concentração de células ósseas. O osso novo é regenerado pelos osteoblastos endósseos e pelas células que se originam na medula, transferidas com o enxerto (Misch, 2000). O mecanismo do crescimento ósseo, dentro dos enxertos ósseos autógenos, inclui três fases. As células transplantadas vivas, principalmente da porção esponjosa do enxerto, sobrevivem nos primeiros três ou quatro dias por meio da alimentação com o tecido vascular circunjacente. Os osteócitos presentes dentro das trabéculas ósseas que sobrevivem ao processo de transplantação são responsáveis pela proliferação e formação de um novo produto osteóide (Gray & Elves, 1979). Este processo osteogênico, chamado osso da fase I, é caracterizado pelo número de células transplantadas e determina a quantidade de osso novo que se formará além da dimensão original (Axhausen, 1956). Ele é diretamente proporcional à densidade das células transplantadas (Friedenstein *et al.*, 1966). O sucesso do enxerto depende da vascularização primária (Holmstrand, 1957). À medida que as células ósseas transplantadas morrem, as células ósseas do tecido receptor seguem e remodelam o enxerto por meio da reabsorção. Os fatores de crescimento e as proteínas indutoras são liberadas pelo osso transplantado, iniciando a fase II do processo osteoindutor (Axhausen, 1956). A matriz inorgânica de hidroxiapatita, que forma uma plataforma no enxerto autógeno, contribui para o efeito osteocondutor da formação óssea à medida que o osso novo se forma por meio da substituição por deformação. Este processo pode ser considerado uma terceira fase da formação óssea pelo osso autógeno (Misch, 1993).

Materiais para enxertos ósseos têm sido utilizados e investigados largamente. Embora o uso de osso autógeno seja comumente considerado o material de enxerto de primeira escolha, pois pode formar osso em todos os três mecanismos (Misch, 2000), existe uma série de limitações ao seu uso, como a quantidade disponível dos locais doadores, morbidade do local doador, deformidade e desconforto. Aloenxertos vêm sendo utilizados como alternativas ao auto enxerto (Yong-Moo *et al.*, 2000).

As estratégias de engenharia tecidual têm sido sugeridas como uma possível alternativa para autoenxertos convencionais. Recentes investigações têm aberto novas possibilidades para a construção de tecidos vitais autólogos *in vitro* usando biomateriais apropriados para guiar o desenvolvimento dos tecidos (Vacanti *et al.*, 1991; Cooper *et al.*, 1991; Atala *et al.*, 1992).

No interesse por novos materiais, pesquisas têm apontado para biopolímeros naturais, tais como a dextrina, mucopolissacarídeos e quitina. Especialmente a quitina ou quitosana (poly-N-acetyl glucosaminoglycan) um biopolímero de carboidrato extraído da quitina tem chamado a atenção. A quitina é o segundo mais abundante biopolímero natural próximo a celulose. Ela é o componente estrutural primário do exoesqueleto dos artrópodes, crustáceos, parede celular dos fungos e cutícula dos insetos. A quitina é um polissacarídeo muito estável e é um polímero linear da ligação do monômero N-acetyl-D-glucosamine com 1,4 β -glucosídico (Aspinall, 1986).

Nas últimas décadas, o uso do quitosana em regenerações ósseas vem ganhando particular interesse. O quitosana é um bio-polímero natural não tóxico e biodegradável (Sanford, 1989). Esse bio-polímero natural tem várias aplicações biomédicas, inclusive a de reduzir o peso pela absorção e sua ligação com os alimentos, controlando o nível do colesterol, reforçando a resposta imune contra bactérias, vírus e células cancerosas (Nishimura *et al.*, 1986; Klokkevold *et al.*, 1999). Outros estudos corroboram a habilidade do quitosana em melhorar a hemostasia (Malette *et al.*, 1983; Kind *et al.*, 1990; Klokkevold *et al.*, 1992) e a cicatrização dos tecidos conjuntivos injuriados (Muzzarelli *et al.*, 1988). Particularmente, o quitosana tem demonstrado aumentar a formação óssea e inibir a inserção e proliferação dos fibroblastos *in vitro* (Klokkevold *et al.*, 1996) e *in vivo* (Borah *et al.*, 1992; Klokkevold *et al.*, 1998).

Aumento de cicatrização óssea *in vivo* foi demonstrada por Muzzarelli *et al.*, (1994), em defeitos criados no cndilo femural de carneiros, após 40 dias e comparados com grupos controle que apresentaram apenas pequenos sinais de cicatrização óssea. No trabalho de Borah *et al.*, (1992) modelos de defeito de tamanho crítico foram feitos bilateralmente em fíbulas e metacarpos centrais de coelhos adultos, num estudo paralelo. Num defeito foi colocado o quitosana e no contra-lateral o defeito executado foi apenas fechado com os tecidos moles. Os animais foram posteriormente avaliados histológica e radiograficamente o que demonstrou marcado crescimento ósseo nos defeitos tratados com o quitosana. Evidências de melhora na regeneração óssea em cães também foram conferidas por Malette *et al.*, (1986).

Park *et al.*, (2003) conduziram um estudo em cães beagle com o objetivo de examinar o efeito do quitosana na regeneração dos tecidos periodontais. Defeitos de uma parede foram cirurgicamente criados e tratados com quitosana. O preparo histológico para avaliação foi executado após oito semanas do procedimento cirúrgico. Diferenças estatisticamente significante foram observadas em prol do quitosana, para a formação de cemento e tecido ósseo. Num estudo que tratou com gel de quitosana 52 casos de periodontite em cães, Muzzarelli *et al.*, (1989) registraram uma significativa redução na mobilidade dentária e profundidade de bolsa além do aumento na regeneração da histoarquitetura dos tecidos.

Além dessas aplicações biomédicas, o quitosana tem se mostrado como um regulador na liberação de agentes bioativos, inclusive dos fatores de crescimento (Berscht *et al.*, 1994), antibióticos (Chandy & Sharma, 1993) e drogas anti-inflamatórias (Shiraishi *et al.*, 1993). Além disso o quitosana se adapta muito bem a materiais inorgânicos tais como o tricálcio fosfato (TCP) e a hidroxiapatita (HA). Pastas de quitosana contendo fosfato de cálcio têm sido introduzidas como material de enxertos para lesões ósseas (Ito *et al.*, 1994). O quitosana em pasta ligado a hidroxiapatita aumentou a osteocondução quando aplicado na tíbia de coelhos adultos, em comparação com controles (Kawakami *et al.*, 1992).

As propriedades biológicas favoráveis do quitosana e sua disponibilidade em várias formas de apresentação incluindo pó, gel, soluções, esponjas, o faz um bom candidato para aplicações clínicas nas terapias periodontais e ósseo regenerativas (Klokkevold *et al.*, 1996).

Biocerâmicas de fosfato de cálcio vem recebendo atenção especial como material de preenchimento ósseo por comportar-se semelhantemente aos constituintes minerais dos ossos (Felício-Fernandes & Laranjeira, 2000). Esses materiais têm mostrado nenhuma toxicidade local ou sistêmica, nenhuma resposta de corpo estranho ou inflamação, além de aparente habilidade em se inserir aos tecidos do hospedeiro (Kawachi *et al.*, 2000). Poros de tamanho grande (100 μ m) são ideais para biocerâmicas (Kawachi *et al.*, 2000) por manter a vascularidade e viabilidade por longo prazo (Hench, 1991). A formação de biomateriais com macro poros (poros de 50 à 250 μ m) é resultado da mistura de um polímero ou substância orgânica a um material em pó. Uma variação deste, na forma de tricálcio fosfato tem sido exaustivamente avaliado em inúmeras áreas como material de osteocondução óssea, não somente na periodontia (Froum & Stahl, 1987), mas também na implantodontia (Misch & Dietsh, 1993) e ortopedia (Nicolas & Lange, 1994).

A síntese do fosfato de cálcio tem sido alcançada por diferentes métodos, incluindo: precipitação em solução aquosa, métodos hidrotérmicos, reações de estado sólido, processos sol-gel e micro emulsão (Kawachi *et al.*, 2000). O fosfato e o cálcio podem ser capazes em induzir crescimento ósseo tanto na superfície quanto no interior dos poros do material (Kawachi *et al.*, 2000, Hench, 1991), além de poderem agir como agentes modificadores reticular e indutores da formação de osso devido a presença do cálcio e fósforo (Felício-Fernandes & Laranjeira, 2000). As propriedades osteocondutoras da hidroxiapatita a credenciam para serem usadas em enxertos como substitutas ósseas (Sivakumar *et al.*, 1996).

Na engenharia tecidual, uma estrutura de armação ajuda a determinar a morfologia tridimensional, aumenta a sobrevivência celular e promove estabilidade mecânica inicial, suporta o crescimento dos tecidos por entre suas estruturas além de auxiliar na formação da estrutura do próprio tecido (Langer & Vacanti, 1993). Colágeno e quitosan são biodegradáveis e têm sido usados como materiais de armação na engenharia tecidual (Seong *et al.*, 2000; Rocha *et al.*, 2002). Contudo, esses polímeros naturais são mecanicamente frágeis, o que limita sua aplicação biomecânica. As cerâmicas de fosfato de cálcio são excelentes candidatas a reparação e regeneração óssea por conta de sua composição química ser similar aos componentes inorgânicos do osso (Orr *et al.*, 2001, Chang *et al.*, 2000). O β -tricalcium fosfato (β -TCP) é uma dessas cerâmicas que tem se mostrado ser bioativa e biodegradável. A taxa de degradação β -TCP é 10 vezes maior que da hidroxiapatita (Yaszemski *et al.*, 1996).

Animais experimentais apresentam melhor habilidade regenerativa que humanos (Sirola, 1960). Diferentes abordagens experimentais têm sido usadas para testar a capacidade de diferentes materiais em melhorar a regeneração óssea, ambos em ossos longos (Melcher & Dreyer, 1962) e no complexo crânio-facial (Melcher, 1969 & Tumbull & Freeman, 1974). Vários fatores devem ser levados em consideração quando se avaliam os resultados de experimentos animais. A quantidade e qualidade do osso que se forma num defeito é influenciado pela espécie e tipo de animal usado no experimento individual (Enneking *et al.*, 1975), idade do animal, estabilidade do defeito, localização anatômica do defeito ósseo (Najjar & Kahn, 1977), tipo de osso (Harris *et al.*,

1968), presença ou ausência de periósteo (Melcher, 1969) e presença da duramáter (McKibbin, 1978).

Os requisitos do modelo animal usado para o teste de regeneração óssea são: 1) O tamanho mínimo do defeito ósseo experimental não deve ser menor que o defeito ósseo de tamanho crítico para a espécie particular; 2) O modelo deve ser barato; 3) Os animais devem estar disponíveis, e com facilidade para manusear e anestésiar; 4) O defeito ósseo deve ser estável e não permitir mobilidade; 5) O risco de fratura deve ser minimizado; 6) O modelo animal deve permitir cuidados seguidos e avaliação da regeneração óssea radiográfica e histologicamente (Frame, 1980).

O defeito ósseo de tamanho crítico tem sido definido como o tamanho de um defeito ósseo que não cicatriza espontaneamente com osso durante a vida do animal (Schmitz & Hollinger, 1986; Bosch *et al.*, 1998). Alguns materiais osteogênicos, osteocondutores ou osteoindutores são colocados dentro ou sobre o defeito. Tais defeitos quando não tratados são preenchidos por tecido conjuntivo fibroso (Sirola, 1960), embora uma quantidade limitada de regeneração óssea possa ser vista nas margens do defeito. Frequentemente, feridas criadas cirurgicamente cicatrizam espontaneamente, especialmente em espécies filogenéticas de ordens inferiores e em animais jovens. Cicatrização por regeneração óssea de um defeito ósseo de tamanho crítico deve somente ocorrer após implantação de material ósseo regenerativo (Marden *et al.*, 1994).

Os resultados da estimulação experimental para regeneração óssea com materiais de reparação óssea são difíceis de serem comparadas por causa da falta de consistência na escolha de um modelo experimental apropriado. Por essa razão o defeito de tamanho crítico deve ser definido com respeito ao animal, idade, tamanho e local. O assim chamado defeito ósseo de tamanho crítico deve promover um modelo padrão para avaliação da eficácia da reparação óssea (Bosch *et al.*, 1995; Ripamonti, 1991).

Cirurgias reconstrutivas são executadas para corrigir defeitos ósseos congênitos e adquiridos, causados pela periodontite, artrite degenerativa e osteomielite. O tratamento preferido para muitos defeitos ósseos é o enxerto autógeno (Damien & Parsons, 1991; Misch & Dietsch, 1993; Mellonig, 1992). Os autoenxertos são bons materiais osteoindutores (Damien & Parsons, 1991; Rivault *et al.*, 1971; Dragoo & Sullivan, 1973; Goldberg & Stevenson, 1987). Contudo, embora altamente efetivo, o autoenxerto promove uma operação adicional ao indivíduo; mais dor; risco de hematoma; trombose; infecção do local doador; dano aos vasos e nervos; e pode requerer um prolongamento da estadia hospitalar; e existe uma limitação no suprimento do material para grandes defeitos ósseos (Goldberg & Stevenson, 1987; Schallhorn, 1972; Burnette, 1972). Os aloenxertos, embora osteogênicos, são a mais comum alternativa ao autoenxerto. Porém, o uso de aloenxertos envolvem certo risco quanto a antigenicidade, embora os aloenxertos sejam normalmente pré-tratados quimicamente ou por congelação ou radiação (Hiatt & Schallhorn, 1971; Mellonig, 1996; Quattlebaum *et al.*, 1988; Buck *et al.*, 1989). Assim, pode ser melhor usar substâncias alternativas para

substituição óssea, tais como, fatores de crescimento, fator- β de crescimento transformador (TGF- β) e proteínas morfogenéticas ósseas (BMP). Particularmente, as BMP's são um grupo de fatores de crescimento e diferenciação agindo precocemente nas células osteoprogenitoras de modo que elas diferenciam-se dentro dos osteoblastos maduros. Recentemente, alguns investigadores usaram moderna biotecnologia para isolar, identificar, clonar e expressar sete BMP's (Wang *et al.*, 1990; Wozney *et al.*, 1990).

A BMP-4 tem sido implicada como um fator de união na renovação óssea e durante a reparação de fraturas. Essa proteína parece estar envolvida nos eventos celulares os quais precedem a formação do calo no local fraturado (Bostrom *et al.*, 1995; Nakase *et al.*, 1994; Hollinger *et al.*, 1999).

A quitina e seu derivado diacetilado, o quitosana, são muito interativos na sua forma de aminas livres, eles têm as propriedades dos complexos de metais pesados e forma pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas com numerosos substratos (Seo *et al.*, 1989). Também apresentam interessantes propriedades biológicas tais como biodegradação, bioreabsorção (Nordtveit *et al.*, 1994), biocompatibilidade (Lee *et al.*, 1995; Hirano *et al.*, 1988) além de outras propriedades muito mais raras para polímeros naturais, a bioatividade (Muzzarelli, 1988), especialmente a indução óssea.

Proposição

Avaliar o efeito da utilização da esponja de quitosana/tricálcio fosfato no reparo ósseo em defeitos de calvária de ratos, por meio de uma análise histométrica.

Animais Utilizados

No experimento foram utilizados 20 (vinte) ratos machos, adultos, da espécie *Norvegicus albinus*, da linhagem Wistar, pesando entre 300 e 400g, provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp/SP. Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos em gaiolas no biotério da FOP-UNICAMP, sob condições ambientais ideais, e foram tratados com ração para animais de laboratório e água “*ad libitum*”. Todos os procedimentos foram executados de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia da UNICAMP - Bioterismo da UNICAMP (CEMIB) (ANEXO 01).

Fabricação da Esponja de Chitosan

A fabricação da esponja de chitosan seguiu o protocolo proposto por Lee *et al.* (2000). Inicialmente foi preparada uma solução de chitosan através da dissolução de 5g de pó de chitosan (Galena Química e Farmacêutica¹) em 100ml de ácido acético 1% (Galena Química e Farmacêutica^{*}). A esta solução foram adicionadas 2,7mg de tricálcio fosfato (Henrifarma Produtos Químicos e Farmacêuticos²) e após sua completa solubilização, a solução foi liofilizada e posteriormente embebida em uma solução de tripolifosfato de cálcio a 5%

¹ Galena Química e Farmacêutica Ltda. Campinas – SP.

² Henrifarma Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda. Cambuci – São Paulo – SP.

(Henrifarma Produtos Químicos e Farmacêuticos[†]), que novamente foi liofilizada para obter-se uma matriz esponjosa (figuras 01 e 02). A esponja foi então cortada em cubos $\leq 1\text{mm}^3$, a fim de facilitar o preenchimento do defeito.

Obtida a esponja de quitosana, a mesma foi acondicionada em recipiente de vidro e esterilizada por raios gama³ (cobalto 60) em doses de 14,5 KGg (Kilo Gray) e taxas 0,809 KGg/h pelo período de 17 horas.

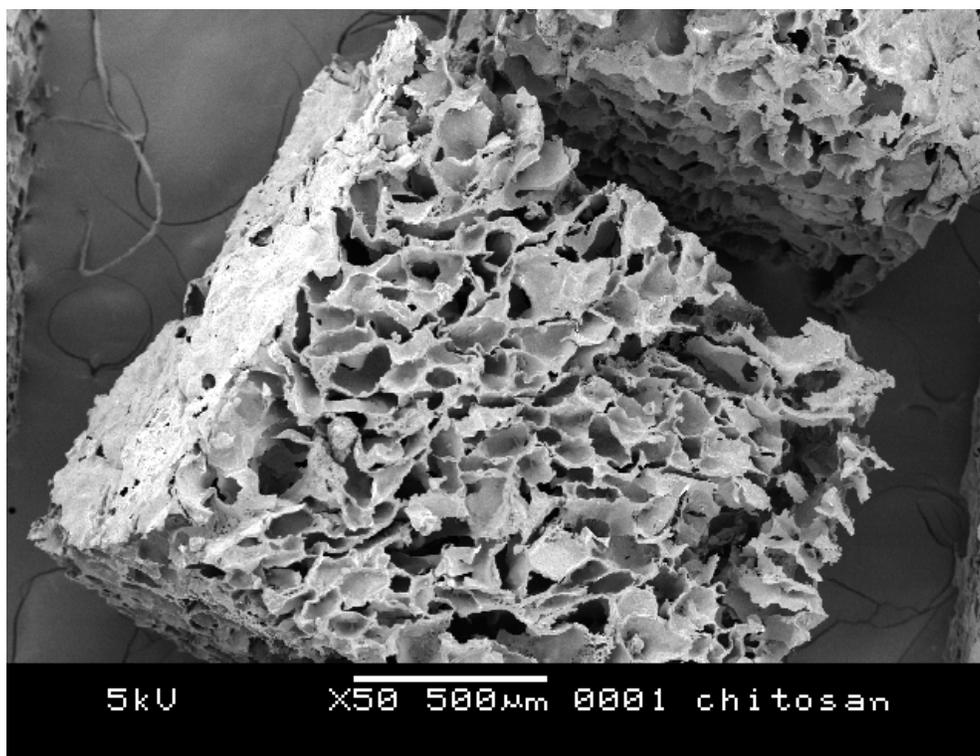


Figura 01: Fotomicrografia Eletrônica de Varredura da esponja de Quitosana em aumento de 50 vezes.

³ Laboratório de melhoramento de plantas – USP – CENA – Piracicaba – SP.

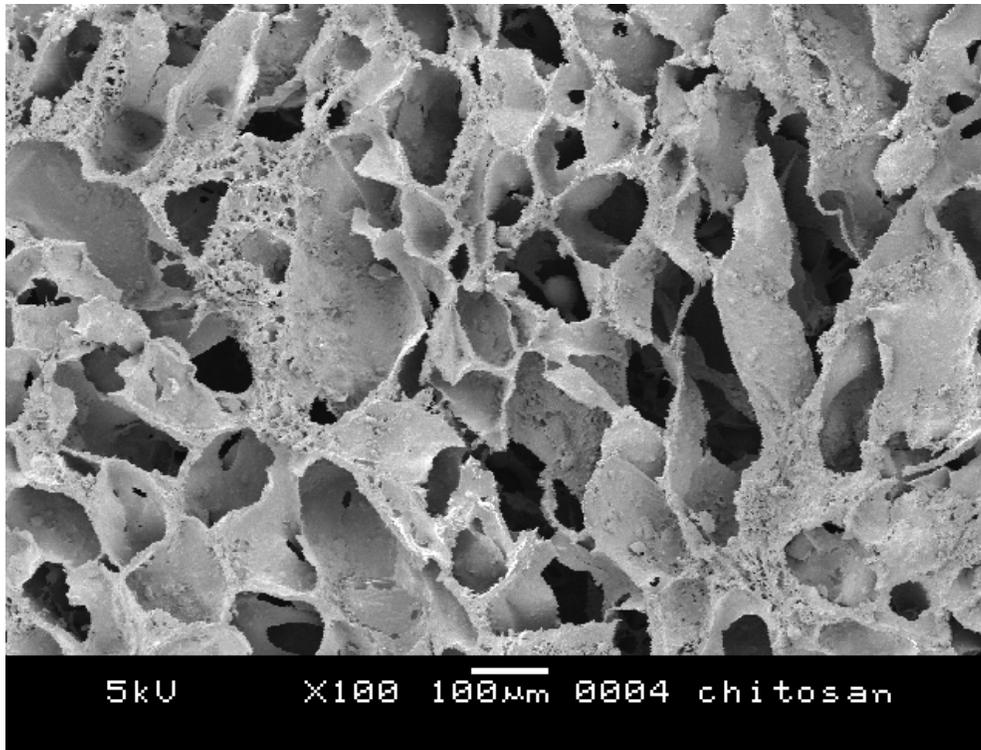


Figura 02: Fotomicrografia Eletrônica de Varredura da esponja de Chitosan, aumento de 100 vezes.

Delineamento do Estudo

Inicialmente os animais foram pesados para que se proporcionasse corretamente o anestésico a ser administrado. Após a sedação inicial com éter sulfúrico os animais receberam o anestésico, de acordo com o peso corpóreo, por meio de injeção intramuscular de cloridrato de xylasina 2%, (Rompun - Bayer do Brasil - Virbac do Brasil Ind. e Com. LTDA - 15 mg/Kg ou 0,15 ml/Kg) e ketamina, (Dopalen[®] - Agribrands do Brasil LTDA - 100 mg/Kg ou 1 ml/Kg).

Após o procedimento de anestesia, executou-se a tricotomia (figura 03) e anti-sepsia do campo cirúrgico com iodo povidine (polyvinylpyrrolidone) a 10%.

Utilizando-se lâminas número 15 para bisturi barder parker, efetuou-se duas incisões em L invertido (figura 04) na região ântero-superior e látero-superior esquerda da cabeça do animal. Retalho de espessura total, incluindo o perióstio, foi rebatido, expondo o osso parietal de ambos os lados do plano sagital. Dois defeitos ósseos críticos, de 7-8mm de diâmetro, um em cada lado do plano sagital, foram confeccionados com uma broca trefina, montada em contra-ângulo de baixa rotação sob irrigação constante com solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% (Glicolabor[®] - Indústria Farmacêutica – São Paulo/Brasil), para se evitar aquecimento excessivo do tecido ósseo. Extremo cuidado foi tomado a fim de evitar qualquer injúria ao cérebro, visto que a dura-máter seria exposta após a remoção óssea.

Os defeitos foram irrigados abundantemente com solução salina. Neste momento, os defeitos estavam prontos para receberem os materiais de preenchimento que foram distribuídos da seguinte maneira: Dentre os 20 ratos, 10 (dez) tiveram seus defeitos ósseos do lado esquerdo preenchidos com a esponja de quitosana previamente fabricada, e os defeitos do lado direito preenchido com o tecido ósseo autógeno, retirado durante a confecção dos defeitos, que foram cuidadosamente triturados. Os outros dez ratos tiveram o material de preenchimento invertidos, ou seja, esponja de quitosana no lado direito e osso autógeno no lado esquerdo (figura 05).

O retalho foi recolocado na sua posição original e uma sutura contínua foi executada (figura 06), com fio Vicryl 5-0 (Ethicon®, Johnsons do Brasil S/A, São José dos Campos, SP, Brasil).

Os animais receberam aplicação única de 185mg/Kg de dipirona sódica oral.



Figura 03: Tricotomia do campo operatório



Figura 04: Incisões de acesso à calvária em L invertido



Figura 05: Preenchimento dos defeitos ósseos com esponja de quitosã (lado direito) e osso autógeno (lado esquerdo).



Figura 06: Sutura contínua executada com fio Vicryl 5-0 (poliglactina 910).

Exame Histológico

Decorridos 60 dias pós-cirurgia, todos os animais foram pesados e receberam anestesia de acordo com o peso corpóreo, por meio de injeção intramuscular de cloridrato de xylasina 2%, (Rompun - Bayer do Brasil - Virbac do Brasil Ind. e Com. LTDA - 15 mg/Kg ou 0,15 ml/Kg) e ketamina, (Dopalen[®] - Agribrands do Brasil LTDA - 100 mg/Kg ou 1 ml/Kg).

Uma incisão tóraco-abdominal (figura 07) foi efetuada com uma lâmina de bisturi nº. 15 para bisturi barder parker. O sacrifício foi executado por meio de perfusão com formaldeído a 10% diretamente injetado no ventrículo esquerdo do coração do animal. Uma incisão no átrio direito foi executada no mesmo momento

da introdução do cateter de infusão no ventrículo esquerdo, o que proporcionou a troca do sangue pelo formaldeído durante o período cronometrado de dez minutos, fixando por completo o animal (figuras 08 e 09).

Após o sacrifício, a calvária e os tecidos adjacentes foram removidos em bloco através de ostectomia com broca tronco-cônica 701, montada em baixa rotação sob irrigação com soro fisiológico. As peças coletadas foram fixadas em formalina neutra a 4% em tampão fosfato (pH 7,2 - 7,4). A descalcificação foi realizada em solução de citrato de sódio a 20% e ácido fórmico a 50% em partes iguais (solução de Morse). Segundo o procedimento laboratorial de rotina, o descalcificador foi renovado a cada três dias por seis semanas. Ao final desse período, o osso já fixado e descalcificado, foi desidratado em álcool etílico (60-100%) sob constante agitação e diafanizado em xilol. As amostras foram separadas ao meio, de forma a fornecer cortes coronais do centro da cavidade óssea cirúrgica, e depois foram incluídas em parafina e seções seriadas com 6µm de espessura, no sentido coronal, foram obtidas e coradas por hematoxilina-eosina, para análise em microscopia de luz.

Para a análise histométrica, as lâminas foram submetidas a um programa de captura e análise de imagens (Image-Pro[®]; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). As imagens histológicas do tecido neoformado selecionadas para a contagem após a captura pelo computador através da câmera de vídeo,

foram avaliadas por meio de pontos lineares entre as bordas do defeito, calibradas proporcionalmente (figura esquemática 10).

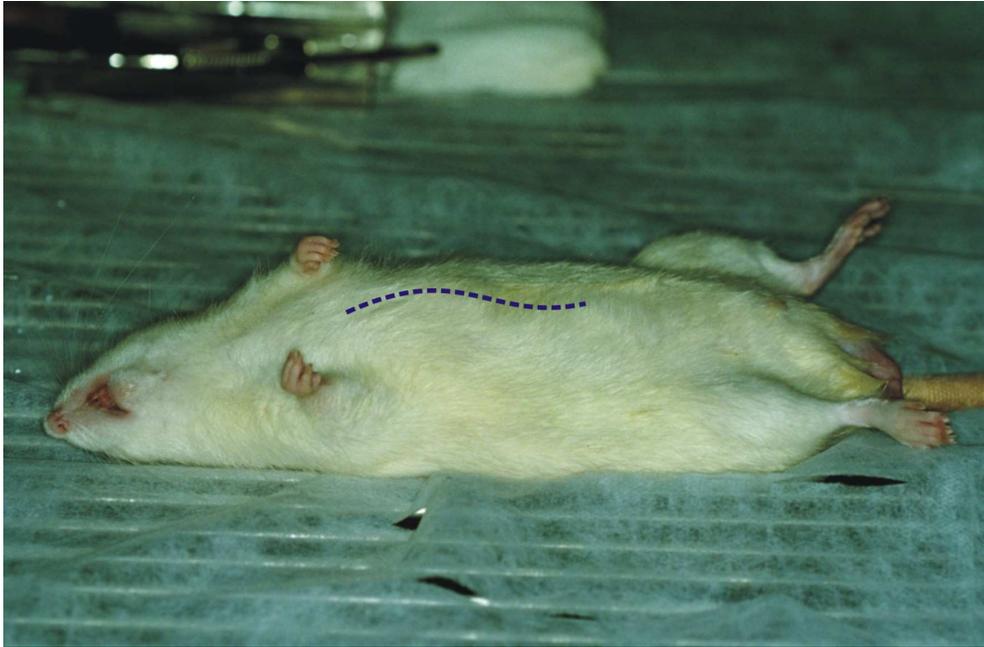


Figura 07: Animal sob anestesia. Determinação do local para a incisão tóraco-abdominal



Figura 08: Introdução do catéter no VE

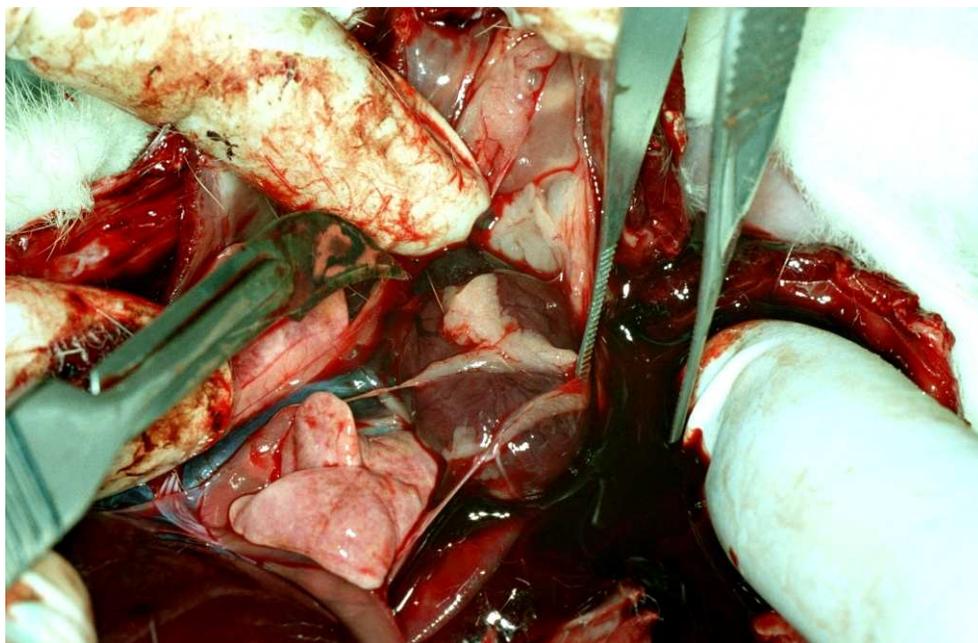


Figura 09: Ponta da lâmina de bisturi direcionada ao átrio direito para incisão liberadora

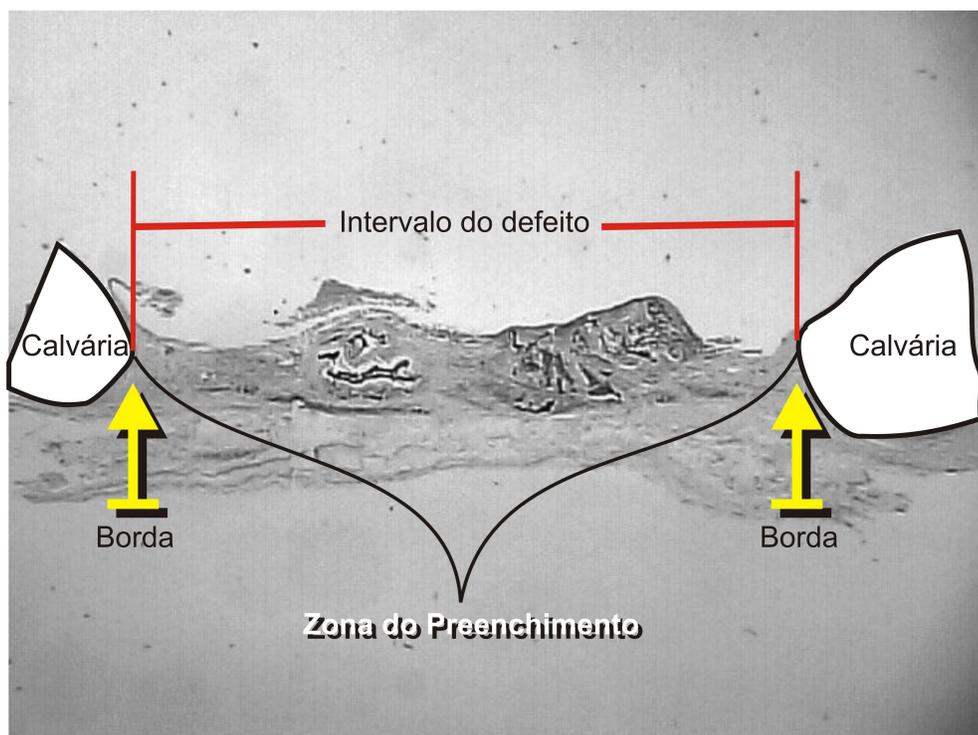


Figura 10: Esquema da condição histológica da confecção do defeito em calvária de ratos. Observar as bordas do defeito (setas) e a região a ser preenchida pela esponja de quitosana ou osso autógeno.

Análise Estatística

As comparações entre os defeitos preenchidos com chitosan ou osso autógeno foram submetidas ao teste de análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey para comparação entre as médias, adotando-se a probabilidade $\alpha=0,05$.

Observações Clínicas

No início do experimento foram selecionados 20 animais. Contudo, dois animais morreram antes da data estipulada para o sacrifício, não sendo possível a identificação da causa da morte. Além disso, três animais não foram considerados no estudo por defeitos no processamento das lâminas.

Durante todo o período de cicatrização, não ocorreu supuração ou formação de abscessos. No dia do sacrifício os tecidos moles estavam completamente cicatrizados, sem sinais clínicos de inflamação.

Fabricação da Esponja de Chitosan

A esponja de chitosan fabricada apresentou porosidade entre 50 μ m e 250 μ m (figuras 11 e 12).

Observações Histológicas

Histologicamente tivemos 15 (quinze) defeitos preenchidos com a esponja de chitosan (grupo teste) e 14 (quatorze) defeitos preenchidos com o osso

autógeno (grupo controle), tendo em vista que um defeito foi subtraído por problemas no processamento das lâminas.

A análise histomorfológica mostrou que o grupo teste e o grupo controle apresentaram características bem distintas, relativamente aos defeitos preenchidos com a esponja de quitosã e osso autógeno respectivamente. Em nenhum dos grupos foi identificada a presença de processos inflamatórios de quaisquer natureza.

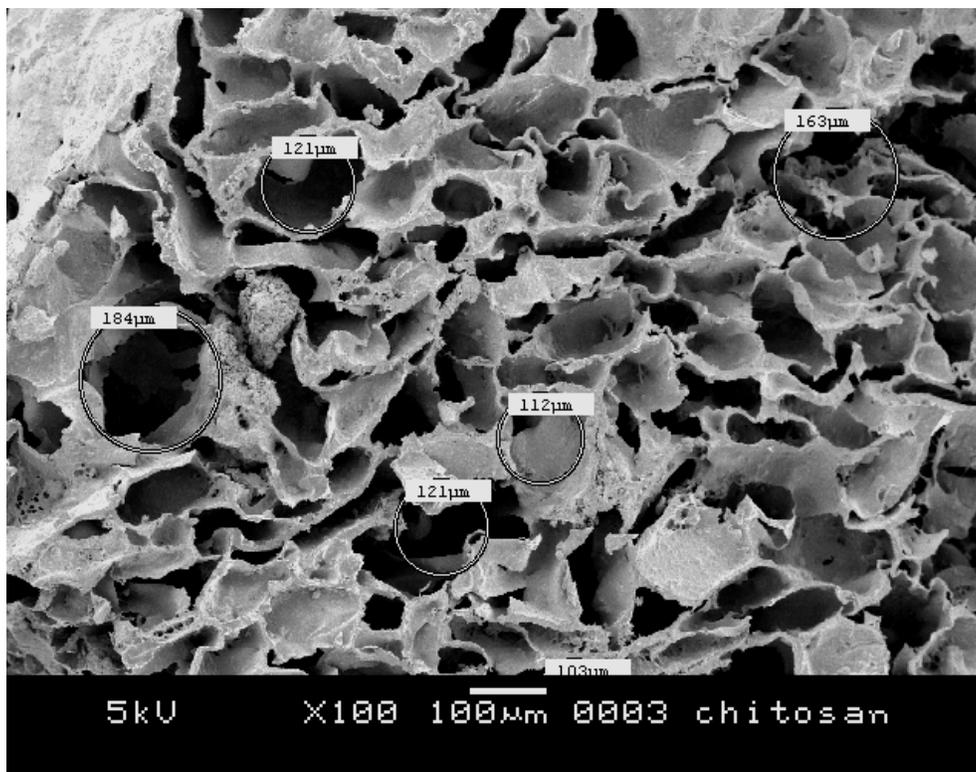


Figura 11: Visualização das variações de diâmetro dos poros da esponja de quitosã em microscopia eletrônica de varredura.

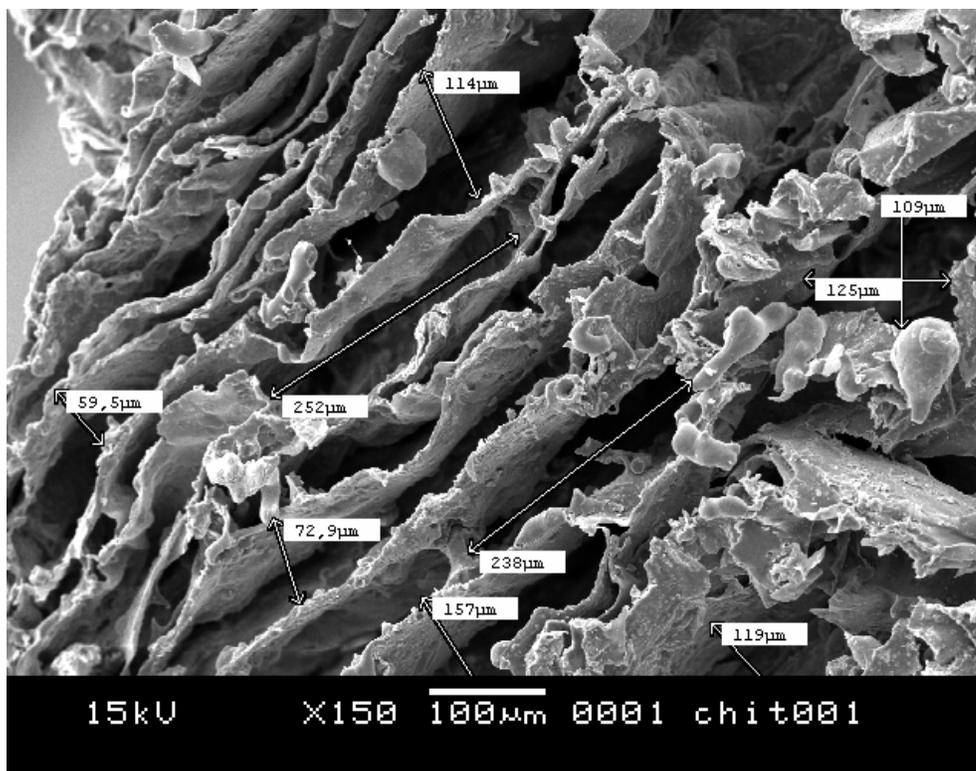


Figura 12: Visualização das variações de diâmetro dos poros da esponja de quitosã em microscopia eletrônica de varredura

Defeitos preenchidos com esponja de quitosã (Grupo Teste)

Foi observada a presença de remanescentes do quitosã em todos os defeitos (figura 13). Numa análise linear foi encontrada um média de 2,808 mm de fragmentos remanescentes da esponja de quitosã (tabela 1), o que corresponde em média a 37,79% dos defeitos. Na quase totalidade dos locais onde o quitosã foi reabsorvido, observou-se o preenchimento com tecido conjuntivo fibroso, encontrando-se apenas uma média de $0,54 \pm 0,37$ mm de preenchimento ósseo neste grupo (tabela 1).

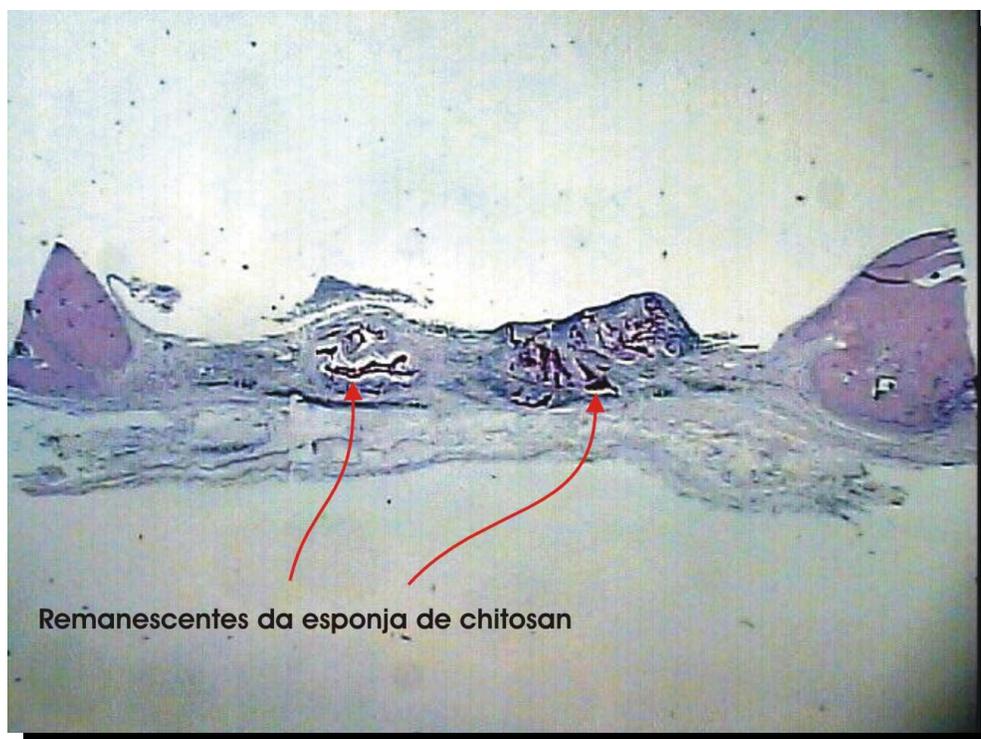


Figura 13: Remanescentes da esponja de quitosã (setas).

Tabela 1: Média e desvio padrão dos parâmetros lineares do Grupo Teste

Defeito	Extensão Total do Defeito (mm)	Ossô Neoformado (mm)	Remanescente do Quitosã (mm)
01	7,35 ± 0,22	0	0,788 ± 0,60
03	6,91 ± 0,23	0,77 ± 0,38	0,606 ± 0,72
05	7,51 ± 0,28	0,69 ± 0,19	2,626 ± 0,95
07	7,49 ± 0,28	0,86 ± 0,30	2,992 ± 0,63
09	6,75 ± 0,93	0,57 ± 0,17	4,72 ± 0,62
11	7,79 ± 0,19	0	2,11 ± 0,51
13	6,79 ± 0,09	1,21 ± 0,32	4,392 ± 0,70
15	7,17 ± 0,41	0,41 ± 0,19	2,67 ± 0,82
17	8,25 ± 0,13	0,71 ± 0,09	1,724 ± 0,84
19	7,70 ± 0,19	0,60 ± 0,25	2,906 ± 0,91
21	8,32 ± 0,19	0,06 ± 0,15	4,134 ± 0,11
23	7,51 ± 0,39	0,55 ± 0,14	4,564 ± 0,82
25	7,55 ± 0,15	0,11 ± 0,20	4,11 ± 0,98
27	6,84 ± 0,30	1,10 ± 0,28	1,332 ± 0,28
29	8,34 ± 0,29	0,51 ± 0,39	2,454 ± 1,09
Média	7,49	0,54	2,808

Defeitos preenchidos com osso autógeno (Grupo Controle)

Nestes defeitos observou-se o preenchimento parcial com tecido ósseo (figura 14). Numa análise linear foi registrado uma média de 5,02 mm de preenchimento do defeito com osso neoformado (tabela 2), o que corresponde a uma média de preenchimento do defeito da ordem de 68,76%. O espaço remanescente encontrava-se preenchido por tecido conjuntivo com características fibróticas.

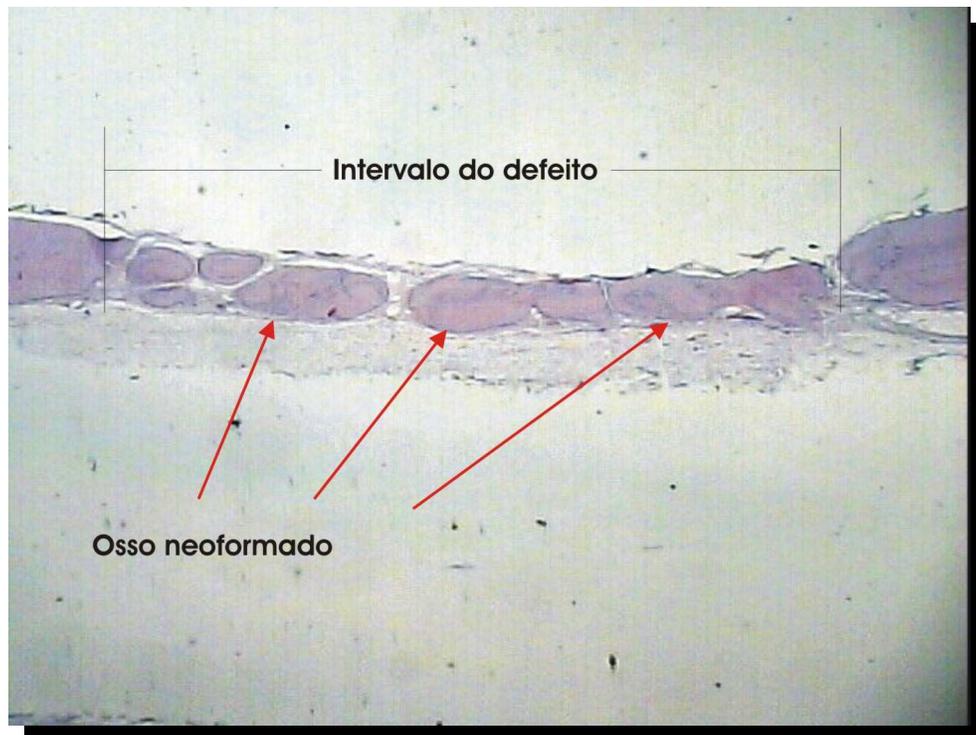


Figura 14: Presença de osso neoformado preenchendo o defeito (setas)

Tabela 2: Média e desvio padrão dos parâmetros lineares do Grupo Controle

Defeito	Extensão Total do Defeito (mm)	Osso Vital (mm)
02	6,55 ± 0,40	3,89 ± 0,26
04	7,76 ± 0,19	6,57 ± 1,57
06	7,46 ± 0,20	6,81 ± 0,33
08	7,46 ± 0,11	1,83 ± 1,02
10	7,04 ± 0,34	2,73 ± 0,88
12	7,54 ± 0,16	4,89 ± 1,27
14	7,35 ± 0,21	6,66 ± 0,46
16	7,00 ± 0,44	5,35 ± 0,98
18	7,33 ± 0,25	6,80 ± 0,29
20	7,62 ± 0,27	3,43 ± 0,44
22	7,73 ± 0,25	7,25 ± 0,65
24	7,49 ± 0,06	5,93 ± 0,86
26	7,15 ± 0,36	2,27 ± 1,52
28	6,47 ± 0,16	5,80 ± 0,33
Média	7,28	5,01

Comparação entre os dois grupos experimentais (Teste e Controle)

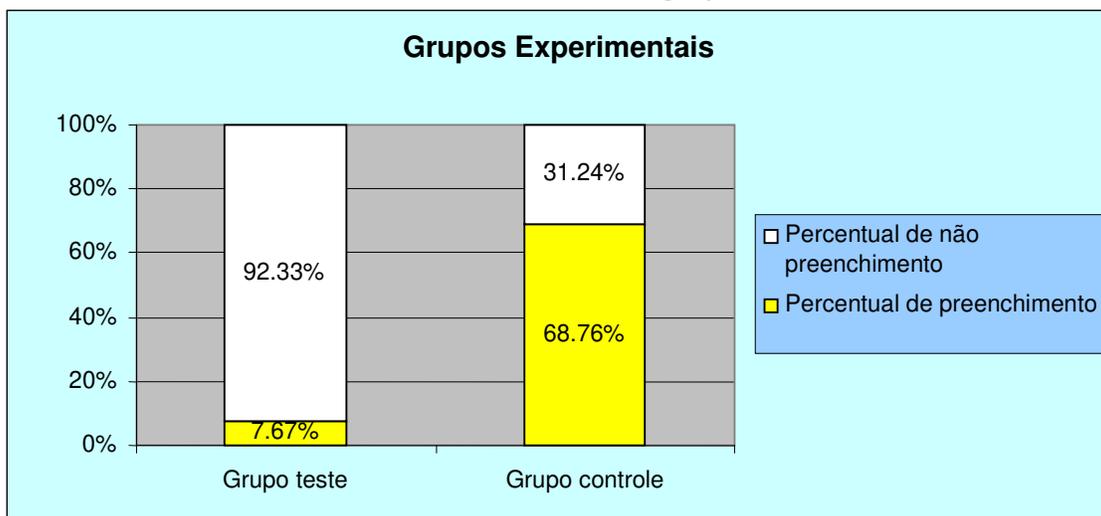
Comparando os dois grupos experimentais em relação as medidas lineares, observou-se maior área de tecido conjuntivo e menor área de osso vital no grupo teste (**Tabela 3**). Em termos percentuais, foi observado que o grupo teste preencheu menos o defeito que o grupo controle (7,67% e 68,76%) respectivamente(**Gráfico 1**).

Tabela 3: Média e desvio padrão (mm) dos parâmetros lineares dos defeitos nos grupos teste e controle.

	Grupo Teste (n=15)	Grupo Controle (n=14)	Valor de p
Extensão total do defeito	7,43 ± 0,50	7,29 ± 0,40	0,5734
Extensão não preenchida com osso	6,91 ± 0,77	2,26 ± 1,80	0,01*
Extensão de osso neoformado ou vital	0,54 ± 0,37	5,24 ± 1,98	0,01*

*Estatisticamente significante, $p < 0,01$ (teste de Tukey)

Gráfico 1. Proporção (%) dos diversos padrões lineares de preenchimento ocorrido nos defeitos de calvária de ratos, nos grupos teste e controle.



O quitosano é considerado um material com boa compatibilidade biológica, com disponibilidade e versatilidade nas formas de apresentação e com boa adaptação a materiais inorgânicos. Além dessas propriedades, a osteocondução e o papel regulador na liberação de fatores de crescimento e medicamentos vêm sendo estudadas ultimamente, *in vitro* e *in vivo*.

Nesse estudo, defeitos de calvária de tamanho crítico foram usados para avaliar o efeito osteogênico da esponja de quitosano associada ao tricálcio-fosfato. Além disso, uma comparação foi executada, do efeito regenerativo ósseo dos defeitos preenchidos com osso autógeno com os preenchidos com esponja de quitosano/tricálcio fosfato.

Foram usados, nesse estudo, modelos de defeitos de tamanho crítico (7-8mm) em calvária de ratos, que são aqueles defeitos que não cicatrizam espontaneamente durante a vida do animal (Schmitz & Hollinger 1986 & Bosch *et al.*, 1998). Esses defeitos têm sido previamente estabelecidos como bons modelos para investigações de efeitos regenerativos ósseos. O defeito de calvária, comparados com outros defeitos ósseos experimentais, é um modelo conveniente para estudar os materiais regenerativos ósseos por conta da sua fácil acessibilidade e não exigência de fixação. Além disso, defeitos são naturalmente

reproduzidos e processos de cicatrização induzidos têm sido bem caracterizados (Marden *et al.*, 1994). Também tem sido estabelecido que defeitos trefinados de calvária de 7-8mm podem ser considerados de tamanho crítico (Schmitz & Hollinger 1986 & Bosch *et al.*, 1998).

O tamanho dos poros é uma característica importante para quaisquer biomateriais que se deseje como material de enxerto. Macro poros de 50 à 250µm de diâmetro foram usados por vários autores em seus experimentos: Froum & Stahl (1987); Misch & Dietsh (1993) e Nicolas & Lange (1994). Para Kawachi *et al.*, (2000), poros de 100µm são ideais para qualquer biocerâmica e Hench, (1991), afirmou que esse tamanho assegura a vascularização e a viabilidade do enxerto em longo prazo. Canfield *et al.*, (2000) apontaram que os osteoblastos são células de forma poliédrica com tamanho médio de 20-30µm, o que permitiria sua penetração nos poros da esponja de quitosan/tricálcio fosfato enxertado neste trabalho, visto que a mesma possuía poros de tamanho variável entre 50 e 250µm. Esses estudos ratificaram a qualidade, do ponto de vista arquitetural, da esponja de quitosan fabricada para esse experimento, que demonstraram porosidade dentro das especificações científicas relatadas.

O tricálcio fosfato tem sido usado como um material de enxerto ósseo em ortopedia (Nicolas & Lange, 1994), em periodontia (Froum & Stahl, 1987) e em implantodontia (Misch & Dietsh, 1993). A vantagem do tricálcio fosfato inclui boa compatibilidade óssea e reabsorção com substituição por osso na linha do tempo. No nosso estudo não conseguimos observar uma significativa substituição do

chitosan/tricálcio fosfato utilizado, ele foi parcialmente reabsorvido com insignificante formação óssea, estando em consonância com os estudos de Froum & Stahl, (1987), que asseveraram que a desvantagem do tricálcio fosfato, usado somente como material de enxerto é a descontrolada reabsorção e uma ausência de substancial formação óssea no defeito ósseo. Embora a biocompatibilidade com o osso seja grande, ele pode ser encapsulado com tecido mole (Froum & Stahl, 1987), o que se coaduna com os achados do nosso estudo, onde houve uma parcial reabsorção da esponja de chitosan/tricálcio fosfato e pouca ou desprezível neoformação óssea, tendo talvez, a velocidade de reabsorção, sido um fator impeditivo da formação de um novo tecido ósseo. Contudo, por ser uma reabsorção sem controle, a velocidade de reabsorção pode ter variado durante o tempo, o que justificaria a presença de remanescentes da esponja de chitosan/tricálcio fosfato em conjunto com uma ausência de neoformação óssea. Esses achados são dissonantes com o que registraram Kawachi *et al.*, (2000) e Hench, (1991), que revelaram que o tricálcio fosfato induzem crescimento ósseo por entre os poros do material de enxerto, e com o que concluíram Felício-Fernandes & Laranjeira, (2000), que atribuíram a neoformação óssea a presença do fósforo e cálcio.

Em comparação com o osso autógeno, a esponja de chitosan/tricálcio fosfato apresentou pequena osteocondução na formação óssea, perfazendo um preenchimento linear médio de 7,72%, enquanto o primeiro atingiu uma média de 68,75%. Esses resultados permitem a visualização do chitosan por outro ângulo, visto que até o presente momento, os resultados obtidos na grande maioria dos

estudos o comparavam com o controle negativo, ou seja, com defeitos que não recebiam qualquer tipo de preenchimento, (Borah *et al.*, 1992; Klokkevold *et al.*, 1998; Muzzarelli *et al.*, 1994; Malette *et al.*, 1986; Park *et al.*, 2003), obtendo assim, quando de qualquer quantidade de neoformação óssea, um resultado positivo, sem amplitude comparativa com padrões de excelência, como os preenchidos com enxerto ósseo autógeno, por exemplo. Poderemos ainda explicar os melhores resultados do osso autógeno, por este atuar de forma osteogênica, osteoindutora e osteocondutora (Axhausen, 1956), enquanto o quitosan/tricálcio fosfato apresenta supostamente apenas a propriedade osteocondutora (Kawakami *et al.*, 1992; Froum & Stahl, 1987).

Com base nesse estudo, é possível supor que a significância clínica da esponja de quitosan/tricálcio fosfato frente ao enxerto ósseo autógeno, na osteocondução óssea, é muito pequena, necessitando vários outros testes, adaptações, reformulação arquitetural e percentual de composição, para que tenhamos clareza de todas as vertentes que compõem os efeitos positivos de engenharia tecidual tão propagados do quitosan.

Conclusão

Dentro das limitações desse estudo, conclui-se que:

- 1) A esponja de quitosana/tricálcio fosfato apresenta um efeito não significativo sobre o reparo ósseo em defeitos de calvária de ratos em comparação com o osso autógeno.

1. Aspinall GO. The polysaccharides. In chitin and chitosan vol. 2, p. 386. New York: Academic press, Inc.
2. Atala A, Vacanti JP, Peter CA, Mandel JP, Retik AB, Freeman MR. Formation of urothelial structures in vivo from dissociated cells attached to biodegradable polymer scaffolds in vitro. *J Urol.* 1992; 148:658-662.
3. Axhausen W. The osteogenic phases of regeneration of bone, a historical and experimental study. *J Bone Joint Surg.* 1956; 38A:593-601.
4. Baron R, Vignery A, Horowitz M: Lymphocytes, macrophages and the regulation of bone remodeling. *Bone and mineral research: annual 2*, pp175-243, Amsterdam, 1984, Elsevier.
5. Berscht PC, Nies B, Liebendorfer A, Kreuter J. Incorporation of basic fibroblast growth factor into methyl-pyrrolidone chitosan fleeces and determination of the in vitro release characteristics. *Biomaterials.* 1994; 15:595-600.
6. Borah G, Scott G, Wortham K. Induction by chitosan in endochondral bones of the extremities. *Proceedings of the 5th International Conference on Chitin and Chitosan.* London: Elsevier. 1992; 47-53.
7. Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Guided bone regeneration in calvarial bone defects using polytetrafluoroethylene membranes. *Cleft Palate Craniofac J.* 1995; 32:311-317.

[&] De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

8. Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone regenerating materials. *J Craniofac Surg.* 1998; 9: 310-316.
9. Bostrom MP, Lane JM, Berberian WS. Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *J Orthop Res.* 1995; 13: 357-367.
10. Brown LJ, Loe H. Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. *Periodontol 2000.* 1993; 2:57-71.
11. Buck BE, Malinin TL, Brown MD. Bone transplantation and human immunodeficiency virus. An estimate of risk of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Clin Orthop.* 1989; 240:129-136.
12. Buck BE, Malinin TL. Human bone and tissue allografts. *Clin Orthop.* 1994; 303:8-17.
13. Burnette EW Jr. Fate of an iliac crest graft. *J Periodontol.* 1972; 43: 88-90.
14. Cameron HU, MacNab I, Piliar RM. Evaluation of a biodegradable ceramic. *J Biomed Mater Res.* 1977; 11:179.
15. Canfield AE, Doherty MJ, Ashton BA. Osteogenic potential of vascular pericytes. En: Davies JE ed. *Bone Engineering.* Toronto: Davies JE ed.; 2000; 143-151.
16. Chandy T, Sharma CT. Chitosan matrix for oral sustained delivery of ampicillin. *Biomaterials.* 1993; 14: 939-944.
17. Chang BS, Lee CK, Hong KS, Youn HJ, Ryu HS, Chung SS *et al.* Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. *Biomaterials.* 2000; 21: 1291-1298.

18. Cheung HS, Tofe AJ. Mechanism of cell growth on calcium phosphate particles: role of cell mediated dissolution of calcium phosphate matrix. *STP Pharma Sciences*. 1993; 3(1):51-55.
19. Choi KS, Ahn HS. A study of synthesis of crosslinked chitosan phosphate and adsorption characteristics of metallic ions. *Polymer*. 1990; 14: 516-26.
20. Cooper ML, Hansbrough JF, Spielvogel RL, Cohen R, Bartel RL, Naughton G. In vivo optimization of a living dermal substitute employing cultured human fibroblasts on a biodegradable polyglycolic acid or polyglactin mesh. *Biomaterials*. 1991; 12: 243-248.
21. Covey DC, Albright JA. Clinical induction of bone repair with demineralized bone matrix or a bone morphogenetic protein. *Orthop Rev*. 1989; 18:857-863.
22. Damien CJ, Parsons JR. Bone graft and bone graft substitutes: A review of current technology and applications. *J Appl Biomater*. 1991; 2: 187-208.
23. Draget KI, Varum KM, Moen E, Gynnild H, Smisrod O. Chitosan cross-linked with Mo(VI) polyoxyanions: a new gelling system. *Biomaterials*. 1992; 13: 635-8.
24. Dragoo MR, Sullivan HC. A clinical and histological evaluation of autogenous iliac bone grafts in humans. II. External root resorption. *J Periodontol*. 1973; 44: 614-625.
25. Dzedzic-Goclawska A, Emerich J, Grzesik W, Stachowicz W, Michalik J, Ostrowski K. Differences in the kinetics of the mineralization process in endochondral and intramembranous osteogenesis in human fetal development. *J Bone Miner Res*. 1988; 3: 533.

26. Enneking WF, Burchardt H, Puhl JJ, Piotrowski G. Physical and biological aspects of repair in dog cortical-bone transplants. *J Bone Joint Surg Am.* 1975; 57: 237-252.
27. Felício-Fernandes G, Laranjeira MCM. Calcium phosphate biomaterials from marine algae. Hydrothermal synthesis and characterization. *Quim Nova.* 2000; 23: 441-446.
28. Frame JW. A convenient animal model for testing bone substitute materials. *J Oral Surg.* 1980; 38: 176-180.
29. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol.* 1966; 16:381-386.
30. Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol.* 1976; 47: 327-355.
31. Friedlander GE. Bone grafts: the basic science rationale for clinical applications. *J Bone Joint Surg.* 1987; 69A:786-790.
32. Froum S, Stahl SS. Human intraosseous healing responses to the placement of tricalcium phosphate ceramic implants. 13 to 18 months. *J Periodontol.* 1987; 58: 103-109.
33. Goldberg VM, Stevenson S. Natural history of autografts and allografts. *Clin Orthop.* 1987; 225: 7-16.
34. Gray JC, Elves MW. Early osteogenesis in compact bone isografts: a quantitative study of contributions of the different graft cells. *Calcif Tissue Int.* 1979; 29:225-237.

35. Harris WH, Haywood EA, Lavorgna J, Hamblen DL. Spatial and temporal variations in the cortical bone formation in dogs. *J Bone Joint Surg Am.* 1968; 50: 1118-1128.
36. Hench LL. Bioceramics: From concept to clinic. *J Am Ceram Soc* 1991; 74:1487-1510.
37. Hernández-Gil IFT, Gracia MAA, Pingarrón MdC, Jerez LB. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006; 11: E47-51.
38. Hiatt WH, Schallhorn RG. Human allografts of iliac cancellous bone and marrow in periodontal osseous defects. I. Rationale and methodology. *J Periodontol.* 1971; 42: 642-647.
39. Hirano S, Seino H, Akiyama Y, Nonaka I. Biocompatibility of chitosan by oral and intravenous administrations. *Polym Mater Sci Eng.* 1988; 59: 897-901.
40. Hirano S, Yamaguschi R, Fukui N, Iwata M. A chitosan oxalate gel: its conversion to a *N*-acetylchitosan gel via a chitosan gel. *Carbohydr Res.* 1990; 201: 145-9.
41. Hollinger JO, Buck DC, Bruder SP. Biology of bone healing: Its impact on clinical therapy. In: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE, eds. *Tissue Engineering. Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics.* Carol Stream, IL: Quintessence Publishing Co. 1999; 17-53.
42. Holmstrand K. Biophysical investigation of bone transplants and bone implants, an experimental study. *Acta Orthop Scand Suppl.* 1957; 26:1-92.

43. Hugoson A, Laurell L, Lundgren D. Frequency distribution of individuals aged 20-70 years according to severity of periodontal disease experience in 1973 and 1983. *J Clin Periodontol.* 1992; 19(4):227-32.
44. Ito M, Miyazaki A, Yamagishi T, Yagasaki H, Hashem A, Oshida Y. Experimental development of a chitosan-bonded beta-tricalcium phosphate bone filling paste. *Biomed Mater Eng.* 1994; 4: 439-449.
45. Kawachi EY, Betran CA, Dos Reis RR, Alves OL. Biocerâmicas: Tendências e Perspectivas de uma área interdisciplinar. *Quim Nova.* 2000; 23: 518-522.
46. Kawakami T, Antoh M, Hasegawa H, Yamagishi H, Ito M, Eda S. Experimental study on osteoconductive properties of a chitosan-bonded hydroxyapatite bone filling paste. *Biomaterials.* 1992; 13:759-763.
47. Kent JN, Jarcho M. Ridge augmentation procedures with hydroxyapatite. In: Fonseca JS, Davis WH. *Reconstructive preprosthetic oral and maxillofacial surgery.* Ed. 2, pp. 57-1033, Philadelphia, 1995, WB Saunders.
48. Kind GM, Bind SD, Staren ED, Templeton AJ, Economou SG. Chitosan: Evaluation of a new hemostatic agent. *Curr Surg.* 1990; 47: 37-39.
49. Klokkevold PR, Subar B, Fukayama H, Bertolami CN. Effect of chitosan lingual hemostasis in rabbits with platelet dysfunction induced by epoprostenol. *J Oral Maxillofac Surg.* 1992; 50: 41-45.
50. Klokkevold PR, Fukayama H, Sung EC, Bertolami CN. The effect of chitosan (poly-N-acetyl glucosamine) on lingual hemostasis in heparinized rabbits. *J Oral Maxillofac Surg.* 1999; 57: 49-52.
51. Klokkevold PR, Redd M, Salamati A, Kim J, Nishimura R. The effect of chitosan on guided bone regeneration: A pilot study in the rabbit. *Proceedings of the 7th*

- International Conference on Chitin and Chitosan*. Lyon, France: Jacques Andre Publisher; 1998:656-663.
52. Klokkevold PR, Vandemark L, Kenney EB, Bernard GW. Osteogenesis enhanced by chitosan (poly-N-acetyl glucosamine) in vitro. *J Periodontol*. 1996; 67: 1170-1175.
53. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993; 260: 920-926.
54. Lanyon L. Osteocytes, strain detection, bone remodeling and remodeling. *Calcified Tissue Int*. 1993; 53: 102-107.
55. Lee KY, Ha WS, Park WH. Blood compatibility and biodegradability of partially N-acetylated chitosan. *Biomaterials*. 1995; 16: 1211-6.
56. Lee YM, Park YJ, Lee SJ, Ku Y, Han SB, Klokkevold PR *et al*. The bone regenerative effect of platelet-derived growth factor-BB delivered with a chitosan/tricalcium phosphate sponge carrier. *J Periodontol*. 2000; 71: 418-424.
57. Malette WG, Quigley HJ, Adickes ED. Chitin in nature and technology. In Muzzarelli R, Jeuniaux C, Good-ay GW. Chitosan effect in nature and technology eds. Pp. 435-442. New York: Plenum Press.
58. Malette WG, Quigley HJ, Gaines RD, Johnson ND, Rainer WG. Chitosan: A new hemostatic. *Ann Thorac Surg*. 1983; 36:55-58.
59. Marden LJ, Hollinger JO, Chauhari A, Turek T, Schaub RG, Ron E. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 is superior to demineralized bone matrix in repairing craniotomy defects in rats. *J Biomed Mater Res*. 1994; 28: 1127-1138.
60. Martin RB, Burr DB. Structure, function, and adaptation of compact bone. New York, 1989, Raven Press.

61. McKibbin B. The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br.* 1978; 60: 150-162.
62. Melcher AH, Dreyer CJ. Protection of the blood clot in healing circumscribed bone defects. *J Bone Joint Surg Br.* 1962; 44: 424-430.
63. Melcher AH. Role of the periosteum in repair of wounds of the parietal bone of the rat. *Arch Oral Biol.* 1969; 14: 1101-1109.
64. Mellonig JT. Alveolar bone induction: autografts and allografts. *Dent Clin North Am.* 1980; 24(4):719-37.
65. Mellonig JT. Autogenous and allogeneic bone grafts in periodontal therapy. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1992; 3: 333-352.
66. Mellonig JT. Bone allografts in periodontal therapy. *Clin Orthop.* 1996; 324: 116-125.
67. Misch CE. *Implantes Dentários Contemporâneos.* São Paulo: Santos Livraria Editora; 2000.
68. Misch CE, Dietsch F. Bone-grafting materials in implant dentistry. *Implant Dent.* 1993; 2:158-167.
69. Muzzarelli R, Baldassarre V, Conti F, Ferrera P, Biagini G, Gazzanelli G *et al.* Biological activity of chitosan: ultrastructural study. *Biomaterials.* 1988; 9: 247-252.
70. Muzzarelli R, Biagini G, Pugnali A, Filippini O, Baldassarre V, Castaldini C *et al.* Reconstruction of periodontal tissue with chitosan. *Biomaterials.* 1989; 10: 598-603.
71. Muzzarelli RA, Mattioni-Belmonte M, Tietz C. Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan. *Biomaterials.* 1994; 15: 1075-1081.

72. Najjar TA, Kahn D. Comparative study of healing and remodeling in various bones. *J Oral Surg.* 1977; 35: 375-379.
73. Nakase T, Nomura S, Yoshikawa H. Transient and localized expression of bone morphogenetic protein-4 messenger RNA during fracture healing. *J Bone Miner Res.* 1994; 9: 651-659.
74. Nicolas RW, Lange TA. Granular tricalcium phosphate grafting of cavitary lesions in human bony. *Clin Orthop.* 1994; 306: 197-203.
75. Nordtveit RJ, Varum KM, Smidsrod O. Degradation of fully water soluble partially N-acetylated chitosans with lysozyme. *Carbohydr polym.* 1994; 23: 253-60.
76. Orr TE, Villars PA, Mitchell SL, Hsu HP, Spector M. Compressive properties of cancellous bone defects in a rabbit model treated with particles of natural bone mineral and synthetic hydroxyapatite. *Biomaterials.* 2001; 22: 1953-1959.
77. Park JS, Choi SH, Moon IS, Cho KS, Chai JK, Kim CK. Eight-week histological analysis on the effect of chitosan on surgically created one-wall intrabony defects in beagle dogs. *J Clin Periodontol.* 2003; 30: 443-453.
78. Quattlebaum JB, Mellonig JT, Hensel NF. Antigenicity of freeze-dried cortical bone allograft in human periodontal osseous defects. *J Periodontol.* 1988; 59: 394-397.
79. Ripamonti U. Bone induction in nonhuman primates. An experimental study on the baboon. *Clin Orthop.* 1991; 269:284-294.
80. Rivault AF, Toto PD, Levy S, Gargiulo AW. Autogenous bone grafts: Osseous coagulum and osseous retrograde procedures in primates. *J Periodontol.* 1971; 42: 787-796.

81. Roberts GAF, Taylor KE. Chitosan gels. Part 3. The formation of gels by reaction of chitosan with glutaraldehyde. *Makromol Chem.* 1989; 190: 951-60.
82. Roberts WE, Garetto LP, Arbuckle GR. What are the risk factors of osteoporosis? *J Am Dent Assoc.* 1991; 122(2): 59-61.
83. Roberts WE, Simmons KE, Garetto LP. Bone physiology and metabolism in dental implantology: risk factors for osteoporosis and other metabolic bone diseases. *Implant Dent.* 1992; 1: 11-21.
84. Roberts WE, Turley PK, Brezniak N. Bone physiology and metabolism. *Calif Dent Assoc J.* 1987; 15: 54-61.
85. Rocha LB, Goissis G, Rossi MA. Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. *Biomaterials.* 2002; 23: 449-456.
86. Sanford PA. Chitosan: Commercial uses and potential applications. In: Skjak-Braek G, Anthonsen T, Sanford P, eds. *Chitin and Chitosan.* London: Elsevier Applied Science. 1989; 51-70.
87. Schallhorn RG. Postoperative problems associated with iliac transplants. *J Peirodontol.* 1972; 43: 3-9.
88. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop.* 1986; 205: 299-308.
89. Seo TK, Hagura S, Kanbara T, Ijama T. Interaction of dyes with chitosan derivative. *J Appl Polym Sci.* 1989; 37: 3011-27.
90. Seong H, Baek HJ, Kwon IC, Jeong SY, Lee EHB. Chitosan macroporous scaffolds for cell culture. *Polym Prepr.* 2000; 41(2): 1687-1688.

91. Shiraishi S, Imai T, Otagiri M. Controlled release of indomethacin by chitosan-polyelectrolyte complex: Optimization and in vivo/in vitro evaluation. *J Control Release*. 1993; 25: 217-225.
92. Sirola K. Regeneration of defects in the calvária. An experimental study. *Ann Med Exp Biol Fenn*. 1960; 38: 1-87.
93. Sivakumar M, Sampath Kumar TS, Shantha KL, Panduranga Rao K. Development of hydroxyapatite derived from indian coral. *Biomaterials*. 1996; 17: 1709-1714.
94. Trueta J. The role of blood vessels in osteogenesis. *J Bone Joint Surg Br*. 1963; 45: 402.
95. Tumbull RS, Freeman E. Use of wounds in the parietal bone of the rat for evaluating bone marrow for grafting into periodontal defects. *J Periodontol Res*. 1974; 9: 39-43.
96. Vacanti CA, Langer R, Schloo B, Vacanti JP. Synthetic polymer seeded with chondrocytes provides a template for new cartilage formation. *Plast Reconstr Surg*. 1991; 88: 753-759.
97. Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 1990; 87: 2220-2224.
98. Wheater PR, Burkitt HG, Daniels VG. *Functional Histology*. New York: Churchill Livingstone ed. 1987; 142-160.
99. Wozney JM, Rosen V, Byrne M, Celeste AJ, Moutsatsos I, Wang EA. Growth factors influencing bone development. *J Cell Sci*. 1990; 13: 149S-156S.

100. Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev.* 2000; 21: 393-411.
101. Yaszemski MJ, Payne RG, Hayes WC, Langer R, Mikos AG. Evolution of bone transplantation: molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone. *Biomaterials.* 1996; 17: 175-185.
102. Yong-Moo L, Yoon-Jeong P, Seung-Jin L, Young K, Soo-Boo H, Sang-Mook C, *et al.* *J Periodontol.* 2000; 71: 410-417.
103. Young MF. Bone matrix proteins: more than markers. *Calcif Tissue Int.* 2003; 72: 2-4.\

ANEXOS



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 931-1, sobre "AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DA ESPONJA DE CHITOSAN/TRICÁLCIO FOSFATO NO REPARO DE DEFEITOS ÓSSEOS EM CALVÁRIA DE RATOS" sob a responsabilidade de Prof. Dr. Antonio Wilson Sallum/Saulo Cabral dos Santos está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 12 de dezembro de 2005.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 931-1, entitled "EFFECT OF CHITOSAN/TRICALCIUM PHOSPHATE SPONGE ON BONE REPAIR IN CALVARIA DEFECTS", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on December 12, 2005.

Campinas, 17 de maio de 2007.

2ª. VIA

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Fátima Alonso
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP

RECEBEMOS
Depto. de Fisiologia e Periodontia
01/06/07
Rachida
13/05/07

CEEA/IB - Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP - Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
Telefax: (19) 3521-6356
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm>

Leitura das Lâminas

Lâmina	Comprimento do Defeito	Novo Osso	Chitosan Remanescente
DEFEITO 01			
1-16-2	7,4	0	1,42
1-18-2	7,46	0	0,3
1-20-2	7,09	0	0
1-22-5	7,63	0	1,1
1-24-6	7,16	0	1,12
DEFEITO 02			
2-8-006	5,9	3,82	
2-10-005	6,68	3,8	
2-12-003	6,92	3,79	
2-14-7	6,8	4,37	
2-16-7	6,45	3,71	
DEFEITO 03			
3-14-2	6,68	1,32	1,62
3-16-5	7,18	1,01	1,11
3-18-6	6,83	0,59	0,3
3-20-6	7,15	0,35	0
3-22-10	6,71	0,61	0
DEFEITO 04			
4-7-003	7,84	5,26	
4-9-004	7,96	7,77	
4-11-005	7,9	7,78	
4-13-4	7,6	7,55	
4-15-6	7,51	4,49	
DEFEITO 07			
7-9-002	7,31	0,56	2,81
7-11-002	7,15	0,97	2,85
7-13-2	7,9	0,46	1,17
7-15-2	7,57	0,7	2,47
7-17-1	7,6	0,78	3,83
DEFEITO 08			
8-14-2	7,34	6,66	
8-16-6	7,27	6,32	
8-18-8	7,68	6,97	
8-20-11	7,69	6,96	
8-22-12	7,36	7,17	

DEFEITO 09			
9-15-9	7,57	1,32	3,71
9-17-8	7,75	0,78	3,21
9-19-8	7,69	0,98	3,03
9-21-8	7,42	0,74	3,04
9-23-7	7,03	0,5	1,97
DEFEITO 10			
10-12-001	7,34	3,17	
10-14-3	7,45	2,17	
10-16-2	7,5	0,46	
10-18-1	7,63	1,27	
10-19-11	7,4	2,12	
DEFEITO 11			
11-10-002	6,8	0,86	5,13
11-12-003	6,79	0,41	5,21
11-14-4	6,82	0,53	5,17
11-16-002	6,59	0,5	4,17
11-18-002	6,75	0,59	3,92
DEFEITO 12			
12-10-001	6,59	1,5	
12-12-002	7,09	2,17	
12-14-4	7,53	3,34	
12-16-3	7,16	3	
12-18-3	6,87	3,67	
			#DIV/0!
DEFEITO 13			
13-7-004	7,8	0	2,02
13-9-002	7,95	0	2,59
13-11-001	7,95	0	1,35
13-13-5	7,78	0	2,59
13-15-5	7,48	0	2
DEFEITO 14			
14-9-001	7,68	3,42	
14-10-011	7,36	3,58	
14-12-009	7,74	5,68	
14-14-10	7,47	5,8	
14-16-9	7,46	5,99	
DEFEITO 15			
15-16-3	6,75	1,73	3,56
15-18-2	6,78	1,3	3,91
15-20-3	6,95	1,12	4,31
15-22-3	6,72	0,92	5,27
15-24-2	6,74	1,01	4,91

DEFEITO 16			
16-12-001	7,29	7,38	
16-14-1	7,21	6,15	
16-16-8	7,71	6,48	
16-18-2	7,38	6,83	
16-19-7	7,16	6,47	
DEFEITO 17			
17-12-009	6,92	0,65	2,35
17-14-8	6,85	0,18	2,65
17-16-8	7,5	0,37	1,8
17-18-8	7,72	0,56	4,02
17-20-9	6,84	0,3	2,53
DEFEITO 18			
18-8-010	7,06	6,85	
18-11-001	7,04	4,91	
18-12-011	7,65	5,62	
18-14-8	6,89	5,22	
18-16-8	6,4	4,18	
DEFEITO 19			
19-7-001	8,3	0,72	1,03
19-9-004	8,31	0,58	0,97
19-11-002	8,33	0,69	1,59
19-13-3	8,3	0,73	2,01
19-15-2	8,01	0,84	3,02
DEFEITO 20			
20-4-002	6,93	6,75	
20-6-001	7,31	7,12	
20-8-002	7,62	7,03	
20-10-001	7,42	6,75	
20-12-001	7,4	6,38	
DEFEITO 21			
21-7-002	7,62	0,37	3,46
21-8-012	7,91	0,7	1,86
21-10-011	7,46	0,31	2,4
21-12-010	7,89	0,88	2,63
21-14-11	7,66	0,78	4,18
DEFEITO 22			
22-7-010	7,81	4,03	
22-9-008	7,89	3,42	
22-11-007	7,62	3,69	
22-13-008	7,63	3,19	
22-15-010	7,19	2,86	

DEFEITO 23			
23-12-001	8,07	0	4,2
23-14-3	8,42	0	4,26
23-16-4	8,44	0	3,99
23-18-5	8,53	0,34	4,17
23-20-4	8,18	0	4,05
DEFEITO 24			
24-4-006	7,54	7,5	
24-6-002	7,65	7,57	
24-8-002	7,89	7,57	
24-10-002	8,09	7,56	
24-12-004	7,48	6,09	
DEFEITO 25			
25-14-002	6,88	0,52	3,86
25-16-001	7,45	0,78	3,6
25-17-12	7,62	0,42	4,74
25-19-9	7,89	0,45	5,59
25-21-7	7,74	0,58	5,03
DEFEITO 26			
26-13-9	7,42	6,85	
26-16-1	7,56	6,55	
26-17-10	7,54	6,23	
26-19-7	7,43	4,91	
26-21-7	7,5	5,14	
DEFEITO 27			
27-12-002	7,42	0,12	2,68
27-13-10	7,36	0,47	4,13
27-16-2	7,68	0	4,11
27-18-2	7,57	0	4,17
27-21-2	7,72	0	5,46
DEFEITO 28			
28-13-2	7,78	4,5	
28-15-2	7,01	1,15	
28-17-1	7,11	1,37	
28-18-10	7,04	1,11	
28-21-1	6,84	3,23	
DEFEITO 29			
29-17-11	7,01	1	0,91
29-19-8	7,21	1	1,46
29-21-8	6,74	0,87	1,66
29-23-9	6,89	1,05	1,2
29-25-10	6,39	1,61	1,43

DEFEITO 30

30-14-6	6,39	5,86
30-16-6	6,66	5,93
30-18-5	6,39	5,4
30-20-5	6,63	6,27
30-22-7	6,28	5,58

DEFEITO 31

31-16-9	8,56	1,07	2,08
31-18-9	8,51	1,12	3,25
31-20-9	8,54	1,08	1,97
31-22-8	8,25	0,27	3,86
31-24-8	7,87	0,51	1,11