



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM - FFOE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA - PPGO

**INFLUÊNCIA DA MASSA MOLAR NA BIOCOMPATIBILIDADE DE MEMBRANAS
DE QUITOSANA EM TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS**

JOSÉ CARLOS VIANA RIBEIRO

FORTALEZA
2017

JOSÉ CARLOS VIANA RIBEIRO

**INFLUÊNCIA DA MASSA MOLAR NA BIOCOMPATIBILIDADE DE MEMBRANAS
DE QUITOSANA EM TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da FFOE-UFC como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Odontologia. Área de concentração: Clínica Odontológica.

Orientador: Prof^a.Dra. Vilma Lima

FORTALEZA
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R1i RIBEIRO, JOSÉ CARLOS.
INFLUÊNCIA DA MASSA MOLAR NA BIOCOMPATIBILIDADE DE MEMBRANAS DE
QUITOSANA EM TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS / JOSÉ CARLOS RIBEIRO. – 2017.
101 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e
Enfermagem, Programa de Pós-graduação em Odontologia, Fortaleza, 2017.

Orientação: Profa. Dra. VILMA LIMA

1. Biomateriais. 2. Quitosana. 3. engenharia tecidual. 4. regeneração tecidual guiada. I.
Título.

CDD 617.6

JOSÉ CARLOS VIANA RIBEIRO

**INFLUÊNCIA DA MASSA MOLAR NA BIOCAMPATIBILIDADE DE MEMBRANAS
POROSAS DE QUITOSANA EM TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da FFOE-UFC como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Odontologia. Área de concentração: Clínica Odontológica.

Orientador: Prof^a.Dra. Vilma Lima

Aprovada em 31/01/2017

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Vilma Lima (orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr^a Denusa Moreira Veríssimo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a Dr^a Ana Cristina de Mello Fiallos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Natássia Albuquerque Ribeiro
Faculdades Nordeste (FANOR-DeVry)

Prof. Dr^a Luana Maria Castelo Melo Silva
Faculdades Nordeste (FANOR-DeVry)

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Jesus, meu porto seguro, meu Deus amoroso e fiel. Seu amor incondicional é a motivação que me impele a buscar ser uma pessoa melhor. A Ele ofereço este trabalho, em louvor e ação de graças.

À minha família, maior dom de Deus nessa vida. Meus grandes amores: minha esposa Irislene e meus filhos Luigi, Marília e Sabrina. Obrigado pela paciência e compreensão por tantas vezes que tive que abrir mão do nosso convívio para me dedicar a este trabalho. Vocês são meus maiores tesouros.

Aos meus pais, João e Lourdes, que na sua humildade e simplicidade souberam me ensinar que a riqueza maior desta vida está naquilo que não se compra: o amor, a esperança, a fé, o caráter e a dignidade.

A minha orientadora e amiga, Prof^a Dr^a Vilma Lima, por seu envolvimento e dedicação a este trabalho. Obrigado pela acolhida, pela paciência, pela boa vontade em transmitir seus conhecimentos e pelo incentivo em tantos momentos de adversidades. Este trabalho não teria sido possível sem sua grande colaboração.

Ao meu saudoso mestre e amigo, Prof. Dr. Marcus Aurélio Rabelo Lima Verde (*in memoriam*), por seu incentivo ao meu ingresso no doutorado, pela colaboração no desenvolvimento desse trabalho e, principalmente, por sua ternura, sabedoria e simplicidade, ensinamentos de vida que não serão esquecidos.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Vieira Silveira, pela imensa colaboração e participação decisiva neste trabalho, através da viabilização de todas as análises químicas. Obrigado pelas orientações científicas transmitidas sempre com muita paciência e solicitude.

Ao Departamento de Clínica Odontológica da FFOE, representado pelo atual coordenador Prof. Dr. Alexandre Simões Nogueira e pela ex-coordenadora Prof^a Dr^a Rosimary de Sousa Carvalho, e à Clínica Integrada de Odontologia, representada pelo Prof. Dr. Fábio Wildson Gurgel Costa e pela Prof^a Dr^a Thyciana Rodrigues

Ribeiro, por possibilitarem a flexibilização de meu horário de trabalho na Clínica Integrada para me dedicar às atividades do doutorado.

A Iracema Matos Melo e Bianca Moreira Kurita pela imensa colaboração nas análises imunohistoquímicas e nos experimentos com os animais no laboratório de Odontofarmacologia, além das incontáveis contribuições no dia-a-dia do laboratório, sempre com muita boa vontade e solicitude. Muito obrigado e Deus as abençoe.

A Paulo Goberlânio de Barros Silva pela valorosa contribuição com as análises histológicas e imunohistoquímicas e pela paciência e disponibilidade.

A Tereza Cristina Marques Forte e Marina Fiúza Sarte pela disponibilidade, presteza e esmero com que contribuíram nos experimentos de laboratório como bolsistas de iniciação científica. Muito obrigado. Desejo-lhes muito sucesso na vida profissional.

Ao Prof. Marcondes Jamacaru, por sua prestativa disponibilidade na correção ortográfica e gramatical deste trabalho.

Agradeço a todos os não citados aqui, que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho. Que Deus os abençoe.

RESUMO

A engenharia tecidual fundamenta-se na aplicação de conceitos da ciência dos materiais e da medicina regenerativa no intuito de desenvolver substitutos biológicos capazes de reconstruir ou regenerar tecidos danificados. Neste sentido, muitas pesquisas com biomateriais tem sido desenvolvidas nos últimos anos, e a quitosana (QS) tem despertado grande interesse como biomaterial para regeneração tecidual por suas alegadas propriedades de biocompatibilidade, biodegradação e facilidade de modificação de sua estrutura química. A QS é um polissacarídeo de origem natural, obtido a partir da quitina, uma fonte abundante e renovável. Apresenta grande variabilidade em suas principais características químicas como a massa molar (MM) e o grau de desacetilação (GD), que podem influenciar suas propriedades físicas e biológicas. Inúmeros estudos tem investigado seu uso como material de arcabouço (*scaffold*) na regeneração de diversos tipos de tecido, inclusive tecido ósseo e periodontal. No entanto, poucos estudos se referem à possível influência da MM da QS sobre sua biocompatibilidade *in vivo*, sendo este aspecto ainda não elucidado. O presente trabalho tem como objetivo investigar a biocompatibilidade e a bioatividade de membranas de QS de diferentes MMs quando implantadas no tecido subcutâneo de ratos. Membranas de QS de alto peso molecular (QS-APM) e baixo peso molecular (QS-BPM) foram caracterizadas quimicamente para determinar sua MM por cromatografia de permeação em gel (GPC) e seu GD por titulação potenciométrica. Em seguida, foram inseridas no tecido conjuntivo subcutâneo do dorso de 24 animais e comparadas com um controle positivo de carragenina-lambda ($CG\lambda$) e um controle negativo. A biocompatibilidade foi avaliada por análises histológicas do infiltrado inflamatório leucocitário, formação de tecido de granulação e formação de tecido conjuntivo fibroso após 1, 7, 14 e 28 dias. A bioatividade foi avaliada por análises imunohistoquímicas para identificar a expressão do fator de transcrição nuclear NF- κ B e do fator de crescimento de fibroblastos FGF-2, que são proteínas envolvidas no processo de inflamação e reparo tecidual. Os resultados mostraram que as membranas de quitosana induziram infiltrado leucocitário semelhante ao controle após 7, 14 e 28 dias e inferior ao controle positivo. A QS-BPM induziu maior formação de tecido de granulação e tecido conjuntivo fibroso que a QS-APM aos 7 e 14 dias e que a $CG\lambda$ aos 7, 14 e 28 dias e mostrou atividade inibitória sobre o NF- κ B

aos 7 dias. A QS-BPM ainda demonstrou maior atividade estimulatória sobre o FGF-2 que a QS-APM no primeiro dia. Os resultados sugerem que a QS-BPM induziu menor resposta inflamatória e favoreceu uma regeneração mais rápida do tecido conjuntivo que a QS-APM, embora ambas tenham se mostrado biocompatíveis. Pode-se concluir que a MM influenciou a biocompatibilidade e bioatividade da QS *in vivo* e essa característica deve ser considerada ao se desenvolver e investigar *scaffolds* à base de QS para regeneração tecidual. As membranas de quitosana avaliadas apresentam potencial de aplicação em regeneração tecidual guiada.

Palavras-chave: Biomateriais, quitosana, engenharia tecidual, regeneração tecidual guiada.

ABSTRACT

Tissue engineering is based on the application of concepts from materials science and regenerative medicine with the aim of developing biological substitutes capable of reconstructing or regenerating damaged tissue. In this context, a large number of research studies have been conducted in recent years into the use of biomaterials for tissue regeneration, and chitosan (CS) has aroused a great deal of interest as one such biomaterial on account of its alleged properties of biocompatibility, biodegradation and the ease with which its chemical structure may be modified. CS is a naturally occurring polysaccharide obtained from chitin, an abundant and renewable source. It demonstrates great variability in terms of its main chemical characteristics, such as molar mass (MM) and the degree of deacetylation (DD), which have an impact on its physical properties such as solubility and crystallinity, and biological properties such as biodegradation. Numerous studies have investigated its use as a scaffold material in the regeneration of various types of tissue, including bone and periodontal tissues. However, few studies have related the possible influence of the MM of CS on its biocompatibility *in vivo*; this aspect still has not been clarified. The aim of the present study is to investigate the biocompatibility and bioactivity of CS membranes of different MM when implanted in the subcutaneous tissue of rats. CS membranes with a high molecular weight (HMW-CS) and low molecular weight (LMW-CS) were chemically characterized to determine their MM via gel permeation chromatography (GPC) and DD via potentiometric titration. Next, they were inserted into the subcutaneous conjunctive tissue in the backs of 24 animals and compared to a positive λ -carrageenan(Cg λ) control and a negative control. Biocompatibility was evaluated through histological analyses of the inflammatory leukocyte infiltrate, formation of granulation tissue and of fibrous conjunctive tissue, after 1, 7, 14 and 28 days. Bioactivity was investigated through immunohistochemical analyses carried out to identify the expression of the nuclear transcription factor NF- κ B and the fibroblast growth factor FGF-2, which are proteins involved in the process of inflammation and tissue repair. The results showed that the chitosan membranes induced leukocyte infiltrate similar to the control after 7, 14 and 28 days, but lower than in the positive control. The LMW-CS induced a greater formation of granulation tissue and fibrous conjunctive tissue than HMW-CS, after 7 and 14 days, and than Cg λ after 7, 14 and 28 days, and showed inhibitory action on

NF- κ B at day 7. LMW-CS also showed a greater stimulatory effect than HMW-CS at day 1. The results suggest that LMW-CS induced a lower inflammatory response and promoted a faster regeneration of conjunctive tissue than HMW-CS, though both were found to be biocompatible. It may be concluded that MM influenced CS biocompatibility *in vivo* and this characteristic should be taken into consideration when developing and investigating CS-based scaffolds for tissue regeneration. The evaluated CS membranes presents a potential application for guided tissue regeneration.

Keywords: Biomaterials, chitosan, tissue engineering, guided tissue regeneration.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática da via de sinalização do NF- κ B	20
Figura 2 - Estrutura química da quitosana.....	21
Figura 3 - Unidades estruturais da quitosana.....	23
Figura 4 - Cromatógrafo de permeação em gel do Núcleo de Pesquisas em Lubrificantes (NPL) da UFC	33
Figura 5 - Membranas de quitosana acondicionadas para esterilização.....	34
Figura 6 - Representação esquemática dos procedimentos de análise da biocompatibilidade	37
Figura 7 - Distribuição das membranas no dorso dos ratos	38
Figura 8 - Sequência fotográfica dos procedimento cirúrgicos	39
Figura 9 - Aspecto macroscópico do tecido subcutâneo excisado para observação macroscópica	39
Quadro1- Critérios de avaliação dos parâmetros histológicos	41
Figura 10-Curvas de titulação potenciométrica e sua derivada primeira para QS-APM.....	46
Figura 11-Curvas de titulação potenciométrica e sua derivada primeira para QS-BPM.....	46
Figura 12 - Curvas cromatográficas da QS-APM e padrão de dextrana	48
Figura 13 - Curvas cromatográficas da QS-BPM e padrão de dextrana	48
Figura 14 - Aspecto macroscópico dos tecidos na região da implantação das membranas e nos sítios controle	50
Figura 15 - Curso temporal de infiltração leucocitária em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos.....	52
Figura 16 - Curso temporal de presença de tecido de granulação em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos	54
Figura 17 - Curso temporal de presença de tecido fibroso no conjuntivo subcutâneo de ratos	55
Figura 18 - Fotomicrografias do grupo controle	56
Figura 19 - Fotomicrografias do grupo QS-BPM	57
Figura 20 - Fotomicrografias do grupo QS-APM	58
Figura 21 - Fotomicrografias do grupo CG λ	59
Figura 22 - Curso temporal da imunomarcagem citoplasmática de NF κ B	60

Figura 23 - Curso temporal da imunomarcação nuclear de NFkB	61
Figura 24 - Rela�o imunomarcação nuclear/citoplasmática para NFkB.....	61
Figura 25 - Fotomicrografias de campos representativos do grupo controle para imunomarcação de NF-kB	62
Figura 26 - Fotomicrografias de campos representativos do grupo QS-BPM para imunomarcação de NF-kB	63
Figura 27 - Fotomicrografias de campos representativos do grupo QS-APM para imunomarcação de NF-kB	64
Figura 28 - Curso temporal da imunomarcação para FGF-2	65
Figura 29 - Fotomicrografias de campos representativos de imunomarcação para FGF-2	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	Complexo avidina-biotina
Ac	Anticorpo
ANOVA	Análise de variância
BSA	Albumina de soro bovino
CEPA	Comissão de ética em pesquisa animal
CG λ	Carragenina lambda
DAB	3,3-Diaminobenzidina
EPM	Erro padrão da média
ET	Engenharia tecidual
FB	Fibroblastos
FC	Fibrócitos
FGF-2	Fator de crescimento de fibroblatos-2
FGF-b	Fator de crescimento de fibroblastos básico
FGF-R	Receptor do fator de crescimento de fibroblastos
GAG	Glicosaminoglicana
GD	Grau de desacetilação
GPC	Cromatografia de permeação em gel
GPSA	Grupo de pesquisas em separações por adsorção
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HA	Hidroxiapatita
HCl	Ácido clorídrico
HE	Hematoxilina e eosina
ICAM1	Molécula de adesão intercelular 1
IHQ	Imunohistoquímica
I κ B	Inibidor <i>kappa-beta</i>
I κ K	Proteína-quinase do inibidor <i>kappa-beta</i>
IL-1	Interleucina-1
IP	Índice de polidispersividade
LPS	Lipopolissacarídeo
MEC	Matriz extracelular
MEV	Microscopia eletrônica de varredura

MF	Macrófagos
MM	Massa molar
MN	Leucócitos mononucleares
M_n	Massa molar numérica
M_w	Massa molar ponderal
NaOH	Hidróxido de sódio
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear <i>kappa-beta</i>
NH ₂	Grupo amino
NH ₃ ⁺	Grupo amino protonado
OH	Grupo hidroxila
PBS	Tampão fosfato-salino
PGA	Ácido poliglicólico
PGLA	Ácido poliglicólico-láctico
PM	Peso molecular
PMN	Leucócitos polimorfonucleares
QS	Quitosana
QS-APM	Quitosana de alto peso molecular
QS-BPM	Quitosana de baixo peso molecular
TCF	Tecido conjuntivo fibroso
β -TCP	Beta-fosfato tricálcico
TGF- β	Fator de crescimento transformador-beta
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
UFC	Universidade Federal do Ceará
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
1.1.	Biomateriais em Engenharia Tecidual	15
1.2.	Biocompatibilidade	16
1.3.	Quitosana	21
2.	JUSTIFICATIVA	28
3.	HIPÓTESE	29
4.	OBJETIVOS	30
5.	MATERIAL E MÉTODOS	31
5.1.	Caracterização da quitosana	31
5.1.1.	Determinação do grau médio de desacetilação	31
5.1.2.	Determinação da massa molar	32
5.2.	Obtenção das membranas	33
5.3.	Avaliação da biocompatibilidade	35
5.3.1.	Animais	35
5.3.2.	Procedimento cirúrgico	37
5.3.3.	Aspecto macroscópico	40
5.3.4.	Análises histológicas	40
5.3.5.	Análise imunohistoquímica	42
5.4.	Análise estatística	43
6.	RESULTADOS	45
6.1.	Caracterização das membranas	45
6.1.1.	Grau médio de desacetilação (GD)	45
6.1.2.	Determinação da massa molar (MM)	47
6.2.	Avaliação da biocompatibilidade	49

6.2.1. Aspecto macroscópico	49
6.2.2. Análises histológicas	51
6.2.3. Análises imunohistoquímicas	60
7. DISCUSSÃO	67
8. CONCLUSÃO	84
REFERÊNCIAS	85
APÊNDICE A	97
APÊNDICE B	98
ANEXO A	99
ANEXO B	100

1. INTRODUÇÃO

1.1. Biomateriais em Engenharia Tecidual

A engenharia tecidual é um emergente campo da pesquisa científica, de natureza multidisciplinar, que abrange os princípios fundamentais da engenharia dos materiais e da medicina regenerativa no intuito de desenvolver substitutos biológicos para tecidos e órgãos danificados. Diferentemente das abordagens tradicionais de tratamento de perdas teciduais, como transplantes, reconstruções cirúrgicas ou implante de materiais bioinertes, em engenharia tecidual (ET) busca-se substitutos biológicos que interajam e induzam a formação de novos tecidos funcionais, restaurando, mantendo ou mesmo melhorando a função tecidual. Este processo de regeneração baseia-se em três pilares principais: a presença de células vivas, responsáveis pela síntese da matriz do novo tecido, biomoléculas sinalizadoras, como peptídeos e fatores de crescimento, que promovem a atividade celular, e um biomaterial que propicie um ambiente favorável para a adesão, proliferação e diferenciação celular, atuando como um arcabouço para o novo tecido (LANGER e VACANTI, 1993; SALGADO *et al.*, 2004; LANZA *et al.*, 2014).

O conceito de biomaterial ideal tem mudado dramaticamente nas últimas décadas. Os materiais de primeira geração, como os cimentos ósseos, aço inoxidável, náilons e poliésteres, eram considerados satisfatórios por serem bioinertes, apresentarem resistência adequada e desempenho funcional compatível com o tecido nativo. Atualmente, com o advento da engenharia tecidual, os biomateriais considerados ideais devem apresentar propriedades bioativas ou bioindutoras, ou seja, devem interagir com os tecidos onde são inseridos, melhorando sua capacidade regenerativa (WILLIAMS, 2009; KEANE e BADYLAK, 2014).

Todo tecido é constituído basicamente de células, fluidos orgânicos e uma matriz extracelular (MEC). Esta matriz é uma estrutura sintetizada pelas próprias células, e composta de macromoléculas, como glicoproteínas, glicosaminoglicanas e peptídeos, entremeadas por fibras de colágeno e elastina. A MEC provê o suporte sobre o qual as células se fixam, interagem e se organizam, propiciando o microambiente e a arquitetura específica para o crescimento, a proliferação e a diferenciação celular. Além disso, a MEC funciona como um reservatório de água,

nutrientes e fatores de crescimento, que são essenciais às células (ZEINALI *et al.*, 2014; CHEN e THOUAS, 2015a). Nesse sentido, quando se deseja regenerar um tecido, é necessária a presença de uma estrutura que atue como uma matriz temporária para a proliferação celular e a deposição de matriz extracelular, até que o tecido seja regenerado. Assim, os biomateriais indicados como arcabouços, conhecidos na literatura pelo termo em inglês *scaffolds*, devem atuar como uma MEC temporária, desempenhando três funções principais: (1) provendo a infraestrutura tridimensional que permita a formação do novo tecido, inclusive favorecendo sua vascularização; (2) preenchendo o espaço do defeito tecidual, impedindo assim a proliferação de outros tecidos enquanto ocorre a regeneração tecidual desejada e (3) liberando fatores de crescimento ou diferenciação presentes em sua estrutura, participando ativamente do processo regenerativo (SALGADO *et al.*, 2004; DVIR *et al.*, 2011). Para tanto, os *scaffolds* em ET devem apresentar uma estrutura transitória que sofra uma biodegradação gradativa, em um espaço de tempo compatível com a velocidade de formação do novo tecido, permitindo que o tecido regenerado o substitua. Assim, precisam apresentar algumas características essenciais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, capacidade de formar estruturas tridimensionais porosas e resistência mecânica adequada. (KEANE e BADYLAK, 2014; RODRIGUEZ-VAZQUEZ *et al.*, 2015)

1.2. Biocompatibilidade

A biocompatibilidade é considerada o principal requisito de um biomaterial. Chen e Thouas (2015) afirmam que o conceito de biomaterial está diretamente relacionado com sua biocompatibilidade, sendo definido como qualquer material compatível com um sistema vivo e que possa ser aplicado em íntimo contato com os tecidos. A biocompatibilidade pode ser definida como a habilidade de um material em desempenhar uma função específica em um organismo vivo, sem induzir uma resposta no hospedeiro que cause algum dano mensurável (CHEN e THOUAS, 2015a). No campo da ET, a biocompatibilidade refere-se à capacidade de um biomaterial (*scaffold*) em desempenhar a função de um substrato que permita o suporte apropriado para células e moléculas bioativas de forma a otimizar a

regeneração tecidual, sem induzir nenhuma resposta local ou sistêmica indesejável no hospedeiro (WILLIAMS, 2008). A avaliação da biocompatibilidade de um biomaterial pode ser feita *in vitro* em cultura de células (citocompatibilidade) ou *in vivo*, em animais, e visa mensurar a resposta celular ou tecidual ao contato com o material.

A inserção de um biomaterial em um tecido vivo induz, independentemente do tipo de material, uma resposta inflamatória. A inflamação é um processo complexo, induzido por estímulos exógenos e endógenos, que se inicia no tecido conjuntivo vascularizado e se caracteriza como uma resposta protetora do organismo contra lesões celulares e teciduais, visando eliminar, diluir ou isolar a causa da lesão e iniciar o processo de reparo dos danos teciduais (KUMAR *et al.*, 2005a; ZEINALI *et al.*, 2014). Quando se trata da aplicação de biomateriais, a resposta inflamatória pode ser consequência da lesão tecidual pré-existente, do procedimento cirúrgico de implantação e da presença do próprio biomaterial em si. Em decorrência da lesão vascular inicial, plaquetas são ativadas e liberam fatores de coagulação que iniciam a formação de um coágulo de fibrina provisório, o qual provê um substrato propício para a migração e adesão celular ao local da lesão tecidual. Além das plaquetas, as células residentes do tecido conjuntivo, como macrófagos e mastócitos, liberam moléculas sinalizadoras (citocinas e quimiocinas) que promovem o recrutamento de células inflamatórias do sangue para o tecido lesionado, sobretudo os neutrófilos, que são leucócitos polimorfonucleares (PMN), as células mais características da inflamação aguda. Estes eventos se iniciam desde minutos até horas após a implantação do biomaterial. Os neutrófilos atuam fagocitando fragmentos do biomaterial, bactérias ou restos celulares que possam estar presentes, e também liberando citocinas que recrutam macrófagos para o local da inflamação. Geralmente, a inflamação aguda se resolve nos primeiros cinco a sete dias, sendo os neutrófilos gradativamente substituídos por macrófagos, que predominam a partir de sete dias, juntamente com linfócitos, caracterizando a inflamação crônica, e podem permanecer por semanas, dependendo da extensão da lesão e da biocompatibilidade do biomaterial (ANDERSON, COOK, *et al.*, 2004; KUMAR *et al.*, 2005a).

Os macrófagos são consideradas as células efetoras por excelência do processo inflamatório. Dentre suas múltiplas atividades, os macrófagos atuam

fagocitando e removendo os restos de neutrófilos que sofreram apoptose e liberando citocinas e quimiocinas, como as interleucinas 1 e 8 (IL1 e IL8) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α , do inglês *tumor necrosis factor- α*), que induzem alterações vasculares, recrutam mais leucócitos e modulam diversas vias do processo inflamatório, como a via do fator de transcrição nuclear kappa-beta (NF- κ B, do inglês *nuclear factor kappa-beta*) (MESQUITA JR *et al.*, 2008). O NF- κ B é um importante regulador da produção da maioria das citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e de moléculas de adesão, tendo papel fundamental nas fases aguda e crônica do processo inflamatório (BLANCO e NETO, 2003). À medida que a inflamação evolui favoravelmente, macrófagos e linfócitos passam a liberar ou estimular a produção de fatores de crescimento, como por exemplo os fatores de crescimento de fibroblastos (FGF, do inglês *fibroblasts growth factors*) que estimulam a fase proliferativa da inflamação, a qual envolve a proliferação, a diferenciação e a atividade de fibroblastos, a neoformação vascular (angiogênese), a deposição de nova MEC e a formação de tecido de granulação (DETILLIEUX *et al.*, 2003). Este último, formado pela proliferação de fibroblastos e células endoteliais vasculares, é considerado essencial no processo regenerativo. A fase regenerativa inicia-se após a deposição de significativa quantidade de nova MEC rica em colágeno, que favorece a adesão e proliferação de células, como fibroblastos e células específicas do tipo de tecido envolvido, resultando em reparo cicatricial (fibrose) ou regeneração tecidual (BROWN e BADYLAK, 2014). Portanto, inflamação e reparo são consideradas fases distintas de um mesmo processo e a biocompatibilidade de um material pode ser mensurada pela intensidade e duração de cada uma dessas fases.

Quanto mais se prolonga a permanência de neutrófilos, macrófagos e a persistência da inflamação crônica, com agrupamento de macrófagos formando as chamadas células gigantes multinucleadas, que caracterizam a reação de corpo estranho, menos biocompatível será o biomaterial. Por outro lado, quanto mais precocemente se iniciam as fases proliferativa e regenerativa da inflamação, com maior formação de tecido de granulação e fibrose, maior será a biocompatibilidade do material. Assim, a biocompatibilidade pode ser avaliada, ao nível celular, pela mensuração de parâmetros como infiltrado de células inflamatórias, formação de tecido de granulação e formação de tecido fibroso (WILLIAMS, 2008). O infiltrado leucocitário está relacionado com a biocompatibilidade, pois indica a intensidade e a duração da resposta inflamatória celular, nas suas fases aguda e crônica. O tecido

de granulação está relacionado à fase proliferativa do processo inflamação-reparo, sendo considerado um indicativo da proliferação de fibroblastos e células endoteliais vasculares, estando diretamente associado à biocompatibilidade do material. O tecido fibroso representa a fase regenerativa do processo inflamação-reparo, com deposição de MEC e fibras colágenas pelos fibroblastos, sendo também indicativo da biocompatibilidade do material em tecido conjuntivo. Ao nível molecular, a análise da expressão de NF- κ B pode indicar a intensidade do processo inflamatório agudo e crônico desencadeado pelo biomaterial, enquanto a expressão de FGF seria um indicativo das fases proliferativa e regenerativa do processo de reparo (ANDERSON, COOK, *et al.*, 2004; BROWN e BADYLAK, 2014; CHEN e THOUAS, 2015c).

O NF- κ B é um fator regulador da transcrição gênica que está envolvido na produção de diversas citocinas inflamatórias, sendo considerado como um dos mais importantes reguladores da expressão de genes pró-inflamatórios. Ele está presente no citoplasma da maioria das células animais em sua forma inativa, como um trímero composto por duas proteínas, identificadas como p-50 (com PM de 50 kDa) e Rel-A ou p-65 (com PM de 65 kDa), ligadas a uma proteína inibitória denominada Inibidor *kappa-beta* (I κ B), que impede sua ativação. Mediante estímulos inflamatórios, como uma lesão ou agressão bacteriana, que desencadeiam a liberação de citocinas ou lipopolissacarídeos (LPS) da membrana de bactérias, o I κ B é fosforilado pela enzima I κ B-quinase (I κ K) e degradado, ativando o NF- κ B que migra para o núcleo celular e atua na transcrição gênica de diversas citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas 1, 2, 6, 8 e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), e de moléculas de adesão como a E-selectina e a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1, do inglês *intercellular adhesion molecule-1*) que atuam no processo de migração de leucócitos dos vasos para os tecidos (Figura 1) (BLANCO e NETO, 2003; WU e TSAI, 2007; LI *et al.*, 2014).

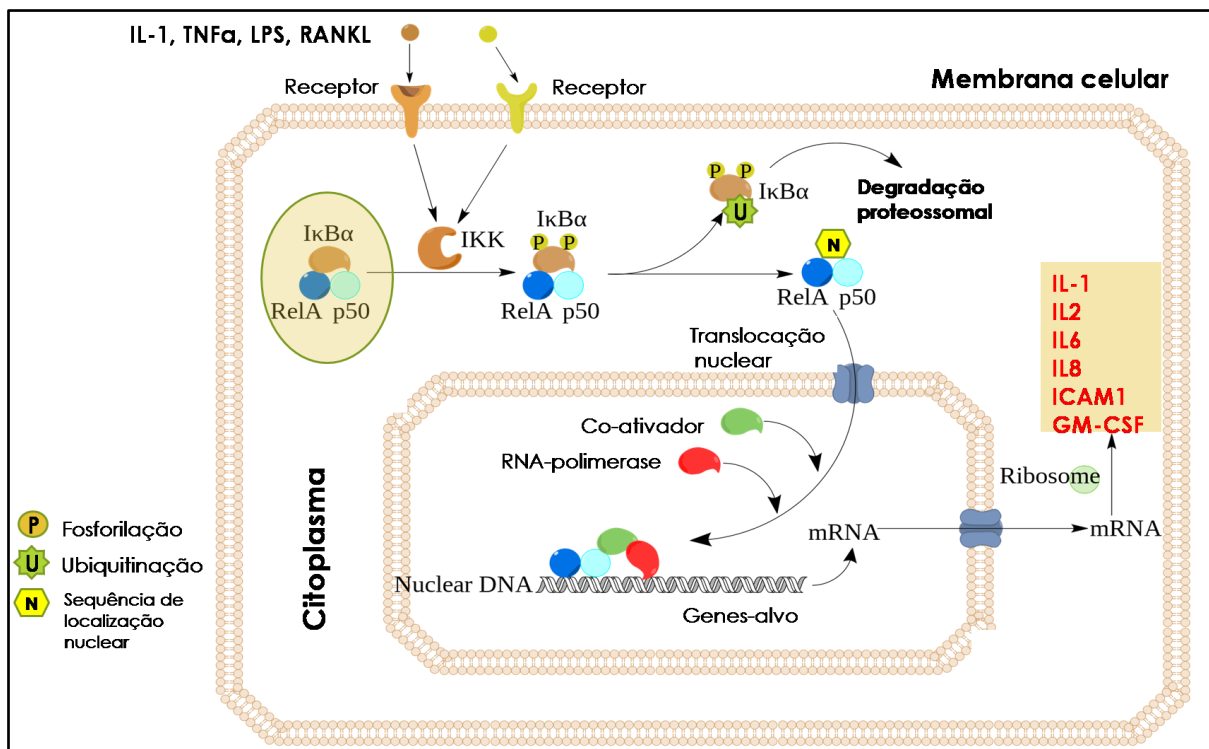


Figura 1: Representação esquemática simplificada da via de sinalização do NF- κ B: a interação de proteínas (citocinas IL1 e TNF α , e LPS bacterianos, com os receptores de membranas ativam a I κ B-quinase (IKK) que fosforilam o I κ B α , levando a sua ubiquitinação e degradação. Assim, as proteínas Rel-A e p50 interagem, manifestando as sequências de localização nuclear que induzem sua translocação para o núcleo, onde interage com o DNA nuclear, levando a transcrição dos genes responsáveis pela síntese de mediadores pró-inflamatórios, como IL1, IL2, IL6, IL8, ICAM1e GM-CSF. (Adaptado de <https://pt.wikipedia.org/wiki/NF-κB>)

O FGF-2, também conhecido como FGF básico (FGF-b), é uma das proteínas pertencentes à família dos fatores de crescimento de fibroblastos, que compreende no mínimo 18 proteínas homólogas que se ligam aos receptores de FGF (FGF-R). Dentre estes fatores, o FGF-2 é considerado um dos principais, estando bem caracterizado, sendo inclusive disponível comercialmente na indústria farmacêutica como FGF-2 humano recombinante (rh-FGF-2). O FGF-2 é reconhecido como um potente modulador da proliferação, mobilidade e diferenciação de fibroblastos, estimulador da produção de colágeno e da neoformação vascular (angiogênese), estando intimamente relacionado com a formação de tecido de granulação e de tecido conjuntivo fibroso e, por consequência, com as fases proliferativa e regenerativa do processo inflamação-reparo (DETILLIEUX *et al.*, 2003; MASUOKA *et al.*, 2005; JEAN *et al.*, 2009; WOODBURY e IKEZU, 2014).

1.3. Quitosana

Os materiais comumente utilizados em regeneração tecidual podem ser divididos em três grupos principais: as cerâmicas reabsorvíveis de cálcio e fosfato, como hidroxiapatita (HA) e o beta-tricálcio fosfato (β -TCP), utilizadas em regeneração óssea; os polímeros sintéticos, como o ácido poliglicólico (PGA) e ácido poliglicólico-láctico (PGLA), e os polímeros biodegradáveis de origem natural, como o colágeno, o ácido hialurônico, a gelatina e a quitosana (HUTMACHER, 2000; LEONG *et al.*, 2003; SALGADO *et al.*, 2004; DHANDAYUTHAPANI *et al.*, 2011).

A quitosana é um polissacarídeo com estrutura química composta por monômeros de β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-desoxi-D-glicose e β -(1 \rightarrow 4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glicose. Apresenta cadeia polimérica linear composta por unidades de *N*-acetil-*D*-glicosamina (*m*) e *D*-glicosamina (*n*) unidas por ligações glicosídicas (Figura 2). Ela é obtida a partir da quitina, por meio da reação de desacetilação em meio alcalino. A quitina, por sua vez, é um polímero encontrado no exoesqueleto de crustáceos, moluscos e insetos e na parede celular de fungos, sendo considerado o segundo polímero mais abundante na natureza (DI MARTINO *et al.*, 2005; RINAUDO, 2006).

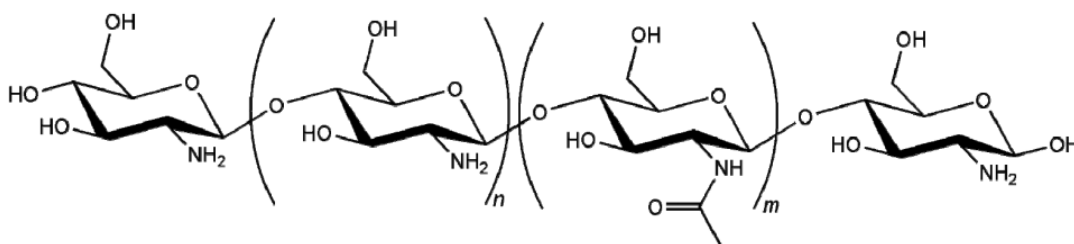


Figura 2 - Estrutura química da quitosana. Os índices *n* e *m* podem assumir diferentes proporções (RODRIGUES *et al.*, 2012)

A proporção de grupos *D*-glicosamina na cadeia polimérica, que representa o grau de desacetilação, é variável, sendo que a quitosana é considerada como tal quando a desacetilação é superior a 50% (SHI *et al.*, 2006; BALDRICK, 2010). A quitosana (QS) apresenta uma estrutura química semelhante ao ácido hialurônico presente na matriz extra-celular. Nesta estrutura, existem três

grupamentos funcionais reativos: uma amina (NH_2) e duas hidroxilas (OH). Estes grupamentos, sobretudo a amina presente na unidade monomérica glicosamina, conferem à QS uma natureza catiônica devido à protonação da amina (NH_3^+) em meio ácido (KIM, I. Y. *et al.*, 2008). A QS é considerada o único polissacarídeo natural que atua como um polieletrólito catiônico de alto peso molecular, enquanto os demais polissacarídeos são neutros ou aniônicos (BELLICH *et al.*, 2016). Esta natureza peculiar propicia à QS uma grande afinidade por biomoléculas aniônicas como o ácido siálico, o ácido sulfônico e as glicosaminoglicanas (GAGs), presentes abundantemente nas secreções mucosas e na MEC. Através de interações iônicas, a QS apresenta a capacidade de se ligar aos tecidos mucosos, denominada mucoadesividade (SOGIAS *et al.*, 2008; BERNKOP-SCHNURCH e DUNNHAUPT, 2012). Esta propriedade é de grande interesse em ET, pois a possibilidade de se utilizar um *scaffold* que interaja com as GAGs e proteoglicanas dos tecidos pode facilitar a incorporação de citocinas e fatores de crescimento teciduais uma vez que um grande número destes fatores estão ligados às GAGs (MADIHALLY e MATTHEW, 1999; DI MARTINO *et al.*, 2005). De fato, a quitosana tem demonstrado interagir com fatores de crescimento como o FGF e fatores derivados de plaquetas, de forma semelhante ao heparan sulfato, outra GAG presente na MEC do tecido conjuntivo (WELTROWSKI *et al.*, 2012; BUSILACCHI *et al.*, 2013; KUMOREK *et al.*, 2016)

A semelhança química com o ácido hialurônico e outros polissacarídeos constituintes das GAGs, como o sulfato de condroitina, conferem à QS uma afinidade com a MEC, o que sugere uma bioatividade e a torna um material atrativo para aplicação como *scaffold* em ET, podendo desempenhar um papel de análogo da MEC na regeneração de tecidos (PENICHE *et al.*, 2007; TANGSADTHAKUN *et al.*, 2007) (Figura 3). Esta semelhança também favorece sua biodegradação. Através da ação enzimática da lisozima (presente nas superfícies mucosas) e quitinases (produzidas no intestino) a quitosana é facilmente decomposta em oligossacarídeos atóxicos, os chamados quito-oligossacarídeos, que são incorporados nas vias metabólicas das GAGs e glicoproteínas, sendo considerados como unidades de construção na síntese do hialuronato, que é essencial na adesão e proliferação celular (MUZZARELLI, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2012).

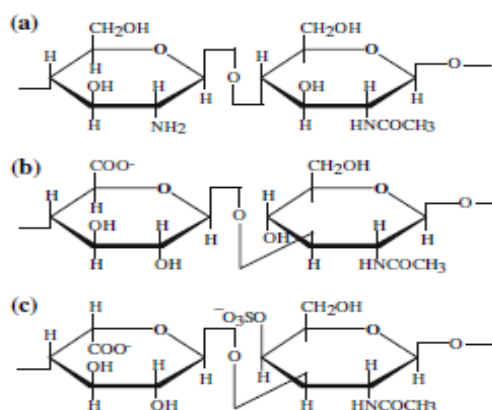


Figura 3: Unidades estruturais da quitosana (a), do hialuronato (b) e do sulfato de condroitina (c), mostrando grandes similaridades entre si (PENICHE *et al.*, 2007).

As características físico-químicas e biológicas peculiares da QS têm motivado inúmeros estudos que investigaram sua aplicação como *scaffold* em regeneração tecidual (LIAO *et al.*, 2012; SEONWOO *et al.*, 2013; JIA *et al.*, 2014; REVI *et al.*, 2014; D'MELLO *et al.*, 2015; DENOST *et al.*, 2015). Biocompatibilidade, biodegradabilidade, muco-adesividade, ausência de toxicidade, capacidade de formar estruturas tridimensionais porosas, facilidade de manipulação e baixo custo são algumas das vantagens mencionadas pelos autores que apontam a QS como um biomaterial adequado e de grande potencial de aplicação em ET. Somado a isso, sua obtenção a partir de fontes abundantes, renováveis e que são descartadas como subprodutos da indústria alimentícia, faz com que a quitosana seja considerada de grande potencial econômico e ambiental (RODRIGUEZ-VAZQUEZ *et al.*, 2015; YOUNES e RINAUDO, 2015; BELLICH *et al.*, 2016).

A reatividade da QS e sua natureza polieletrólítica possibilita o seu processamento em diversas formas, tais como hidrogéis, filmes, membranas, nanofibrilas, esponjas e microesferas, e ainda permite a modificação de sua estrutura química pela substituição de seus grupamentos funcionais, formando copolímeros de QS com outros biomateriais sintéticos ou naturais, as chamadas blends poliméricas, ou com cerâmicas de cálcio e fosfato (RINAUDO, 2006; DE FAVERE e HINZE, 2009; LEVENGOOD e ZHANG, 2014; WANG *et al.*, 2016). Estas modificações permitem modular as características da QS, como solubilidade, biodegradabilidade e resistência, conforme o tipo de tecido a se regenerar (LI *et al.*, 2012; BIAZAR e KESHEL, 2013; BRUN *et al.*, 2014; LEVENGOOD e ZHANG, 2014;

AHAMED *et al.*, 2015).

O processamento da quitosana através da criodessecação ou liofilização possibilita a obtenção de membranas ou esponjas com porosidade variável, boa estabilidade e resistência mecânica. Este processo, muito utilizado na indústria alimentícia e farmacêutica, consiste no congelamento e desidratação sob condições de baixa temperatura e baixa pressão, permitindo a eliminação da água por sublimação e preservando a microestrutura do material. Embora seja considerada um processo simples, a liofilização é bastante sensível pois depende de diversas variáveis como a taxa de congelamento, a taxa de sublimação, a temperatura, o tempo e a pressão. Esses parâmetros determinam as características microestruturais do material liofilizado, como, por exemplo, sua porosidade (MADHALLY e MATTHEW, 1999; ZHOU *et al.*, 2014).

As membranas representam uma das formas mais largamente utilizadas da quitosana nos estudos de regeneração tecidual em animais, tendo sido empregadas com sucesso na regeneração de tecido ósseo (JIANG *et al.*, 2013; CARIDADE *et al.*, 2015; LAI *et al.*, 2015), tecido cutâneo (SARKAR *et al.*, 2013; ZEINALI *et al.*, 2014), tecido nervoso (SIMOES *et al.*, 2011; LIAO *et al.*, 2012) e outros. Em Odontologia, as membranas reabsorvíveis, sobretudo à base de colágeno, são amplamente utilizadas clinicamente na regeneração tecidual guiada (RTG) e regeneração óssea guiada (ROG) em Periodontia e Implantodontia. Nestas técnicas, a membrana deve atuar como uma barreira física à proliferação de células do tecido epitelial, mantendo o espaço e o microambiente favorável à proliferação e diferenciação de células progenitoras dos tecidos de interesse, como o ligamento periodontal, o cemento e o osso alveolar (BOSSHARDT e SCHENK, 2010; BUSER, 2010; QASIM *et al.*, 2017). Apesar de sua excelente biocompatibilidade, as membranas de colágeno apresentam rápida biodegradação e baixa resistência mecânica, o que limita sua aplicabilidade (ARPORNMAEKLONG *et al.*, 2008; BORNSTEIN *et al.*, 2010). Assim, membranas de QS, com seu potencial de bioatividade e possibilidade de modulação de sua biodegradação, representam uma interessante alternativa de aplicação para RTC e ROG (TANGSADTHAKUN *et al.*, 2007; ARPORNMAEKLONG *et al.*, 2008; MOTA *et al.*, 2012; QASIM *et al.*, 2017). Alguns trabalhos demonstraram a efetividade de scaffolds à base de QS na regeneração do ligamento periodontal e osso alveolar em animais (PANG *et al.*,

2005; MIRANDA *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2016) e humanos (AKNCBAY *et al.*, 2007).

A literatura demonstra, com uma grande quantidade de estudos nos últimos cinco anos, a versatilidade da quitosana como biomaterial para regeneração tecidual, sendo investigada como *scaffold* em vários estudos pré-clínicos de bioengenharia de diversos tipos de tecido, principalmente em tecido ósseo (KANG *et al.*, 1999; HOWLING *et al.*, 2001; GUAY *et al.*, 2004; YUAN *et al.*, 2004; KIM, K. S. *et al.*, 2008; VIEIRA, 2008; CHEN, J. *et al.*, 2011; MIRANDA *et al.*, 2011; NIU *et al.*, 2011; COSTA-PINTO *et al.*, 2012; GARG *et al.*, 2012; HOU *et al.*, 2012; MIRANDA *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2012; FLORCZYK *et al.*, 2013; JIANG *et al.*, 2013; WHU *et al.*, 2013; HAN *et al.*, 2014; JIA *et al.*, 2014; JI *et al.*, 2015; SHALUMON *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2015), tecido cutâneo (GUO *et al.*, 2011; SIMOES *et al.*, 2011; TCHEMTCHOUA *et al.*, 2011; SUNDARAMURTHI *et al.*, 2012; VELEIRINHO *et al.*, 2012; SARKAR *et al.*, 2013; REVI *et al.*, 2014; ZEINALI *et al.*, 2014; AHAMED *et al.*, 2015; DENOST *et al.*, 2015), tecido nervoso (CHEN, X. *et al.*, 2011; WEI *et al.*, 2011; XUE *et al.*, 2012; XIAO *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2016), tecido cartilaginoso (ZHANG e NEAU, 2001; DENG *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2014; AHAMED *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2015), tecido periodontal (ZANG *et al.*, 2014; JIANG *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2016), tecido vascular (ZHOU *et al.*, 2014), tecido mamário (GUPTA *et al.*, 2011), tecido colorretal (DENOST *et al.*, 2015) e tecido da membrana timpânica (SEONWOO *et al.*, 2013). No entanto, há uma grande heterogeneidade na literatura quanto às características físico-químicas das quitosanas utilizadas nos estudos, sobretudo quanto ao grau de desacetilação e massa molar.

O grau de desacetilação (GD) e a massa molar (MM) são considerados os dois principais parâmetros utilizados para caracterização da QS. O GD representa a proporção, expressa em percentual, de grupos amino (-NH₂), denominados unidades de *D*-glicosamina, em relação ao tamanho total cadeia polimérica. A MM, também conhecida como peso molecular (PM) de um polímero, refere-se à massa total de uma cadeia polimérica, expressa em gramas/mol (g/mol), Daltons(Da) ou quilodaltons (kDa) (EBEWELE, 2000). Estas duas propriedades dependem fundamentalmente das condições empregadas nas etapas de obtenção da QS, desde o processamento da quitina até o seu preparo e purificação. Como a QS pode ser obtida de diferentes origens, existe uma grande variabilidade nas suas

características físico-químicas. Nas formas de apresentação comercialmente disponíveis, o GD pode variar de 40% a 98% enquanto a MM pode apresentar valores desde 50 kDa até 2000 kDa (ILLUM, 1998; BALDRICK, 2010). Segundo a classificação proposta por Wong (2009), a QS pode apresentar baixo peso molecular (MM menor que 150 kDa), médio peso molecular (MM de 150 kDa a 700 kDa) e alto peso molecular (MM maior que 700 kDa) (WONG, 2009).

A MM e o GD têm influência determinante sobre outras características da QS. De acordo com Suphasitroj *et al.* (2009), todas as demais propriedades físico-químicas da QS dependem fundamentalmente destes dois parâmetros. Assim, características essenciais como solubilidade, cristalinidade, absorção de água, resistência mecânica e constante de ionização (pKa) seriam afetadas pela MM da QS (PRASHANTH *et al.*, 2002; MUCHA *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2006; RODRIGUEZ-VAZQUEZ *et al.*, 2015). Uma vez que algumas destas características afetariam também propriedades biológicas da QS, como susceptibilidade à degradação enzimática, atividade anti-microbiana e biodegradação, alguns autores sugerem que a MM teria influência sobre a biocompatibilidade da quitosana (DI MARTINO *et al.*, 2005; AMARAL *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2016). Estudos na literatura apontam para uma relação inversa entre a velocidade de degradação da QS *in vitro* e os valores de MM e GD (ZHANG e NEAU, 2001; LI *et al.*, 2007; TANGSADTHAKUN *et al.*, 2007), embora outros autores tenham observado resultados divergentes, com aumento da taxa de biodegradação em função do aumento no peso molecular (HSU *et al.*, 2004).

No que diz respeito à influência da MM sobre a biocompatibilidade da QS, existem poucos estudos na literatura sobre o assunto, com resultados inconclusivos. Enquanto alguns autores demonstram haver um aumento na citocompatibilidade *in vitro* de *scaffolds* de QS com menor massa molar (HSU *et al.*, 2004; TANGSADTHAKUN *et al.*, 2007), outros sugerem não haver influência da MM sobre a biocompatibilidade (SUPHASIROJ *et al.*, 2009) ou ainda mostram resultados exatamente opostos (MECWAN *et al.*, 2011). Alguns trabalhos sugerem uma atividade biológica estimulatória de QS de baixa MM sobre macrófagos *in vitro*, embora este efeito não tenha sido avaliado com QS de alta MM (LIU *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2015; ZHENG *et al.*, 2016).

Dada a importância da massa molar da QS sobre suas características físico-químicas e biológicas, o fato de que esse parâmetro não seja sequer mencionado em vários estudos (YUAN *et al.*, 2004; KIM, K. S. *et al.*, 2008; WONG, 2009; GUPTA *et al.*, 2011; COSTA-PINTO *et al.*, 2012; LIAO *et al.*, 2012; DENG *et al.*, 2013; HAN *et al.*, 2014) ou não considerado na análise e interpretação de resultados em outros (KANG *et al.*, 1999; HOWLING *et al.*, 2001; GUAY *et al.*, 2004; AMARAL *et al.*, 2006; DANILCHENKO *et al.*, 2011; WEI *et al.*, 2011; SARKAR *et al.*, 2013; WHU *et al.*, 2013; ZEINALI *et al.*, 2014) dificulta, ou mesmo inviabiliza a reprodutibilidade dos resultados obtidos nos diversos trabalhos e o estabelecimento de correlação entre eles. Além disso, os estudos que avaliaram o efeito da MM sobre a biocompatibilidade da QS são escassos e controversos, e não esclarecem satisfatoriamente os mecanismos que explicariam este efeito.

2. JUSTIFICATIVA

Considerando os resultados promissores observados na literatura com o uso da quitosana como biomaterial em engenharia tecidual, sua versatilidade de aplicações nos estudos em medicina regenerativa e em odontologia, com a regeneração de tecido ósseo, tecido periodontal e diversos tipos de tecidos em estudos pré-clínicos, é de suma importância que os resultados destes estudos possam ser reproduzidos, comparados e correlacionados com suas diversas variáveis, permitindo assim se estabelecer uma metodologia que produza resultados mais confiáveis e conclusivos. No entanto, existe uma divergência muito grande na literatura quanto às características da QS utilizada nos estudos, sobretudo quanto aos parâmetros de grau de desacetilação e massa molar. Além disso, os trabalhos que investigam a influência da massa molar sobre a biocompatibilidade da QS são escassos e inconclusivos, limitando-se a avaliações de citocompatibilidade *in vitro*.

Parece evidente, a partir da análise da literatura, que a influência da massa molar e seus possíveis mecanismos de ação sobre a biocompatibilidade da QS ainda não estão esclarecidos. Assim, o presente trabalho se propõe a caracterizar amostras comerciais de QS de diferentes massas molares, determinando seu GD e massa molar, e investigar *in vivo* o efeito da MM sobre a biocompatibilidade e possível bioatividade de membranas de QS produzidas no Grupo de Pesquisas em Separações por Adsorção (GPSA), do Departamento de Engenharia Química da UFC.

Dessa forma, pretende-se contribuir com o conhecimento da influência da massa molar sobre a biocompatibilidade da QS, possibilitando, em futuros estudos, a utilização deste parâmetro como uma variável a ser considerada na seleção da quitosana e no desenvolvimento de membranas para aplicação em regeneração tecidual guiada.

3. HIPÓTESE

As membranas de quitosana são biocompatíveis quando implantadas em tecido subcutâneo de ratos. A massa molar da QS influencia em sua biocompatibilidade de tal forma que a quitosana de baixo peso molecular induz menor resposta inflamatória que a de alto peso molecular, sendo mais biocompatível.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Avaliar a influência da massa molar sobre a biocompatibilidade de membranas de QS produzidas pelo Grupo de Pesquisas em Separação por Adsorção (GPSA) da UFC, e implantadas no tecido subcutâneo de ratos;

4.2. Objetivos específicos

- Determinar quimicamente a massa molar e o grau de desacetilação de diferentes amostras comerciais de QS;
- Definir a massa molar de membranas de QS produzidas pelo GPSA a partir das amostras comerciais;
- Avaliar ao nível celular a intensidade e a duração da inflamação tecidual e do processo de reparo desencadeados pelas membranas de QS de diferentes massas molares e GD semelhantes, através da análise do infiltrado inflamatório leucocitário, da formação de tecido de granulação e de tecido conjuntivo fibroso, comparando-as com controles positivo e negativo;
- Investigar a bioatividade das membranas de QS sobre a imunexpressão de NF κ B e FGF-2 em função de suas massas molares, comparando-as com controle negativo, de forma a compreender e propor possíveis mecanismos que justifiquem a influência da MM no processo de inflamação e reparo tecidual..

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Caracterização da quitosana

Foram adquiridas amostras de quitosana de alto grau de pureza (P.A.) na forma de pó, provenientes da Sigma Aldrich (St Louis, EUA), conforme especificações a seguir:

- Quitosana de baixo peso molecular (QS-BPM), com grau de desacetilação de 75 a 85% e peso molecular de 50kDa a 190 kDa, conforme especificações do fabricante (código de produto 448869);
- Quitosana de alto peso molecular (QS-APM), com grau de desacetilação maior que 75% e peso molecular de 310 kDa a 375 kDa, conforme especificações do fabricante (código do produto 419419).

5.1.1. Determinação do grau médio de desacetilação (GD)

Uma importante propriedade na caracterização da QS é seu grau médio de desacetilação. Esta característica representa o percentual de grupos amino (% NH₂) na cadeia polimérica da QS, o qual, em última instância, indica seu grau de reatividade. O GD interfere diretamente nas propriedades físico-químicas da QS e sua determinação é fundamental quando se utiliza este material para fins biológicos (BALDRICK, 2010).

As amostras de QS de baixo e alto peso molecular foram analisadas por titulação potenciométrica para determinação de seus graus médios de desacetilação. Aproximadamente 0,2 g de QS-APM e 0,5 g de QS-BPM foram dissolvidos em 40 mL de ácido clorídrico (HCl) 0,05M e permaneceram em contato com o ácido por 24 horas para permitir a completa protonação dos grupamentos amino da QS. Em seguida, a solução de QS-APM foi titulada com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,10M enquanto a solução de QS-BPM foi titulada com NaOH 0,15M. Enquanto a solução de NaOH foi adicionada, o potencial elétrico decorrente dos grupos amino protonados foi gradualmente reduzido, sendo registrado em pHmetro digital DM-22 (Digimed, MS, Brasil). O volume de NaOH utilizado para desprotonar a QS foi registrado e o GD, expresso em percentual de grupos amino (% NH₂), foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\%NH_2 = \frac{M_{NaOH} \times (V_2 - V_1) \times 161}{m_2} \times 100$$

onde M_{NaOH} é a molaridade da solução de NaOH (mols/L), V_1 e V_2 são respectivamente os volumes (L) da solução de NaOH utilizados para neutralizar o excesso de HCl e os grupos amino protonados, 161 é a massa molecular da unidade monomérica da QS e m_2 é a massa da amostra (g) no estado seco, utilizada para titulação (TOLAIMATE *et al.*, 2000; VIEIRA, 2008).

5.1.2. Determinação da massa molar (MM)

A massa molar representa o tamanho médio das cadeias poliméricas de QS. Esta propriedade influencia significativamente as características físico-químicas da QS, o que pode também afetar sua atividade biológica, sendo, portanto, de fundamental importância na sua caracterização (EBEWELE, 2000; SUPHASIRIROJ, 2009).

A MM das amostras de QS foi avaliada por Cromatografia de permeação em gel (GPC, do inglês *gel permeation chromatography*). A técnica de GPC é uma das mais largamente utilizadas para determinação da massa molar em polímeros naturais e sintéticos. Este método consiste na separação das moléculas em função de seu raio hidrodinâmico. Uma solução do polímero que se deseja analisar atravessa uma coluna revestida por um gel microporoso acoplada a um detector. Dessa forma, moléculas menores, que conseguem permear os poros do gel, ficam retidas por mais tempo na coluna, ocupando um volume maior (raio hidrodinâmico) que moléculas maiores, que não conseguem penetrar nos poros do gel e eluem mais rapidamente pela coluna. Assim, as moléculas são separadas, em função de seus tamanhos, e mensuradas pelo detector. Este método é também conhecido como Cromatografia de exclusão por tamanho. A massa molar é calculada através de uma relação entre o tamanho das moléculas e a massa molar de um polímero conhecido, utilizado como padrão de calibração (VIEIRA, 2008). Neste trabalho, utilizou-se um cromatógrafo multidetector Viscotek GPC Max (Malvern, Reino Unido) (Figura 4) equipado com uma coluna SB806M HQ (Shodex, Japão) e detectores de índice de refração e de espalhamento de luz.



Figura 4 - Cromatógrafo de permeação em gel do laboratório do Núcleo de Pesquisas em Lubrificantes (NPL) da UFC.

As amostras de QS foram preparadas utilizando-se aproximadamente 2 mg dissolvidos em 1 mL de solução tampão aquosa de ácido acético 0,33 M e hidróxido de sódio 0,1 M. As soluções ficaram em repouso por 24h e foram filtradas em filtro de 0,22 μm (Millipore, Alemanha) antes de serem injetadas no cromatógrafo. As análises foram realizadas a 40 °C com uma vazão de 0,8 mL/minuto, sendo feitas em duplicata. Os resultados foram expressos em massa molar numérica (M_n), massa molar ponderal (M_w) e índice de polidispersividade (IP). O IP é expresso pela razão M_w/M_n e reflete a distribuição dos diferentes tamanhos de cadeia polimérica existentes em uma determinada massa de um polímero. Quanto maior o valor de IP, maior a heterogeneidade de MM do polímero (EBEWELE, 2000; VIEIRA, 2008).

5.2. Obtenção das membranas

As membranas foram produzidas a partir das amostras comerciais de quitosana especificadas, no Grupo de Pesquisas em Separação por Adsorção (GPSA) da UFC. Para tanto, uma massa de 2,0 gramas de cada uma das QS de

diferentes MM foi solubilizada em 100 mL de uma solução de ácido acético a 3% (volume/volume) sob agitação mecânica (2.000 rpm) por 24 horas, obtendo-se soluções de QS a 2% (peso/volume) . As soluções foram então distribuídas em placas de Petri (20 mL por placa) e colocadas em estufa a 60 °C por quatro horas. Após esse período, as placas foram imersas em banho ultrassônico com solução de NaOH a uma concentração de 2 M durante 24 horas a fim de neutralizar o ácido acético residual. As quitosanas foram então lavadas com água destilada e submetidas ao processo de criodessecação em liofilizador L-101(Liobrás, São Carlos, SP). O processo de liofilização compreendeu um congelamento a - 40°C por 10 minutos (vácuo de 6.4 mbar) e secagem a temperatura ambiente por três dias (vácuo de 0,98 mbar). A liofilização permite a sublimação controlada do conteúdo aquoso das soluções de QS, resultando em membranas cuja porosidade é decorrente dos parâmetros utilizados durante a secagem (KANG *et al.*, 1999).

Ao final desse processo, foram obtidas membranas de QS com espessura de aproximadamente 1,0 mm. As membranas foram recortadas em discos com diâmetro de aproximadamente 5,0 mm com a utilização de um bisturi circular (Microplant, São Paulo, SP) e embaladas em envelopes de papel grau cirúrgico (Figura 5).



Figura 5 - Membranas de QS acondicionadas para esterilização

Em seguida, as membranas foram submetidas a esterilização por radiação ultravioleta (UV). Em capela de fluxo laminar, foram expostas a radiação UV emitida por lâmpada de vapor de mercúrio de comprimento de onda de 254 nm, por 30 minutos em cada face, a uma distância de 10 cm, antes de serem utilizadas nos animais (MIRANDA *et al.*, 2016).

Adicionalmente, foram obtidas membranas de carragenina lâmbda tipo IV (Cg λ) para serem utilizadas como controle pró-inflamatório. Em 100 mL de uma solução de cloreto de potássio (KCl) 0,5 M foram adicionados 2 gramas de Cg λ PA (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA). A solução foi mantida sob agitação magnética a 1000rpm durante uma hora. Em seguida, a solução foi vertida em placas de Petri (20 mL por placa) e submetida à secagem em estufa a 60 °C por 24h. As membranas obtidas foram recortadas da mesma forma que as membranas de QS e submetidas ao mesmo processo de esterilização.

5.3. Avaliação da biocompatibilidade

A metodologia de avaliação da biocompatibilidade deve ser selecionada de forma a simular a possível aplicação à qual o biomaterial se destina, considerando-se fatores como o tipo de tecido, a espécie animal, o tipo de contato do material e a duração deste contato. Assim, as membranas de QS foram avaliadas em um contexto de regeneração de tecido conjuntivo subcutâneo de ratos, utilizando-se um modelo de implantação com curso temporal variando de 1 a 30 dias, o que é considerado um contato prolongado (ANDERSON, BIANCO, *et al.*, 2004). Para esta finalidade, foram avaliados parâmetros macroscópicos, por observação visual direta, e microscópicos, por histologia e imunohistoquímica, de forma a caracterizar a resposta biológica dos tecidos ao contato com o biomaterial.

5.3.1. Animais

Os animais, provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (UFC), foram mantidos sob condições de temperatura ambiente e ciclos claro-escuros controlados durante os experimentos. Foram utilizados 24 ratos da espécie *Rattus norvegicus albinus*, linhagem *Wistar*, machos, com massa corpórea variando entre 200 e 250g. Estes foram alojados em gaiolas

apropriadas, em número de seis animais em cada uma delas, com alimentação balanceada à base de ração. A água foi disponibilizada à vontade. Todos os esforços foram realizados no sentido de reduzir o número de animais utilizados, a dor, o sofrimento e o estresse dos mesmos. Os protocolos experimentais foram executados de acordo com as diretrizes estabelecidas pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC, estando em concordância com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado sob protocolo 68/2013 (anexo A).

Em todos os animais, foram implantadas uma membrana de QS de cada peso molecular e uma membrana de carragenina lâmbda tipo IV (Cg λ) utilizada como controle positivo (pró-inflamatório). A Cg λ é um polímero extraído de algas marinhas e utilizado largamente na literatura como indutor de inflamação, edema e hiperalgesia em ratos, atuando na quimiotaxia de neutrófilos (GUAY *et al.*, 2004). Em um dos sítios não foi implantado nenhum material (controle negativo). Os grupos foram assim denominados:

1. GRUPO QS-BPM: Foram inseridas membranas de quitosana de baixo peso molecular.
2. GRUPO QS-APM: Foram inseridas membranas de quitosana de alto peso molecular.
3. GRUPO CG λ : Foram inseridas membranas de Cg λ utilizadas como controle pró-inflamatório.
4. GRUPO CONTROLE: Foi realizado procedimento cirúrgico idêntico aos grupos experimentais, porém sem inserção de qualquer biomaterial.

A figura 6 ilustra esquematicamente a sequência de procedimentos da avaliação da biocompatibilidade.

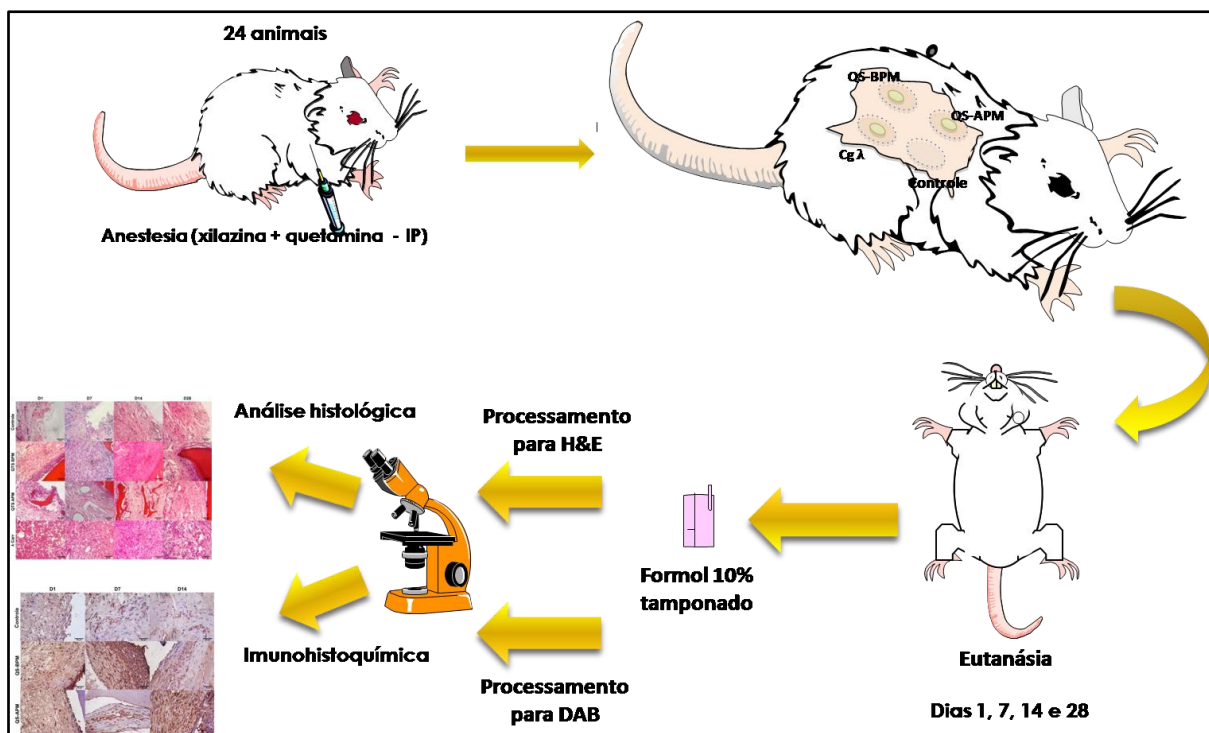


Figura 6 - Representação esquemática dos procedimentos de análise da biocompatibilidade

5.3.2. Procedimento cirúrgico

Os ratos foram anestesiados pela injeção intraperitoneal de uma solução combinada de xilazina e quetamina (20 mg/kg e 100 mg/kg, respectivamente). O protocolo cirúrgico foi adaptado a partir da metodologia utilizada na literatura para avaliação de biocompatibilidade de membranas (ZHAO *et al.*, 2000).

Após a anestesia, procedeu-se a tricotomia na região dorsal escapular e pélvica, seguida pela antissepsia com solução alcoólica de iodo a 1%. Foram feitas incisões horizontais de aproximadamente 1,5 cm em quatro regiões da superfície dorsal no sentido látero-lateral, com distância mínima de 2,0 cm entre si. Em cada rato foi implantada uma membrana de cada grupo experimental e uma membrana de Cgλ como controle positivo. Adicionalmente, uma incisão foi feita como controle negativo, onde não foi implantado nenhum material (Figura 7).

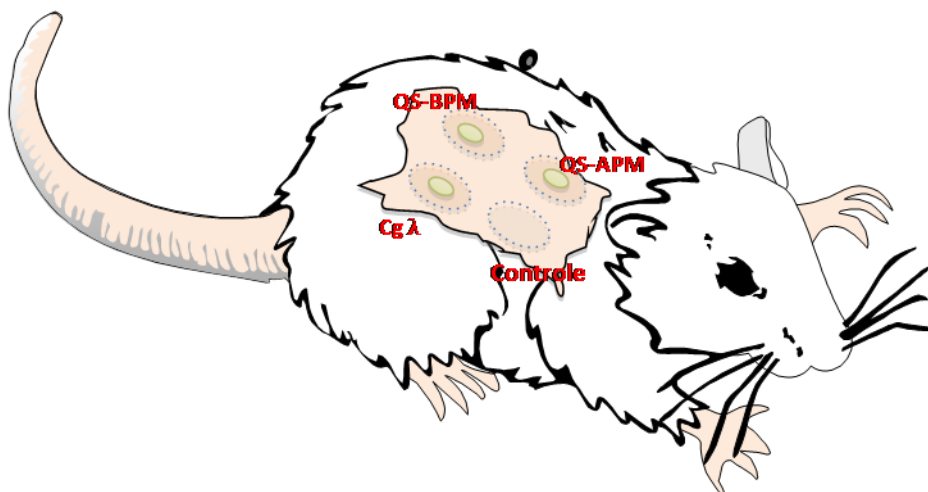


Figura 7 - Ilustração da distribuição das membranas no dorso dos ratos. Em cada animal, foi inserida uma membrana de QS-BPM, QS-APM e Cg λ , além de uma incisão controle, onde não foi inserido nenhum material.

O tecido subcutâneo foi divulsionado com uma tesoura de ponta romba, penetrando através da incisão no sentido caudal, o suficiente para posicionar as membranas de aproximadamente 5,0 mm de diâmetro. As incisões foram suturadas com fio de nylon 5.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, Brasil) (Figura 8).

Os animais foram mantidos sob observação em gaiolas unitárias por 24 horas, para evitar que se machucassem.

Após períodos de 1, 7, 14 e 28 dias os animais foram eutanasiados com overdose de xilazina e quetamina (60 e 300 mg/kg, respectivamente) por injeção intraperitoneal. A pele e o tecido subcutâneo do dorso foram incisados, removidos e analisados macroscopicamente por observação visual e fotográfica. Em seguida, cada sítio cirúrgico foi excisado, juntamente com uma porção de tecido adjacente, para posterior análise microscópica (Figura 9).

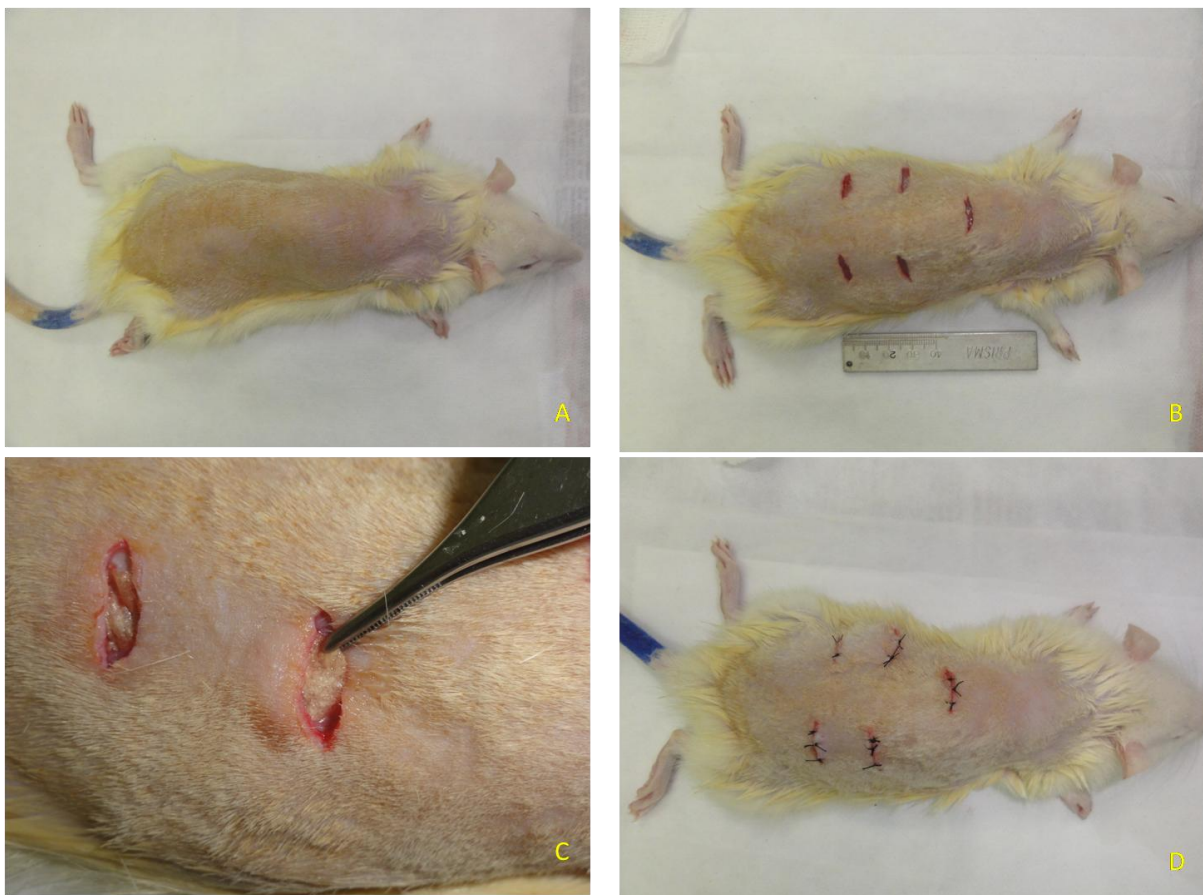


Figura 8 - Sequência fotográfica dos procedimentos cirúrgicos: tricotomia e asepsia do dorso (A); incisões (B); inserção das membranas (C) e sutura (D).

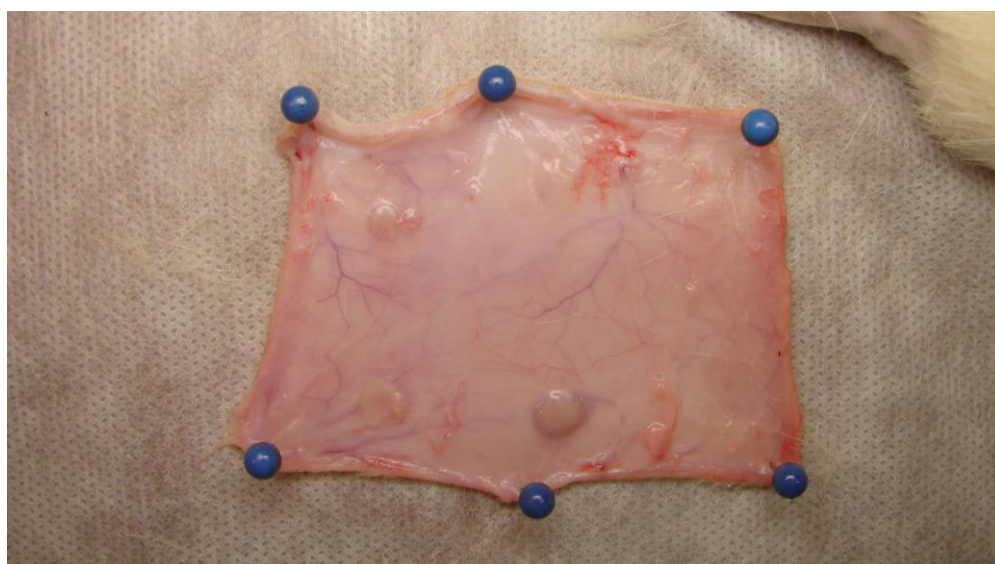


Figura 9 – Aspecto do tecido subcutâneo excisado para observação macroscópica.

5.3.3. Aspecto macroscópico

Após a eutanásia dos animais nos períodos de tempo definidos para cada grupo, a pele e o tecido subcutâneo do dorso foram excisados e removidos para análise macroscópica através da observação visual e fotográfica utilizando câmera digital Sony DSC-H1. Foram avaliados os seguintes parâmetros:

- Presença ou ausência da membrana nos sítios de implantação;
- Presença ou ausência de sinais clínicos de inflamação, como hiperemia e edema na área adjacente à membrana.

5.3.4. Análises histológicas

Em todos os animais, as membranas foram removidas com uma margem de aproximadamente 2,0 mm de tecido circunjacente. Estes espécimes foram acondicionados em cassetes previamente identificados e imersos em solução tamponada de formol a 10% para fixação. Após a fixação, os fragmentos foram analisados macroscopicamente e submetidos à desidratação em série alcoólica crescente com etanol 80%, 90%, 95% e etanol absoluto. Em seguida, foram diafanizados em solução de xilol e embebidos em parafina a 65°C em processador automático de tecidos modelo PT09 (Luptec®, São Carlos, Brasil), formando blocos de parafina à temperatura ambiente. Estes foram seccionados longitudinalmente obtendo-se cortes de 4 µm de espessura utilizando micrótomo rotativo semi-automático modelo RM 2125 (Leica®, Alemanha), sendo dispostos em lâminas de vidro com borda fosca para realização de coloração por hematoxilina-eosina.

Os cortes foram desparafinizados em estufa a 65°C por uma hora e em três banhos de cinco minutos em xilol e reidratados em banhos de três minutos de soluções alcoólicas 100%, 90% e 70%. Após lavagem em água corrente por três minutos para retirada do excesso de álcool as mesmas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE), sendo imersas em hematoxilina de Harris 7% por três minutos e novamente lavadas para retirada do excesso de corante. As lâminas foram então contra-coradas em solução alcoólica de eosina 5% por dez segundos, lavadas rapidamente em água corrente e desidratadas em banhos de três minutos

de álcool 70%, 90% e 100%. Após diafanização em xilol procedeu-se a montagem com lamínula e Enthellan®.

As lâminas histológicas foram analisadas de forma cega por um patologista oral independente em microscópio óptico convencional modelo DM2000 (Leica®, Alemanha) acoplado a câmara digital para fotomicrografias modelo DFC 295 (Leica®) utilizando retículo de 1x1 mm dividido em quadrantes de 0,25 mm² de área. Foram selecionados cinco campos microscópicos em um aumento de 400x ao longo da interface entre a membrana e o tecido adjacente. Os seguintes parâmetros foram avaliados: infiltrado inflamatório leucocitário, formação de tecido de granulação e formação de tecido conjuntivo fibroso. Estes parâmetros foram ranqueados a depender do percentual de área dentro do retículo que contivesse cada parâmetro, sendo atribuídos escores conforme o quadro 1 (AGUIAR JUNIOR, 2015).

Escore	Descrição
0	Ausência do parâmetro histológico na área total do retículo
1	Presença do parâmetro histológico ocupando uma área menor que 25% do retículo
2	Presença do parâmetro histológico ocupando uma área maior que 25% e menor que 75% do retículo
3	Presença do parâmetro histológico ocupando uma área maior que 75% do retículo

Quadro 1 - Critérios de avaliação semi-quantitativa dos parâmetros histológicos

A mediana dos cinco campos escolhidos na área de interesse foi considerada como unidade amostral de cada parâmetro em cada animal para realização de análise estatística. As características histológicas foram analisadas em cada fase do processo de cicatrização e associadas ao aspecto macroscópico anteriormente analisado.

5.3.5. Análise Imunohistoquímica

A análise imunohistoquímica (IHQ) foi planejada neste estudo para complementar as análises histológicas, de forma a compreender melhor as interações entre a QS e os tecidos investigando-se a presença de moléculas específicas do processo inflamatório. Neste sentido, buscou-se identificar a presença de duas proteínas importantes nos mecanismos da inflamação: o fator de transcrição nuclear *kappa-beta* (NF- κ B, do inglês *nuclear factor kappa-B*) e o fator de crescimento de fibroblastos-2 (FGF-2, do inglês *fibroblast growth factor-2*).

A IHQ foi realizada utilizando-se os mesmos blocos de parafina em que os tecidos foram fixados para análise histológica. Procedeu-se novos cortes seriados (4 μ m) em lâminas com poli L-lisina (Probe on Plus[®]) adequadas para a técnica de IHQ. Em seguida, os cortes foram desparafinizados em estufa a 60 °C por 2 a 3 horas, sendo a parafina residual removida com xilol. Procedeu-se a re-hidratação com banhos de cinco minutos em soluções de etanol absoluto, etanol 95%, etanol a 70% e água destilada. Em seguida, as lâminas foram imersas em tampão de citrato 0,1 M (pH 6,0) sob aquecimento a 60-100 °C em banho-maria por 30 minutos. Após o resfriamento, obtido em temperatura ambiente durante 20 minutos, foram feitas lavagens com solução tampão fosfato-salino (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*), intercaladas pelos bloqueios da peroxidase endógena, com solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3%, e de proteína, com albumina do soro bovino (BSA, do inglês *bovine serum albumin*) a 5%. A seguir, procedeu-se a incubação com cada um dos anticorpos primários:

- anti-NF- κ B (p50; sc-114G - Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA), obtido de cabra, sendo reativo para ratos;
- anti-FGF básico (F3393 - Sigma-Aldrich, St Louis, EUA,), obtido de coelho, sendo reativo para ratos

O anticorpo (Ac) para NF- κ B (p50), fornecido pelo fabricante em solução, foi diluído na proporção de 1:300 (volume/volume) em diluente para anticorpos (Dako Cytomation, Carpinteria, EUA) sob refrigeração. O Ac para FGF-b foi fornecido pelo fabricante na forma de pó liofilizado. Este foi solubilizado em 100 μ L de água esterilizada e diluído na proporção de 1: 300 (volume/volume) no mesmo diluente. A incubação de ambos foi feita *overnight*. No dia seguinte, procedeu-se a lavagem em PBS seguida da incubação com Ac secundário biotilado anti-

IgG (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) por 30 minutos. Durante esse período, o complexo avidina biotina (ABC) foi preparado. Após a incubação secundária, as lâminas foram novamente lavadas com solução PBS e incubadas com o ABC por 30 minutos, conforme instruções do fabricante (Dako Cytomation, Carpinteria, EUA). Após nova lavagem com PBS, foi feita a coloração com o cromógeno 3,3-diaminobenzidina (DAB) /peróxido durante 1 minuto, seguida pela contra coloração com hematoxilina de Harry também por 1 minuto. Os controles negativos foram processados simultaneamente como descritos acima, sendo que o primeiro anticorpo foi substituído por PBS-BSA 5%. Por fim, foi realizada a desidratação em uma série de concentrações de álcoois, e clareamento em xilol das amostras e finalmente, as respectivas montagens das lâminas e lamínulas. Dois cortes dos grupos QS-BPM, QS-APM e controle dos dias 1, 7 e 14 foram selecionados de forma cega, por patologista independente, para imunomarcação com cada anticorpo. As lâminas foram analisadas também de forma cega em microscópio óptico convencional modelo DM2000 (Leica®, Alemanha) acoplado a câmera digital para fotomicrografias modelo DFC 295 (Leica®). Foram selecionados cinco campos microscópicos em aumento de 400x ao longo da interface entre a membrana e o tecido adjacente. A imunomarcação para NF- κ B foi quantificada pela contagem percentual de células marcadas no citoplasma e no núcleo em cada campo, enquanto a quantificação da imunomarcação para FGF-b foi feita por contagem percentual de células marcadas em cada campo, sendo os valores expressos em percentual médio obtido a partir de todos os campos para cada corte.

5.4. Análise Estatística

Todos os dados foram tabulados para o *software* GraphPad Prism versão 6 licenciada (GraphPad Software®, San Diego, CA, USA) no qual todas as análises foram realizadas considerando o nível de significância de $p < 0,05$.

Os dados não-paramétricos das análises histológicas foram expressos em forma de mediana (mínima – máxima) e submetidos à comparação entre grupos (no mesmo dia experimental) ou intragrupos (cada grupo nos diferentes dias experimentais) por meio do teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Mann-Whitney U.

Os dados paramétricos das análises imunohistoquímicas foram expressos na forma de média e erro padrão da média (EPM) e submetidos à comparação entre grupos (no mesmo dia experimental) e intragrupos (cada grupo nos diferentes dias experimentais) por meio de análise de variância de dois critérios (2-way ANOVA) seguida do teste de Bonferroni.

6. RESULTADOS

6.1. Caracterização das membranas

6.1.1. Grau médio de desacetilação (GD)

Neste trabalho, foi utilizado o método da titulação potenciométrica para avaliação deste parâmetro. A análise foi feita em duplicata para cada uma das amostras de quitosana. O GD foi calculado em função do volume da solução de NaOH, de concentração conhecida, necessário para neutralizar os grupos NH_3^+ da solução de QS em HCl 0,05 M. À medida que o hidróxido de sódio foi adicionado à solução ácida, observou-se, nas curvas de titulação, uma redução do potencial elétrico da solução ocasionada pela neutralização das cargas positivas. Na curva da derivada primeira, foram observadas duas inflexões bem definidas. A primeira inflexão indica o volume de NaOH que foi necessário para neutralizar os prótons do excesso de ácido clorídrico, enquanto a segunda refere-se ao término da desprotonação dos grupamentos amino. A diferença entre o volume observado entre a segunda e a primeira inflexão ($V_2 - V_1$) na curva de titulação e sua primeira derivada representa o volume de NaOH necessário para desprotonar os grupos NH_3^+ que indica, segundo a fórmula utilizada, o percentual de grupos amino da cadeia de quitosana.

As amostras de QS-APM mostraram valores de 78,06 % e 80,0 % de grupos amino, resultando em um valor médio de 79,03% ($\pm 0,97$) de GD. As amostras de QS-BPM mostraram valores de 81,7% e 81,91% de grupos amino, resultando em um valor médio de 81,8 % ($\pm 0,1$) de GD. Os resultados estão apresentados na Tabela 1. As curvas de titulação potenciométrica e sua primeira derivada estão apresentadas nas figuras 10 e 11.

Tabela 1 – Resultados de %NH₂ e GD das amostras de quitosana

Amostra	Massa (g)	%NH ₂	GD (%)
QS-APM	0,2064 0,2002	78,06 80,00	79,03 (± 0,97)
QS-BPM	0,5025 0,5012	81,70 81,91	81,80 (± 0,1)

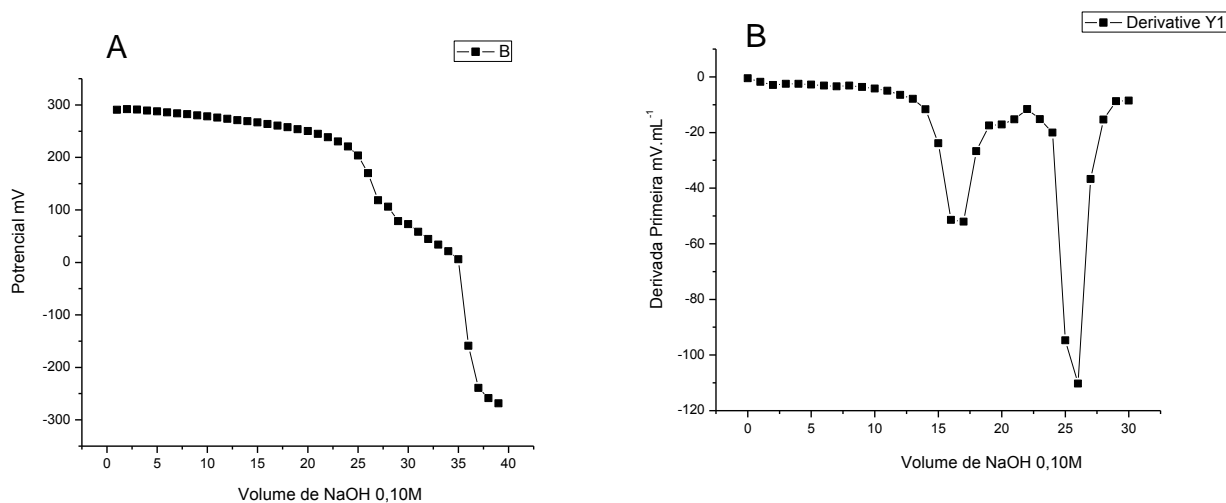


Figura 10 - Curva de titulação potenciométrica(A) e sua derivada primeira (B) para QS de alto peso molecular.

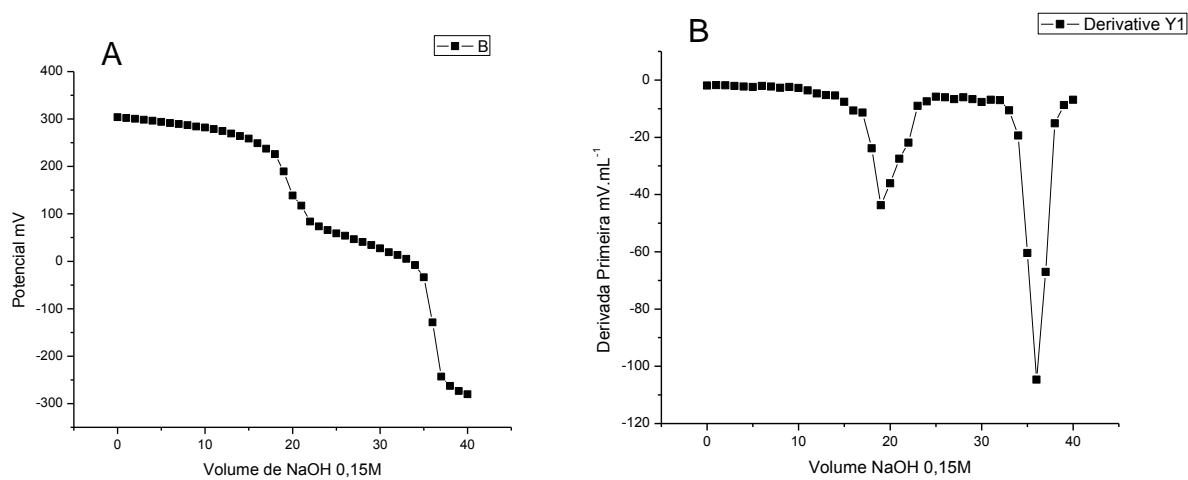


Figura 11 - Curvas de titulação potenciométrica (A) e sua derivada primeira (B) para QS de baixo peso molecular.

6.1.2. Determinação da massa molar (MM)

As massas molares das quitosanas comerciais foram determinadas por cromatografia de permeação em gel (GPC) com detectores de índice de refração e de espalhamento de luz de ângulo direito. A dextrana 65K (Malvern) foi utilizada como padrão de calibração. Todas as análises foram feitas em duplicata. Os resultados foram expressos como massa molar numérica (M_n), massa molar ponderal (M_w) e índice de polidispersividade (IP) das amostras originais de QS em pó e das membranas de quitosana. O IP foi obtido pela relação entre M_w/M_n e representa a distribuição dos tamanhos de cadeia polimérica nas amostras, sendo fortemente influenciado pelas condições da reação de desacetilação impostas para obtenção da QS. Quanto mais próximo de 1,0 menor a heterogeneidade de MM da amostra.

A QS-APM na forma de pó mostrou M_n de 398,0 kDa e M_w de 467,21 kDa, com IP de 1,16. Após processamento para obtenção das membranas e esterilização por UV, a QS-APM apresentou M_n de 174,68 kDa e M_w de 221,71 kDa, com IP de 1,27. Os resultados de MM para a QS-BPM na forma de pó mostraram M_n de 110,66 kDa e M_w de 157,83 kDa, com IP de 1,70. Após o processamento das membranas e esterilização por UV, os valores de MM foram de 110,26 kDa (M_n) e 174,46 kDa (M_w), com IP de 1,58. Os dados estão expressos na tabela 2. As curvas cromatográficas das quitosanas e do padrão de dextrana estão apresentadas nas figuras 12 e 13.

Tabela 2 - Massas molares médias obtidas por cromatografia de permeação em gel (GPC).

Amostra	M_n (kDa)	M_w (kDa)	IP
QS-APM (em pó)	398,00	467,21	1,16
QS-APM (membrana)	174,68	221,71	1,27
QS-BPM (em pó)	110,66	157,83	1,70
QS-BPM (membrana)	110,26	174,46	1,58

M_n = massa molar média numérica; M_w = massa molar média ponderal; IP = índice de polidispersividade

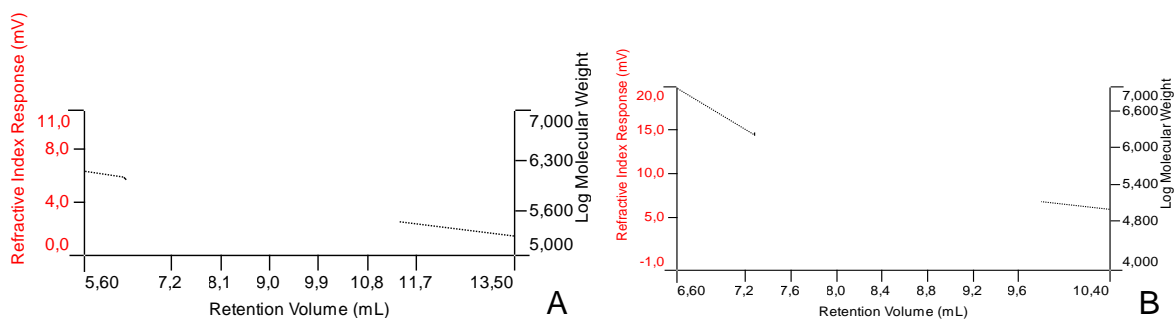


Figura 12 – Curvas cromatográficas da QS (em preto) e padrão de dextrana (em vermelho) da amostra de QS-APM em pó (A) e na forma de membrana (B)

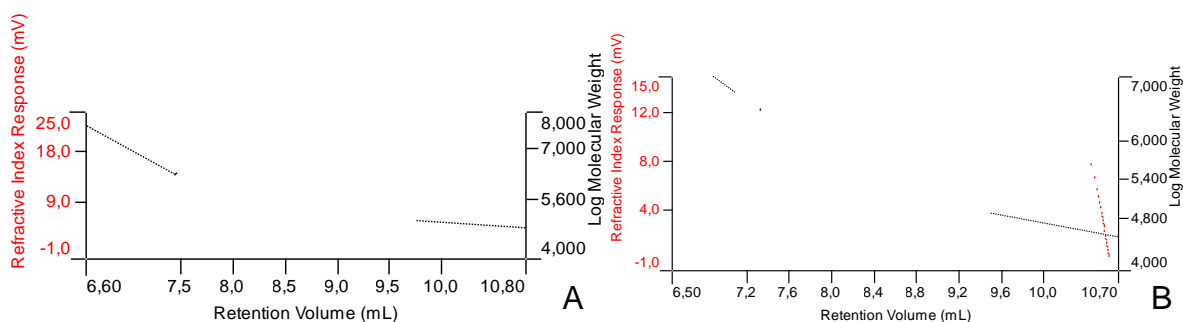


Figura 13 - Curvas cromatográficas da QS (em preto) e padrão de dextrana (em vermelho) da QS-BPM em pó (A) e na forma de membrana (B).

6.2. Avaliação da biocompatibilidade

6.2.1. Aspecto Macroscópico

Os grupos de animais foram eutanasiados após 1, 7, 14 ou 28 dias da inserção das membranas e, em cada período, o dorso excisado de cada animal foi observado visualmente e fotografado. No primeiro dia, o grupo controle negativo apresentava pontos de hiperemia, sem presença de edema. Os sítios onde foram implantadas as membranas de QS-BPM e QS-APM apresentavam discreto edema e áreas de hiperemia, indicando focos hemorrágicos no tecido adjacente às membranas, as quais encontravam-se íntegras, sem sinais de reabsorção. Nos sítios onde foram implantadas as membranas de Cg λ (controle positivo), observou-se a presença de edema de maior volume na área circunjacente à membrana.

No sétimo dia, os sítios do controle negativo não mais apresentavam sinais de inflamação. Nos sítios QS-BPM e QS-APM as membranas apresentavam-se visualmente intactas, sem sinais de degradação. Pôde-se observar leve hiperemia adjacente às bordas das membranas, sem presença de edema. Os sítios da Cg λ ainda apresentavam edema, não sendo possível identificar os limites da membrana.

Após 14 dias dos procedimentos cirúrgicos, o grupo controle não apresentava sinais de inflamação na área da intervenção cirúrgica. Nos grupos QS-BPM e QS-APM as membranas estavam presentes, sem sinais de degradação, e o tecido adjacente às membranas apresentava ausência de sinais de inflamação, semelhante ao controle. Nos sítios de Cg λ , era possível observar ainda a presença de edema, mais circunscrito à área das membranas, que não estavam mais visíveis.

Aos 28 dias, as membranas de quitosana permaneciam visíveis, com alguns sinais de reabsorção. Os tecidos adjacentes apresentavam-se com aspecto de normalidade, sem sinais de inflamação, semelhante ao controle negativo. Os sítios de Cg λ ainda apresentavam edema circunscrito. Imagens representativas de cada grupo estão ilustradas na figura 14.

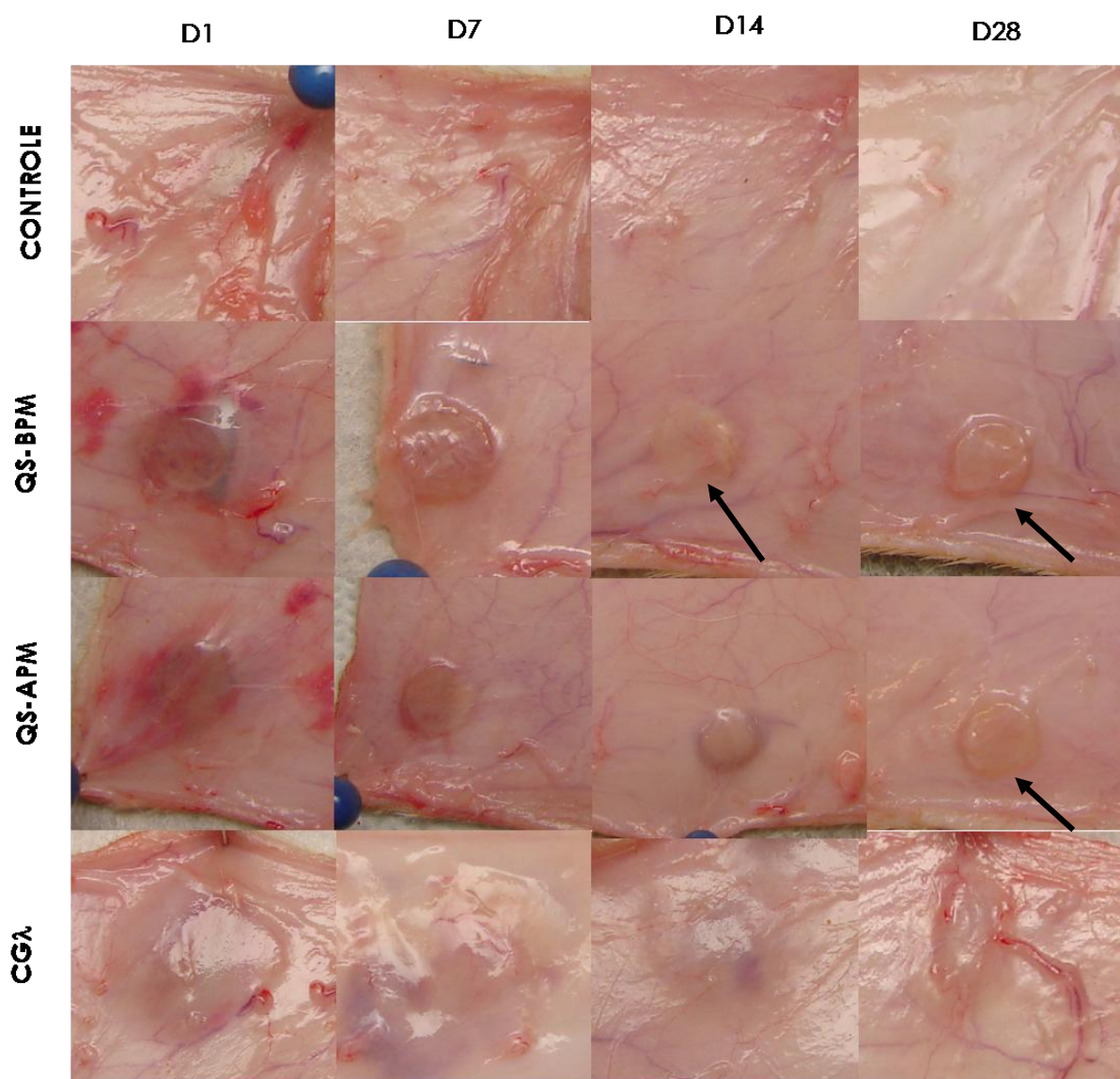


Figura 14: Aspecto macroscópico dos tecidos na região da implantação das membranas de QS-BPM, QS-APM, Cgλ e nos sítios controle após 1, 7, 14 e 28 dias. Observar áreas de discreta reabsorção das membranas (setas).

6.2.2. Análises Histológicas

• Infiltrado inflamatório leucocitário

No primeiro dia pós-operatório, o grupo controle, em que se realizou o procedimento cirúrgico, porém sem implantação de biomaterial, apresentou leve infiltrado leucocitário [Md=0,5 (0-1)], predominantemente composto por células polimorfonucleares (neutrófilos), com discreta hemorragia. O grupo QS-BPM mostrou um intenso infiltrado inflamatório de neutrófilos [Md=3 (2-3)], estatisticamente superior ao controle ($p < 0,05$), observando-se hemorragia disposta ao redor das membranas. O grupo QS-APM mostrou também intenso infiltrado inflamatório leucocitário [Md=3 (2-3)], predominantemente polimorfonuclear, superior ao controle ($p < 0,05$). O grupo CG λ apresentou intenso infiltrado inflamatório polimorfonuclear no primeiro dia, com densa hemorragia [Md= 2 (1-3)], mostrando diferença estatística em relação ao controle ($p < 0,05$), porém apresentando semelhança estatística em relação aos grupos QS-BPM e QS-APM ($p > 0,05$).

A partir do sétimo dia, o grupo controle mostrou discreto infiltrado leucocitário com presença de leucócitos mononucleares (macrófagos ou linfócitos), bem como a presença de mastócitos perivasculares. Apesar de discreto aumento do dia 1 para o dia 7 [Md=1(0-2)], não houve diferença significativa na variação dos escores ($p > 0,05$). Nos grupos QS-BPM e QS-APM, observou-se uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) dos escores de infiltrado inflamatório leucocitário em relação ao primeiro dia ([Md= 1 (0-2)] e [Md= 1 (0-1)] respectivamente), demonstrando semelhança com o controle negativo ($p > 0,05$). Em ambos os grupos, observou-se a presença de poucas células mononucleares dispostas ao redor do material e mastócitos perivasculares. O grupo CG λ mostrou um aumento dos escores de infiltrado leucocitário em relação ao primeiro dia, apresentando intenso infiltrado inflamatório [Md= 3 (3-3)], estatisticamente superior aos demais grupos ($p < 0,05$), com grande quantidade de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares, apresentando ainda uma extensa faixa de necrose de coagulação.

Ao 14º dia, o grupo controle manteve discreto infiltrado inflamatório, próximo ao valor basal [Md=0 (0-2)]. Os grupos QS-BPM e QS-APM mantiveram um

leve infiltrado inflamatório ([Md= 1 (1-2)] e [Md= 1 (0-1)] respectivamente), sem diferenças estatísticas entre si ou entre os valores apresentados no dia 7 ($p > 0,05$). No entanto, os escores do grupo QS-BPM mostraram-se superiores ao controle ($p < 0,05$). O grupo Cg λ apresentou redução estatística nos escores de infiltrado leucocitário em relação ao sétimo dia ($p < 0,05$), mantendo, porém, um infiltrado leucocitário mononuclear moderado [Md=1,5 (1-2)], estatisticamente superior ao controle ($p < 0,05$), com persistência de algumas células polimorfonucleares.

Ao final de 28 dias, o grupo controle mostrou escores de infiltrado leucocitário próximos ao valor basal [Md = 1 (0-2)], assim como os grupos QS-BPM [Md= 1 (1-1)] e QS-APM [Md= 1 (0-1)], que apresentavam células inflamatórias esparsas, com semelhança estatística ao controle ($p > 0,05$). O grupo Cg λ apresentou infiltrado leucocitário leve [Md= 1 (1-2)], sem diferença estatística em relação aos demais grupos ($p > 0,05$). No entanto, observou-se neste grupo a presença de focos de degeneração mixoide, o que não ocorreu nos demais grupos. Os resultados de infiltrado leucocitário estão representados graficamente na figura 15.

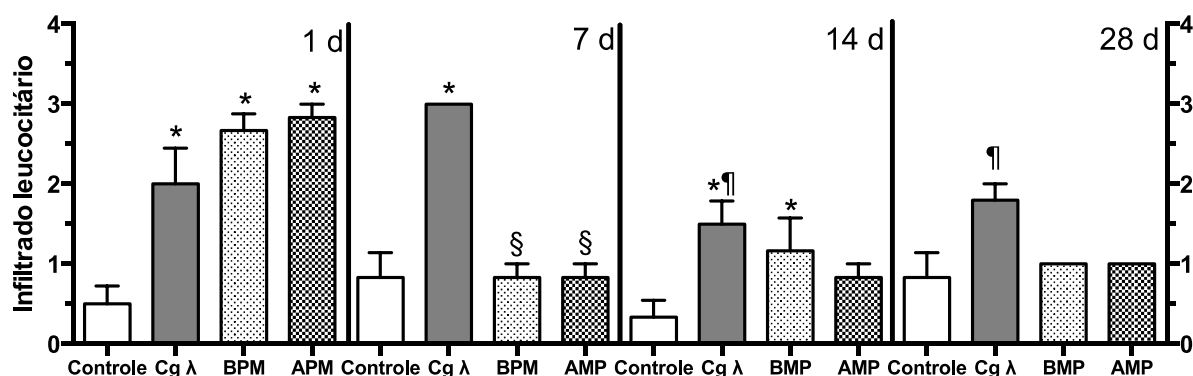


Figura 15: Curso temporal de infiltração leucocitária em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos nos grupos controle, QS-BPM, QS-APM e Cg λ após 1, 7, 14 ou 28 dias. As barras representam escores que variaram, conforme a intensidade de infiltrado, de 0 (ausente) a 3 (>75%) por 5 campos. *diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao controle no mesmo dia; § diferença estatística ($p < 0,05$) em relação a Cg λ no mesmo dia; ¶ diferença estatística ($p < 0,05$) em relação a Cg λ 7d. Testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

- **Tecido de granulação**

No primeiro dia pós-operatório nenhum animal dos grupos experimentais avaliados apresentou tecido de granulação [Md= 0 (0-0)]. Após sete dias, houve aumento significativo do tecido de granulação nos grupos controle [Md= 1 (0-1)], QS-BPM [Md=2(1-3)] e QS-APM [Md= 1,5 (1-2)] ($p < 0,05$). O grupo QS-BPM apresentou o maior valor de formação de tecido de granulação entre todos os grupos no sétimo dia, sendo estatisticamente superior ao controle ($p < 0,05$), porém, sem diferença estatística em relação à QS-APM ($p > 0,05$). O grupo CG λ manteve ausência de tecido de granulação no sétimo dia.

Ao final de 14 dias, o grupo QS-BPM ainda mostrava maiores escores de área preenchida por tecido de granulação entre todos os grupos [1,5 (0-2)], com diferença estatística somente em relação ao controle [Md= 0 (0-1)] ($p < 0,05$). O grupo QS-APM apresentou valores superiores ao controle [Md= 1 (0-2)], mas sem diferença estatística ($p > 0,05$). Ao longo do período de observação, no grupo QS-BPM, o tecido de granulação mostrava-se associado ao perímetro da membrana, enquanto no grupo QS-APM o tecido de granulação apresentava-se disperso, com pouca associação ao material enxertado. A presença de tecido de granulação no grupo CG λ somente foi observada a partir do dia 14 [Md= 1 (1-2)], com aumento significativo apenas no dia 28 [Md= 2 (2-3)] ($p < 0,05$). O tecido de granulação apresentava-se de forma concentrada, substituindo o infiltrado inflamatório mononuclear, especialmente na zona onde previamente havia sido notada necrose de coagulação.

No 28º dia, apenas o grupo CG λ ainda apresentava tecido de granulação, enquanto nos demais grupos o tecido de granulação voltara aos valores basais [Md= 0 (0-0)]. Os dados da formação de tecido de granulação estão representados graficamente na figura 16.

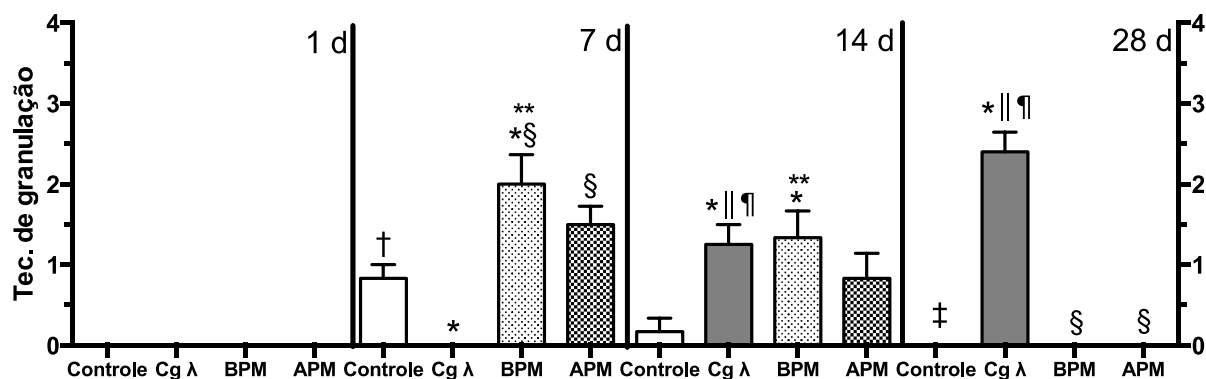


Figura 16 - Curso temporal da formação de tecido de granulação em tecido conjuntivo subcutâneo do de ratos nos grupos controle, QS-BPM, QS-APM e Cg λ após 1, 7, 14 ou 28 dias. As barras representam escores que variaram, conforme a área ocupada por tecido de granulação, de 0 (ausente) a 3 (>75%) por 5 campos. *diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao controle no mesmo dia; § diferença estatística ($p < 0,05$) em relação a Cg λ no mesmo dia; † diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao controle 1d; ** diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao BPM 1 d; ¶ diferença estatística ($p < 0,05$) em relação a Cg λ 7d; ‡ diferença estatística ($p < 0,05$) em relação a Cg λ 14d; ‡ diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao controle 7d. Testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

- **Tecido conjuntivo fibroso (fibrose)**

No primeiro dia pós-operatório nenhum animal dos grupos experimentais avaliados apresentou fibrose [Md = 0 (0-0)]. Ao final do sétimo dia, os grupos controle [Md = 1,5 (0-2)], QS-BPM [Md = 2 (1-3)] e QS-APM [Md = 1 (1-3)] já apresentavam formação de tecido fibroso significativamente maior que no primeiro dia ($p < 0,05$), enquanto o grupo CGλ manteve os valores basais. A QS-BPM mostrou os maiores escores de formação de tecido fibroso entre todos os demais grupos no sétimo dia. No entanto, observou-se diferença estatística somente em relação ao grupo CGλ ($p < 0,05$).

Após 14 dias, o grupo QS-BPM exibiu extensa formação de tecido fibroso aos 14 dias, [Md = 3 (2-3)], superior estatisticamente ao grupo QS-APM [Md = 1,5 (0-3)] e CGλ [Md = 1 (1-1)] ($p < 0,05$) e semelhante ao controle [Md = 3 (3-3)] ($p > 0,05$). O grupo QS-APM mostrou formação leve a moderada de tecido fibroso, diferindo estatisticamente dos grupos QS-BPM e controle ($p < 0,05$), com semelhança estatística em relação ao grupo CGλ ($p > 0,05$). O grupo CGλ apresentou leve formação de tecido fibroso, sendo estatisticamente superior ao dia 7 ($p < 0,05$).

Aos 28 dias os grupos QS-BPM [Md = 3 (2-3)], QS-APM [Md = 3 (2-3)] e controle [Md = 3 (3-3)] apresentaram formação de tecido fibroso em grau intenso, com preenchimento quase completo dos campos com tecido conjuntivo fibroso intimamente associado às membranas, e sem diferenças estatísticas entre si ($p > 0,05$). O grupo CG λ apresentou leve formação de tecido fibroso, com escore estatisticamente inferior a todos os demais grupos [1 (0-1)] ($p < 0,05$).

A representação gráfica dos resultados de formação de tecido fibroso está apresentada na figura 17.

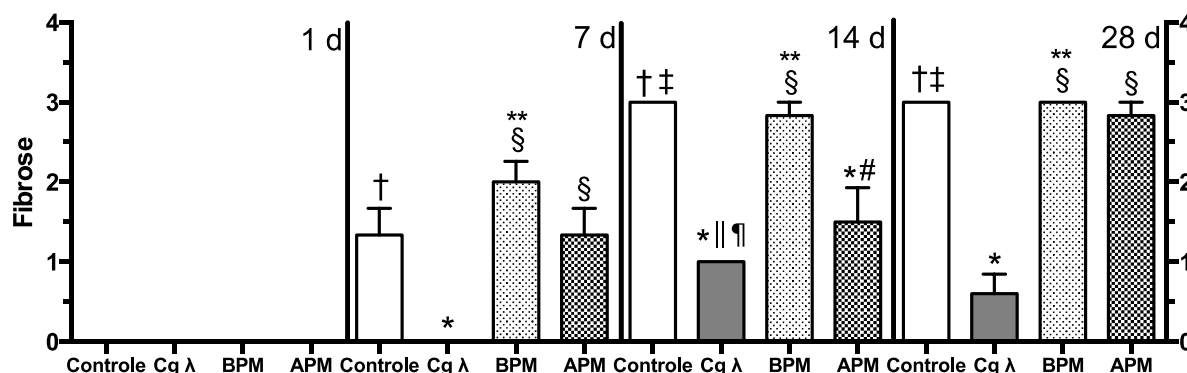


Figura 17 - Curso temporal de presença de tecido fibroso (fibrose) no conjuntivo subcutâneo de ratos dos grupos controle, QS-BPM, QS-APM e Cg λ após 1, 7, 14 ou 28 dias. As barras representam escores que variaram, conforme a área ocupada por tecido fibroso, de 0 (ausente) a 3 (>75%) por 5 campos. *diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao controle no mesmo dia; § diferença estatística ($p < 0,05$) em relação a Cg λ no mesmo dia; † diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao controle 1d; ** diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao BPM 1 d; ‡ diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao controle 7d; †† diferença estatística ($p < 0,05$) em relação a Cg λ 7d; ††† diferença estatística ($p < 0,05$) em relação a Cg λ 1d; # diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao BPM no mesmo dia. Testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

Os dados dos escores de todos os parâmetros histológicos de avaliação da biocompatibilidade estão expressos na tabela 3, no apêndice A. As fotomicrografias representativas de cada grupo ao longo dos 28 dias estão apresentadas nas figuras 18 a 21.

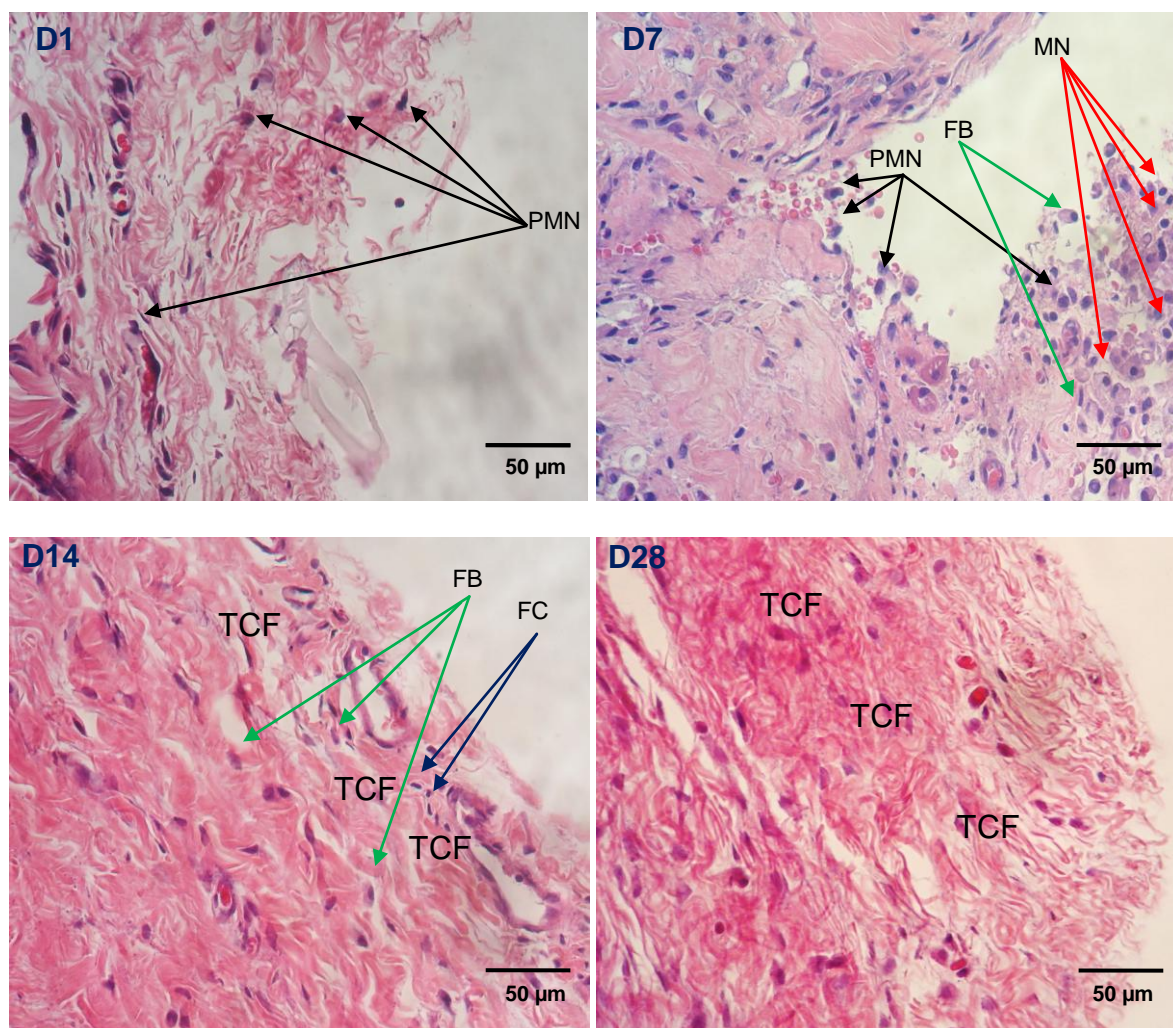


Figura 18 - Fotomicrografias do grupo controle (coloração por HE; aumento de 400x); observa-se leve infiltrado leucocitário nos dias 1 e 7, presença de fibroblastos de tecido de granulação nos dias 7 e 14 e abundante tecido conjuntivo fibroso nos dias 14 e 28. PMN: leucócitos polimorfonucleares; MN: leucócitos mononucleares; FB: fibroblastos; FC: fibrócitos; TCF: tecido conjuntivo fibroso

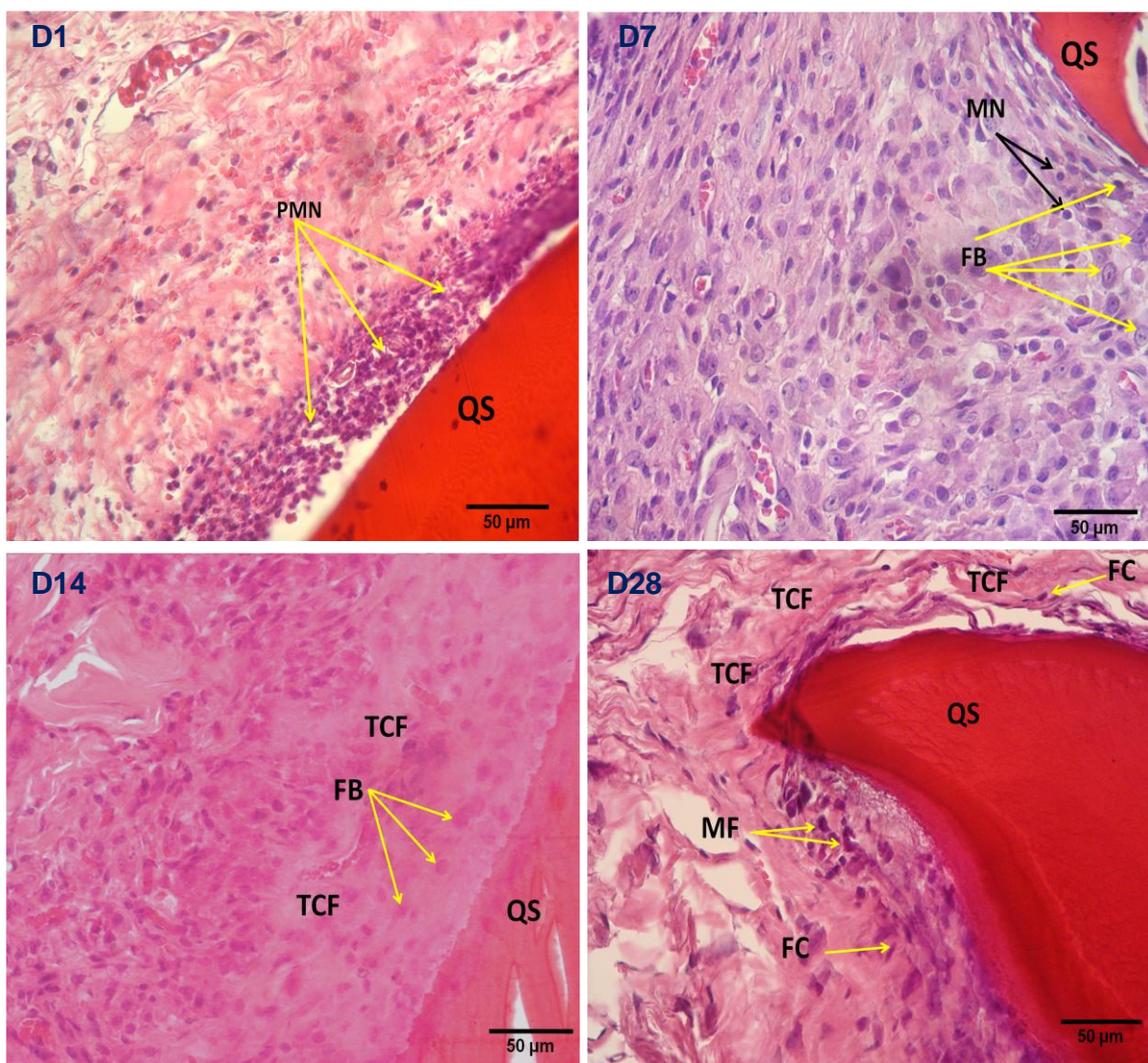


Figura 19 - Fotomicrografias do grupo QS-BPM (coloração por HE; aumento de 400x); dia 1: observa-se intenso infiltrado de leucócitos PMN; dia 7: leve infiltrado leucocitário, com muitos fibroblastos de tecido de granulação nas proximidades da membrana; presença de tecido conjuntivo fibroso abundante nos dias 14 e 28, com fibrócitos e esparsos leucócitos MN. Observa-se íntimo contato do tecido fibroso com a superfície do biomaterial.

PMN: leucócitos polimorfonucleares; MN: leucócitos mononucleares; QS: membrana de quitosana; FB: fibroblastos; FC: fibrócitos; MF: macrófagos; TCF: tecido conjuntivo fibroso.

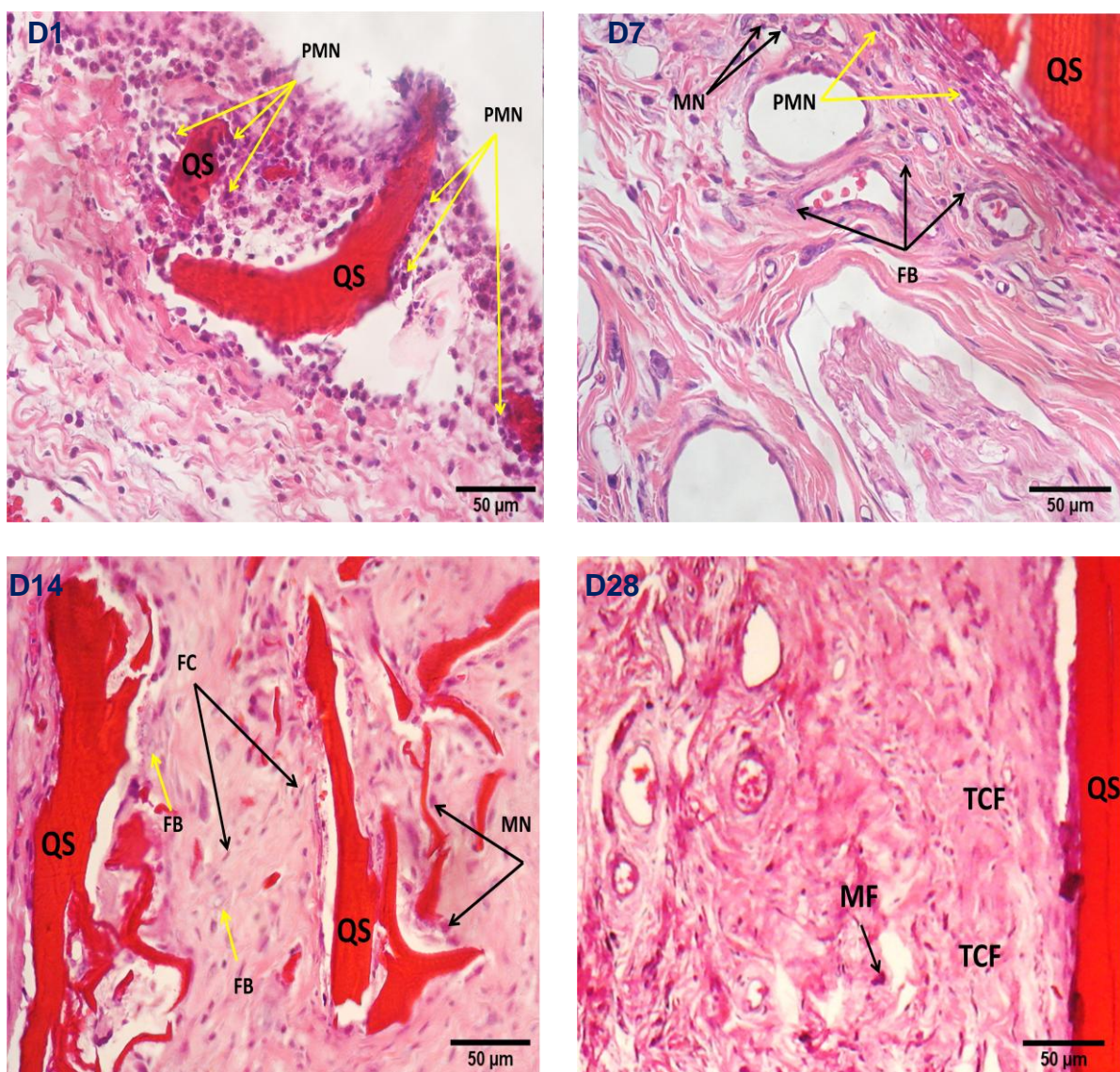


Figura 20 - Fotomicrografias do grupo QS-APM (coloração por HE; aumento de 400x); dia 1: observa-se intenso infiltrado de PMN ao redor dos fragmentos da membrana; dia 7: infiltrado leucocitário leve, com fibroblastos de tecido de granulação dispersos; presença de tecido conjuntivo fibroso no dias 14, com fibroblastos e fibrócitos, sendo abundante no dia 28. Observa-se íntimo contato do tecido fibroso com a superfície do biomaterial.

PMN: leucócitos polimorfonucleares; MN: leucócitos mononucleares; QS: membrana de quitosana; FB: fibroblastos; FC: fibrócitos; MF: macrófagos; TCF: tecido conjuntivo fibroso.

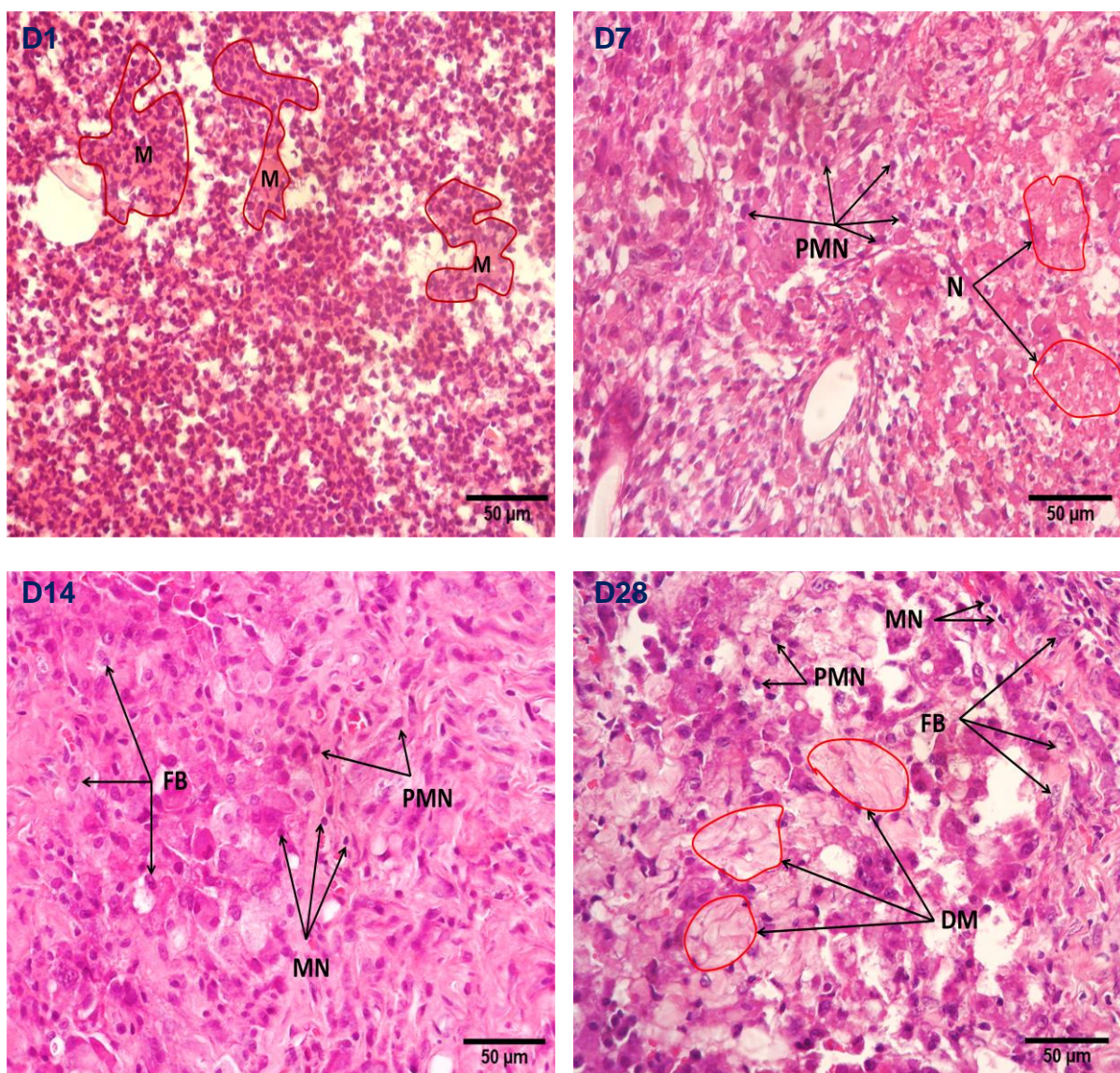


Figura 21 - Fotomicrografias do grupo CG λ (coloração por HE; aumento de 400x); dia 1: observa-se o campo repleto de PMN sobre fragmentos da membrana; dia 7: intenso infiltrado leucocitário, ainda com predominância de PMN e presença de áreas de necrose; dia 14: permanência de infiltrado inflamatório de PMN e MN, com fibroblastos de tecido de granulação dispersos; fragmentos de membrana não visualizados; dia 28: ainda é possível se observar leucócitos PMN e MN, fibroblastos e algumas áreas de tecido conjuntivo fibroso; presença de áreas de degeneração mixoide.

M: fragmentos de membrana; PMN: leucócitos polimorfonucleares; MN: leucócitos mononucleares; N: área de necrose; FB: fibroblastos; DM: áreas de degeneração mixoide.

6.2.3. Análises Imunohistoquímicas

- **Imunomarcção para NFκB**

A avaliação imunohistoquímica para NFκB foi realizada pelo monitoramento da ativação e translocação nuclear da proteína p50.

O percentual de células mostrando imunomarcção citoplasmática para NF-κB apresentou valores semelhantes para os grupos com quitosana e controle, não mostrando diferença significativa entre os três grupos de estudo ao longo dos dias 1, 7 e 14 ($p=0,084$). Tanto os grupos controle (1d: $5,0\pm 2,3$; 7d: $55,0\pm 0,6$; 14d: $8,0\pm 3,5$), QS-BPM (1d: $9,7\pm 1,6$; 7d: $62,0\pm 9,2$; 14d: $16,5\pm 1,4$) e QS-APM (1d: $5,5\pm 0,3$; 7d: $42,0\pm 3,5$; 14d: $15,7\pm 4,8$) mostraram perfis semelhantes, com aumento do dia 1 para o dia 7 e redução no dia 14 (figura 22).

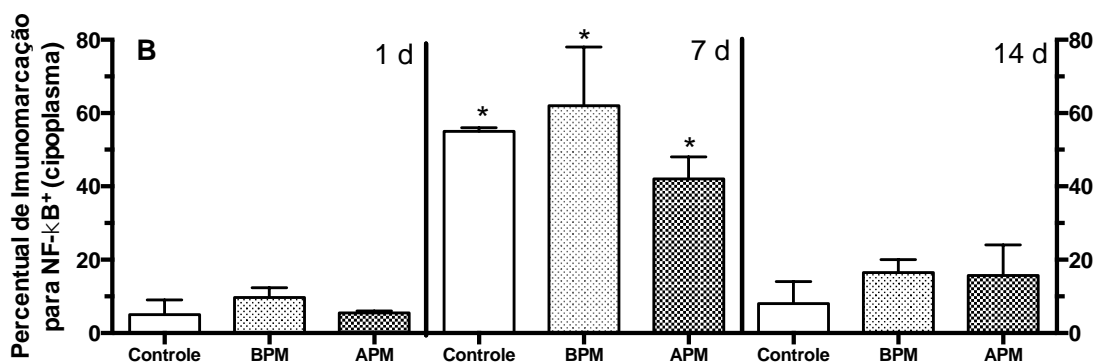


Figura 22: Curso temporal da imunomarcção citoplasmática de NFκB (p50) nos grupos controle, QS-BPM e QS-APM após 1, 7 ou 14 dias; as barras representam a média percentual de células marcadas; * $p < 0,05$ versus controle 1d; Teste 2-way-ANOVA/Bonferroni (Média±EPM).

No entanto, o percentual de células mostrando marcação nuclear para NFκB mostrou comportamento distinto considerando os três grupos experimentais ($p=0,012$). No dia 1, os grupos QS-BPM ($8,2\pm 1,3$) e QS-APM ($8,1\pm 1,1$) mostraram um percentual significativamente maior de células com marcação nuclear para NFκB que o grupo controle ($1,8\pm 0,7$) ($p < 0,05$).

Aos sete dias, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos QS-APM ($11,2\pm 2,2$) e o grupo controle ($12,0\pm 3,5$). No entanto, o grupo QS-BPM ($5,0\pm 0,6$) mostrou um percentual estatisticamente menor de células com marcação nuclear para NF-κB em relação aos grupos controle e QS-APM ($p < 0,05$).

Após 14 dias, os grupos controle ($1,7 \pm 0,4$), QS-BPM ($2,7 \pm 0,8$) e QS-APM ($6,9 \pm 2,4$) apresentaram uma redução no percentual de células imunomarcadas, mostrando valores estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$) e próximos aos valores basais. Os resultados estão apresentados graficamente na figura 23.

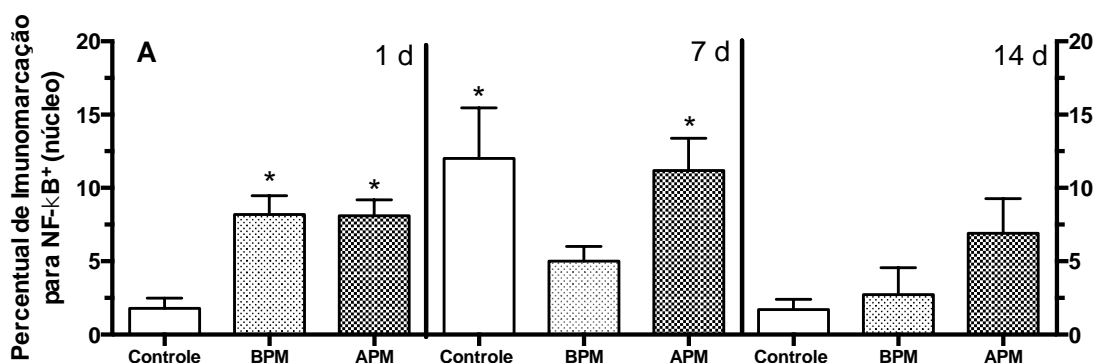


Figura 23: Curso temporal da imunomarcação nuclear de NFκB (p50) nos grupos controle, QS-BPM e QS-APM após 1, 7 ou 14 dias; as barras representam a média percentual de células marcadas; * $p < 0,05$ versus controle 1d; Teste 2-way-ANOVA/Bonferroni (Média±EPM).

A relação entre a imunomarcação nuclear e a citoplasmática indica a atividade de transcrição nuclear do NF-κB. A figura 24 mostra esta relação para os três grupos analisados, ao longo dos dias 1, 7 e 14. No dia 1, o grupo QS-BPM mostrou uma relação próxima a um ($1,0 \pm 0,3$), sendo estatisticamente semelhante ao controle ($0,5 \pm 0,1$).

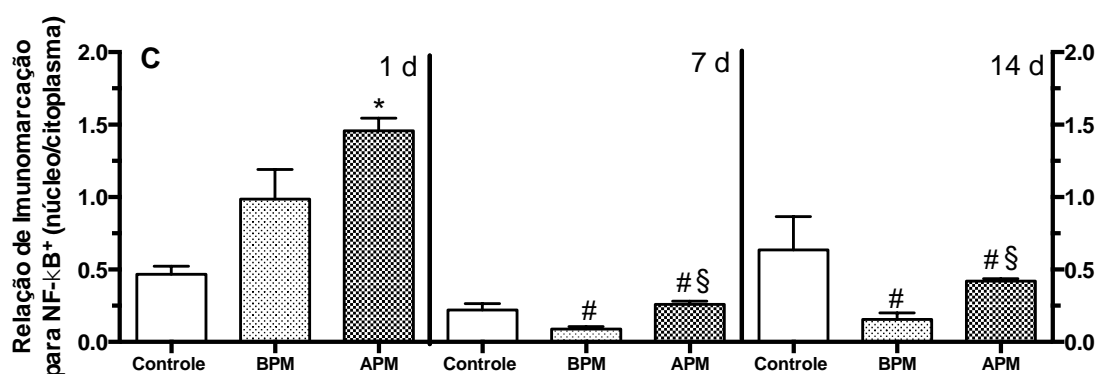


Figura 24: Relação entre imunomarcação nuclear/citoplasmática para NFκB (p50) nos grupos controle, QS-BPM e QS-APM ao longo do curso temporal; *, #, § $p < 0,05$ em relação a controle, BPM e APM 1d, respectivamente. Teste 2-way-ANOVA/Bonferroni (Média±EPM).

O grupo QS-APM apresentou uma relação maior que um ($1,5\pm 0,1$), sendo estatisticamente superior ao controle ($p = 0,005$). Nos dias 7 e 14, a relação de imunomarcção núcleo/citoplasma não mostrou diferença significativa entre os grupos controle (7d: $0,2\pm 0,1$; 14d: $0,6\pm 0,3$), QS-BPM (7d: $0,1\pm 0,1$; 14d: $0,2\pm 0,1$) e QS-APM (7d: $0,3\pm 0,2$; 14d: $0,4\pm 0,1$) ($p > 0,05$). As fotomicrografias das análises de IHQ para NF- κ B estão ilustradas nas figuras 25 a 27.

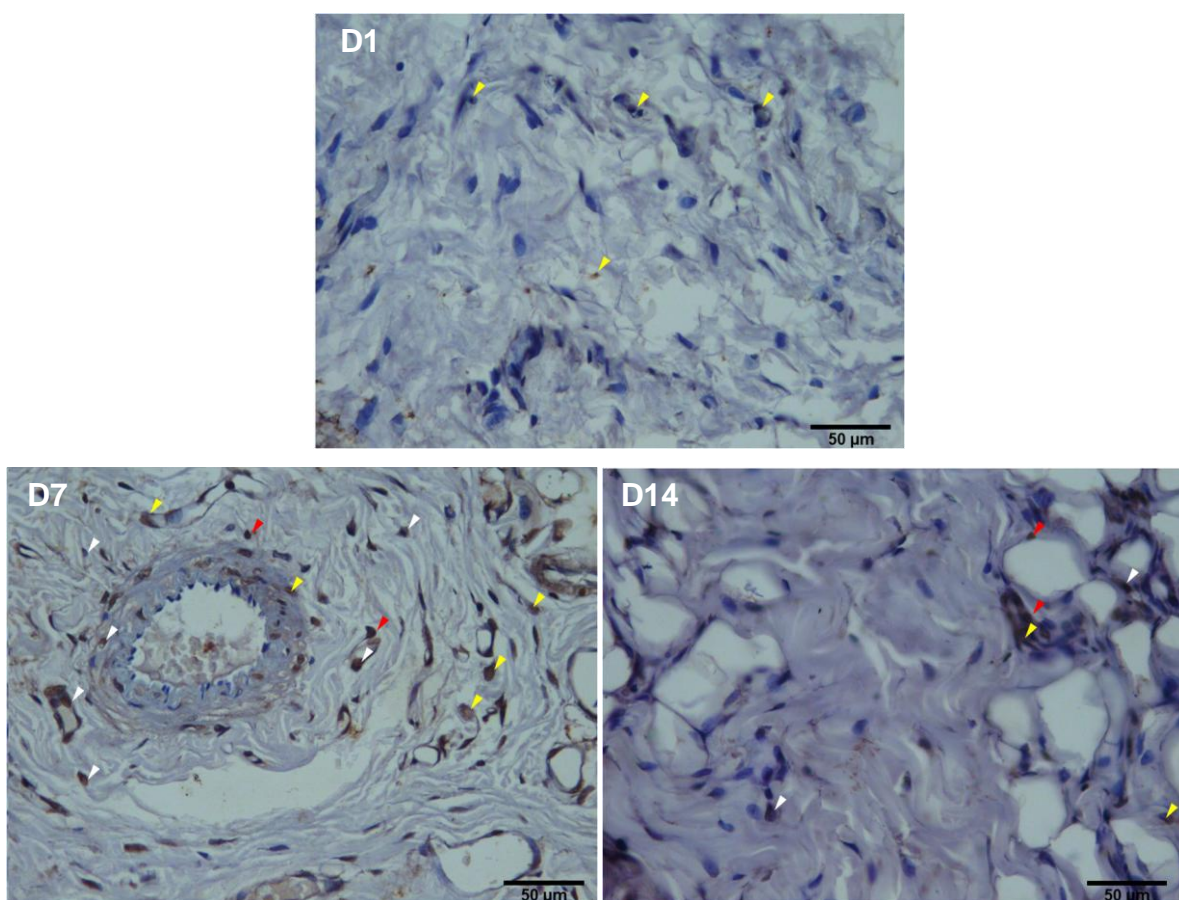


Figura 25: Fotomicrografias de campos representativos do grupo controle para imunomarcção de NF- κ B (p-50) ao longo dos dias 1, 7 e 14; setas amarelas: imunomarcção citoplasmática; setas brancas: imunomarcção nuclear; setas vermelhas: imunomarcção citoplasmática e nuclear (coloração por DAB/Hematoxilina; aumento 400x).

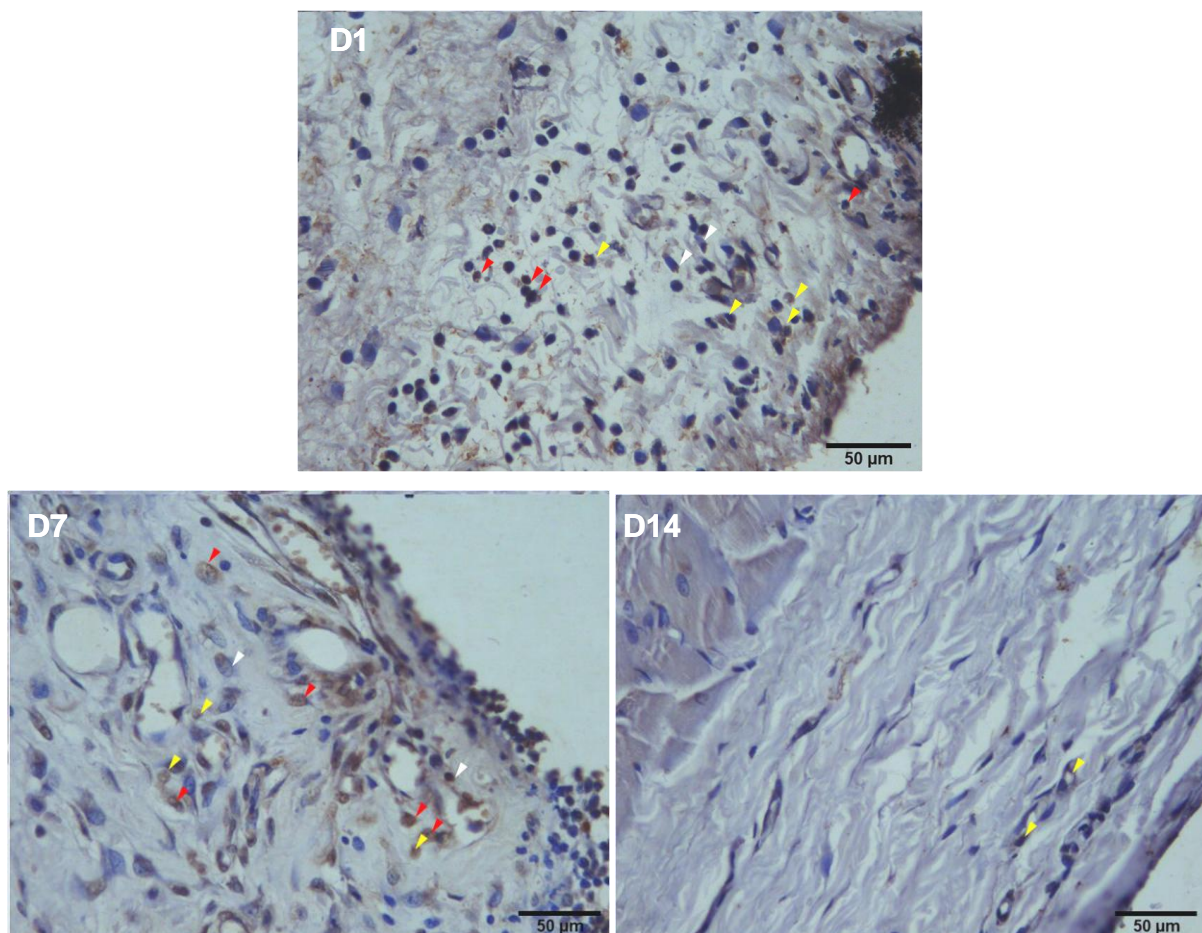


Figura 26: Fotomicrografias de campos representativos do grupo QS-BPM para imunomarcção de NF-kB (p-50) ao longo dos dias 1, 7 e 14; setas amarelas: imunomarcção citoplasmática; setas brancas: imunomarcção nuclear; setas vermelhas: imunomarcção citoplasmática e nuclear (coloração por DAB/Hematoxilina; aumento 400x).

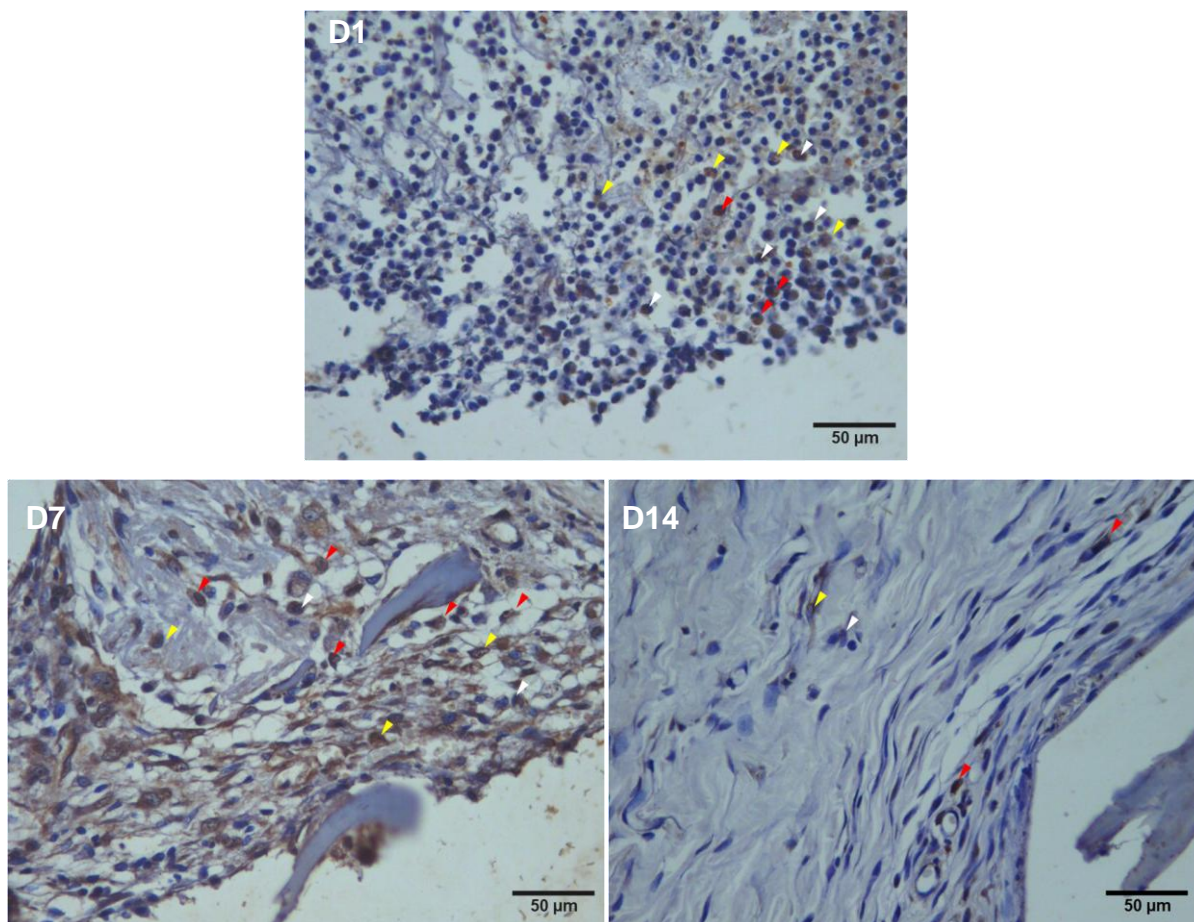


Figura 27: Fotomicrografias de campos representativos do grupo QS-APM para imunomarcação de NF- κ B (p-50) ao longo dos dias 1, 7 e 14; setas amarelas: imunomarcação citoplasmática; setas brancas: imunomarcação nuclear; setas vermelhas: imunomarcação citoplasmática e nuclear (colora o por DAB/Hematoxilina; aumento 400x).

• Imunomarcção para FGF-b

A quantidade de células apresentando imunoposição positiva para FGF-2 mostrou diferença estatisticamente significativa no primeiro dia, com o grupo QS-BPM apresentando percentual médio ($21,8 \pm 0,3$) de células marcadas significativamente maior que o grupo QS-APM ($4,2 \pm 0,2$) e o grupo controle ($6,4 \pm 1,5$) ($p < 0,001$).

Ao sétimo dia, ambos os grupos com quitosana apresentaram valores percentuais de células imunomarcadas superiores estatisticamente ao controle ($19,2 \pm 1,2$) ($p < 0,001$), sendo que os grupos QS-BPM ($64,5 \pm 3,2$) e QS-APM ($59,5 \pm 7,8$) não apresentaram diferença estatística entre si ($p > 0,05$).

No 14º dia, a diferença entre os grupos com quitosana e o controle, quanto ao percentual de imunoposição para FGF-2, se manteve estatisticamente significativa ($p < 0,001$). O grupo controle apresentou um valor próximo ao basal ($2,9 \pm 0,3$), enquanto os grupos QS-BPM ($27,5 \pm 6,1$) e QS-APM ($35,5 \pm 8,4$) mantiveram valores significativamente maiores, mas sem diferenças estatísticas entre si ($p > 0,05$). Os resultados estão apresentados graficamente na figura 28. As fotomicrografias das análises de IHQ para FGF-2 estão ilustradas na figura 29.

Os dados de todos os valores percentuais de imunomarcção para escores de todos os parâmetros histológicos de avaliação da biocompatibilidade para NFkB e FGF-2 estão expressos na tabela 4 do apêndice B.

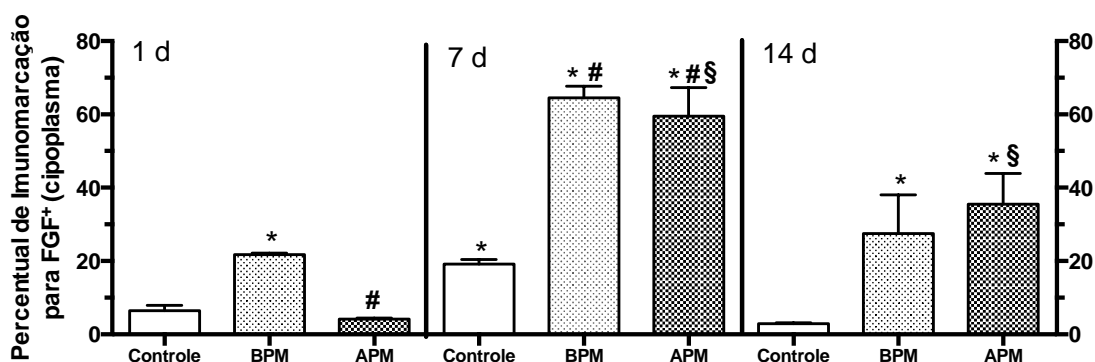


Figura 28: Curso temporal da imunomarcção para FGF-2 nos grupos controle, QS-BPM e QS-APM após 1, 7 ou 14 dias; as barras representam a média percentual de células marcadas; *, #, § $p < 0,05$ versus controle, BPM e APM 1d, respectivamente; Teste 2-way-ANOVA/Bonferroni (Média±EPM).

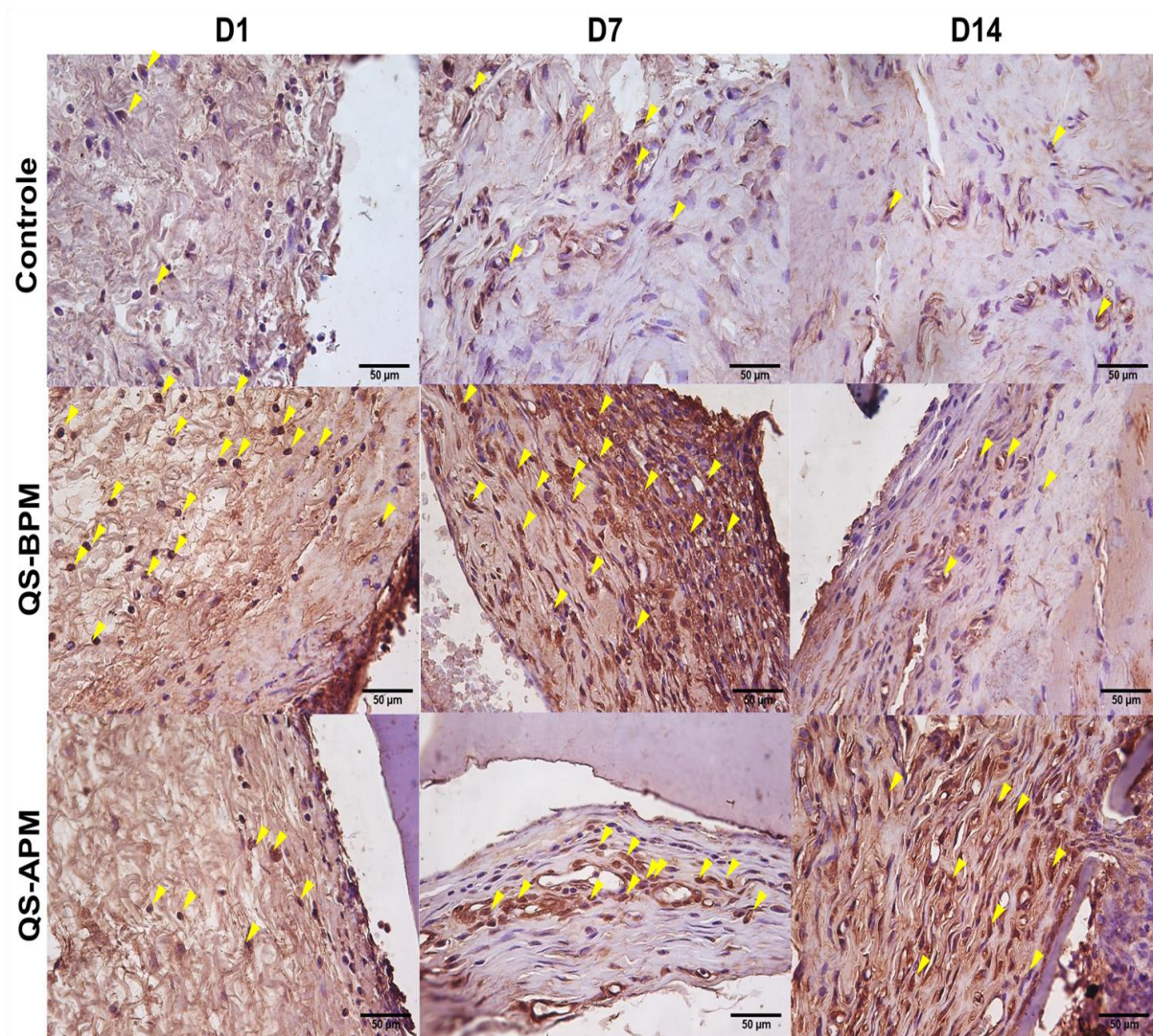


Figura 29: Fotomicrografias de campos representativos de imunomarcção para FGF-2 nos grupos controle, QS-BPM e QS-APM ao longo dos dias 1, 7 e 14; setas amarelas: imunomarcção citoplasmática (coloração por DAB/Hematoxilina; aumento 400x).

7. DISCUSSÃO

Os avanços obtidos em engenharia tecidual e medicina regenerativa devem-se, em grande parte, ao imenso volume de pesquisas com biomateriais para a regeneração de tecidos. A quitosana (QS), um polissacarídeo de origem natural, tem sido objeto de inúmeros estudos, desde há mais de duas décadas até o presente, sobre seu potencial de aplicação como *scaffold* para regeneração tecidual (MUZZARELLI *et al.*, 1993; WANG *et al.*, 2016). A reatividade química da quitosana possibilita sua modificação estrutural através da combinação com diversas outras moléculas e polímeros. Ao mesmo tempo em que esta característica amplia o leque de possibilidades de aplicação da QS, também dificulta o estabelecimento de correlações entre os estudos e protocolos consensuais, tamanha a variabilidade de características das quitosanas utilizadas nos trabalhos.

A obtenção da QS é feita a partir da reação de desacetilação da quitina, que por sua vez pode ser proveniente de diversas fontes, como o exoesqueleto de crustáceos, insetos e parede celular de diversos fungos. A procedência da quitina e as condições empregadas na sua desacetilação (tempo e temperatura de reação, concentração de reagentes e tamanho de partículas da quitina) afetam as características físico-químicas da QS, o que explica a grande variabilidade de seus principais parâmetros, como a massa molar (MM) e o grau de desacetilação (GD), nas formulações disponíveis comercialmente (DI MARTINO *et al.*, 2005). De fato, esta variabilidade pode ser constatada nos estudos revisados neste trabalho, com a MM variando desde 22 kDa (CHEN, X. *et al.*, 2011) até 1800 kDa (WEI *et al.*, 2011). Devido a grande variação de MM, a QS é usualmente classificada como de baixo PM (até 150 kDa), médio PM (de 150 a 700 kDa) ou alto PM (acima de 700 kDa) (WONG, 2009). No presente trabalho, foram utilizadas amostras comerciais de QS especificadas pelo fabricante como de baixo peso molecular (BPM) e alto peso molecular (APM), com MM variando de 50 kDa a 190 kDa (BPM) e de 310 kDa a 375 kDa, e GD na faixa de 75 a 85%. Os resultados de determinação da MM por GPC mostram que a QS-APM apresentou valor médio de massa molar ponderada (M_w) de 467,21 kDa, enquanto a QS-BPM apresentou valor de M_w de 157,83 kDa, ambas na forma de pó. Tomando como referência a classificação de Wong, tanto a QS-APM como a QS-BPM mostraram valores discrepantes, estando a primeira abaixo de 700 kDa e a segunda acima de 150 kDa. Considerando as especificações do fabricante,

a amostra QS-APM apresentou valores de MM superiores ao especificado, enquanto a amostra de QS-BPM encontrava-se dentro da faixa estabelecida. Dessa forma, ambas as amostras podem ser consideradas de médio peso molecular, levando em conta a terminologia descrita na literatura, o que revela a divergência entre as nomenclaturas utilizadas (BPM e APM) e os valores de MM. Quanto ao GD, as amostras apresentaram valores dentro da faixa declarada pelo fabricante (75 a 85%) e com mínima variação entre as amostras (< 3,0%). Levando-se em conta a variabilidade de GD das quitosanas disponíveis na literatura, da ordem de 30% a 95% (RODRIGUEZ-VAZQUEZ *et al.*, 2015), os valores de GD obtidos no presente estudo podem ser considerados homogêneos. Assim, a análise da influência da MM sobre a biocompatibilidade pode ser considerada mais representativa quando se utiliza amostras de QS com valores praticamente constantes de GD, o que está em concordância com o estudo de Mecwan *et al* (2011).

A seleção de quitosanas com valores extremos de MM neste estudo teve como objetivo avaliar amostras as mais divergentes possíveis quanto a MM, sem variações significativas no GD. Dessa forma, seria mais provável a detecção de possíveis diferenças no comportamento biológico das quitosanas em função da variável MM. No entanto, as análises de determinação de MM revelaram que as amostras tinham valores de MM relativamente próximos, considerando a variação existente na literatura, o que poderia implicar em uma maior dificuldade na identificação de diferenças atribuídas à MM. Importante observar que, após o processamento da quitosana para obtenção das membranas e a esterilização por ultravioleta (UV), os valores de MM ficaram ainda mais próximos, com a membrana de QS-APM apresentando M_w de 221,71 kDa e a QS-BPM com M_w de 174,46 kDa. Enquanto a QS-APM sofreu uma considerável redução de MM após o processamento e a esterilização, observou-se um discreto aumento de MM na QS-BPM. A redução da MM pode ser atribuída a fatores físicos que ocasionariam a degradação da cadeia polimérica, como as variações de temperatura durante manuseio e armazenamento, o processo de liofilização e, sobretudo, os métodos utilizados para sua esterilização (HARDING, 2010; MECWAN *et al.*, 2011).

A esterilização de biomateriais é indispensável para sua implantação em animais, de forma a prevenir a ocorrência de infecções. Os métodos mais comumente empregados para esterilização de biomateriais à base de quitosana são a irradiação por raios gama e por UV, pois consistem em métodos simples e que não

utilizam agentes químicos ou altas temperaturas, que poderiam introduzir contaminantes ou causar a degradação térmica de sua cadeia polimérica (LIM *et al.*, 1998; WASIKIEWICZ *et al.*, 2005). Neste trabalho, a radiação UV foi o método de escolha por sua simplicidade e eficácia, por não alterar significativamente as propriedades físico-químicas de *scaffolds* poliméricos (FISCHBACH *et al.*, 2001) e por não afetar a morfologia, as características químicas ou a citocompatibilidade da quitosana (MIRANDA *et al.*, 2016). No entanto, não há consenso na literatura sobre o método ideal de esterilização.

Enquanto os resultados do trabalho de Miranda *et al* (2016) mostraram que a esterilização por UV ou raios gama não alteraram propriedades físico-químicas da QS, Wasikiewicz *et al* (2005) demonstraram que tanto a irradiação por UV como por raios gama causaram fotodegradação da QS, reduzindo drasticamente sua MM em 98,5%. Esta degradação quase completa observada naquele estudo pode ser atribuída à utilização da QS em solução de ácido acético e com alto grau de desacetilação (100%). Quitosanas altamente desacetiladas seriam muito reativas, em virtude da quantidade de grupos amino, o que as tornariam mais instáveis e susceptíveis à degradação (COSTA SILVA *et al.*, 2006; KIM, I. Y. *et al.*, 2008; YOUNES e RINAUDO, 2015). No presente trabalho, os resultados mostraram também uma redução da MM após irradiação por UV, mas em menor magnitude, da ordem de 52,5% para a QS-APM. Em contrapartida, na amostra de QS-BPM não se observou qualquer redução da MM. Na verdade, houve um aumento, provavelmente sem significância estatística, de cerca de 10% no valor de MM dessa amostra após a fabricação e esterilização da membrana. Não foram encontrados relatos na literatura em que tenha sido observado aumento da MM de polímeros após irradiação por UV. Este acréscimo no valor de MM observado no presente estudo pode representar, na verdade, uma variação dentro da faixa de massas molares das diferentes cadeias poliméricas existentes nas amostras de QS-BPM. Os índices maiores de polidispersividade (IP) dessas amostras (1,70 e 1,58), em relação à QS-APM (1,16 e 1,27), indicam sua maior heterogeneidade, o que poderia explicar o aumento numérico da M_w observado na QS-BPM após a irradiação por UV (EBEWELE, 2000; VIEIRA, 2008). A própria especificação do fabricante sugere uma faixa mais ampla de MM nessa amostra, com uma possível variação superior a 73%, enquanto na QS-APM a faixa de variação de MM é bem mais estreita, na ordem de 17%. De toda forma, os resultados deste estudo sugerem que a QS de maior MM parece ter sido

mais susceptível à degradação polimérica por UV que a de menor MM, o que corrobora alguns trabalhos na literatura que indicam que polímeros de cadeias maiores sofrem fotodegradação mais acentuada que polímeros de cadeias menores (REBOLLAR *et al.*, 2006; SUN *et al.*, 2008; YOUSIF e HADDAD, 2013).

A biocompatibilidade de um material está intimamente relacionada às suas interações com células e tecidos e à resposta induzida nestes pelo contato com o material. A QS tem sido considerada na literatura como biocompatível. Quase todos os trabalhos que a abordam como biomaterial referem-se ao polímero como um material atóxico e biologicamente compatível. No entanto, muitas vezes a biocompatibilidade é assumida com base apenas na sua baixa toxicidade sistêmica, avaliada em testes de toxicidade oral, ou em avaliações de citotoxicidade *in vitro* (BALDRICK, 2010; LI *et al.*, 2012). Em outras situações, biomateriais à base de quitosana são implantados em animais assumindo-se sua biocompatibilidade sem maiores avaliações, baseando-se apenas em revisões de literatura (DANILCHENKO *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2015) ou, segundo afirmam Rodrigues *et al.* (2012), na aprovação por agências regulatórias, como por exemplo a americana FDA (do inglês *Food and Drug Administration*). Nos Estados Unidos, a quitosana é aprovada para uso como biomaterial somente como bandagens para lesões de pele (RODRIGUES *et al.*, 2012; BELLICH *et al.*, 2016). Todavia, a biocompatibilidade deve ser entendida como um conceito tecido-dependente, o que significa que um biomaterial pode ser biocompatível em um determinado tecido e não biocompatível em outro (WILLIAMS, 2008; CHEN e THOUAS, 2015a). Por esta razão, as agências regulatórias não concedem aprovação de um biomaterial de forma genérica, mas para uma aplicação específica, em função das condições avaliadas nas diversas fases da validação. No caso da quitosana, a questão da biocompatibilidade torna-se mais complexa devido à enorme heterogeneidade existente entre as formas comercialmente disponíveis ou investigadas nos estudos. Além da grande variabilidade das características intrínsecas da QS, como o GD e MM, esta diversidade aumenta exponencialmente devido às inúmeras modificações químicas e associações da QS com outros compostos ou biomateriais que são avaliadas na literatura.

A massa molar da quitosana é um parâmetro que define diversas outras propriedades, estando bem estabelecida sua influência sobre a cristalinidade, solubilidade e biodegradação da QS (RINAUDO, 2006; LI *et al.*, 2007; KIM, I. Y. *et*

al., 2008). Quanto maior a MM da cadeia polimérica, maior sua cristalinidade e menor sua solubilidade. Em relação a biodegradação, parece haver uma relação inversa entre a MM e a velocidade de degradação, embora Hsu *et al* tenham obtido resultados indicando um aumento da biodegradação *in vitro* com QS de maior MM (HSU *et al.*, 2004). Os parâmetros mencionados, cristalinidade, solubilidade e biodegradação, são considerados essenciais na atividade biológica de biomateriais, e, por consequência, podem afetar sua biocompatibilidade (WILLIAMS, 2008; CHEN e THOUAS, 2015a). No entanto, poucos estudos investigando a influência da MM da QS em sua biocompatibilidade foram encontrados, e nenhum deles avaliou esta influência *in vivo* (CHEN *et al.*, 2002; HSU *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2007; TANGSADTHAKUN *et al.*, 2007; MECWAN *et al.*, 2011).

Estudos *in vivo* são considerados essenciais para a determinação da biocompatibilidade de qualquer material. Ainda que os estudos *in vitro* procurem simular de forma mais fidedigna possível os sistemas vivos, selecionando células específicas e muitas vezes adicionando fatores de crescimento na cultura, muitas variáveis não podem ser reproduzidas em culturas de células, como por exemplo as diversas vias de sinalização, interdependentes, que ocorrem entre as células e as interações complexas existentes entre células e MEC em um organismo vivo (RODRIGUES *et al.*, 2012; BELLICH *et al.*, 2016). Assim, estudos *in vivo* como este são importantes para se investigar o possível efeito da MM sobre a biocompatibilidade da QS, e objetivam preencher lacunas existentes na literatura sobre esta questão, cuja relevância é enfatizada em recentes trabalhos (FELICE *et al.*, 2015; BELLICH *et al.*, 2016). De fato, em um trabalho de revisão sistemática da literatura elaborado pelo autor, constatou-se que 47,5% dos estudos com biomateriais à base de QS utilizados em regeneração tecidual *in vivo* nos últimos cinco anos sequer mencionaram os valores de MM da QS, e apenas 3,3% dos estudos consideraram a variação de MM na análise e interpretação dos resultados (dados não publicados). A constatação de que existe um certo desconhecimento sobre a relação entre as propriedades intrínsecas da QS e os seus efeitos biológicos como biomaterial é corroborada por Bellich *et al* (2016). Parece evidente, portanto, que a importância da MM sobre os efeitos biológicos da QS ainda não é bem compreendida e os autores não tem dado a devida importância a este parâmetro. No presente trabalho, os resultados histológicos mostraram semelhanças e diferenças no comportamento biológico das quitosanas de diferentes massas molares.

No que diz respeito ao infiltrado inflamatório leucocitário, tanto a QS-BPM como a QS-APM apresentaram perfis semelhantes, não diferindo estatisticamente entre si. Ambas induziram intenso infiltrado de PMN no primeiro dia, diminuindo significativamente no sétimo dia para um grau leve de infiltrado, o que denota uma boa resolução do processo inflamatório, que assim se manteve até o 28º dia, semelhante ao controle. Quando comparadas ao controle pró-inflamatório de carragenina-lambda (CG λ), as membranas de quitosana não diferiram estatisticamente no primeiro dia, mas apresentaram escores significativamente inferiores no sétimo dia, e se mantiveram menores no 14º e 28º dias, embora sem diferença estatística. No entanto, a evolução do processo inflamatório mostrou diferenças marcantes entre os grupos com quitosana e com Cg λ . Neste último, os escores de infiltrado inflamatório permaneceram elevados no sétimo dia, com extensas áreas de necrose, enquanto os grupos com quitosana mostraram escores semelhantes ao controle desde o dia sete até o dia 28, sem presença de áreas de necrose.

Apesar de não mostrar diferença estatística em relação ao controle e às quitosanas ao final do experimento, o contato do tecido com CG λ resultou em áreas de degeneração mixoide, que não foram observadas nos grupos com QS. Portanto, os resultados da análise de infiltrado inflamatório leucocitário mostram que as amostras de quitosana apresentaram biocompatibilidade, induzindo uma resposta inflamatória mínima e semelhante ao controle após sete dias. A inflamação aguda observada no primeiro dia pode ser considerada uma resposta normal ao contato inicial do tecido com um material estranho, o que não ocorreu com o grupo controle, no qual nenhum material foi implantado (BROWN e BADYLAK, 2014; CHEN e THOUAS, 2015c). Resultados semelhantes foram observados por Miranda *et al* (2011) e Han *et al* (2014), que relataram intenso infiltrado inflamatório de leucócitos PMN na implantação de *scaffolds* à base de QS no osso alveolar de ratos (MIRANDA *et al.*, 2011) e no tecido cutâneo de coelhos (HAN *et al.*, 2014), mesmo após cinco dias. Todavia, houve uma resolução quase completa do processo inflamatório após 15 e 21 dias naqueles estudos, de forma semelhante aos resultados observados neste trabalho.

Segundo Anderson *et al* (2004) o que caracteriza a biocompatibilidade de um material é, mais que a intensidade do processo de inflamação, a duração dos

eventos da resposta inflamatória e a rapidez de sua resolução. Contudo, não se observou, no presente trabalho, influência da MM sobre a biocompatibilidade da QS, quanto ao infiltrado leucocitário. Os resultados histológicos foram compatíveis com o aspecto macroscópico observado nos tecidos ao longo dos 28 dias.

A análise histológica do tecido de granulação evidenciou que nenhum dos grupos experimentais ou controles apresentou formação desse tecido no primeiro dia. Este achado está de acordo com a literatura, que indica que o tecido de granulação inicia sua formação no mínimo após três dias da lesão inicial (KUMAR *et al.*, 2005a). De fato, no sétimo dia, observou-se no grupo controle uma discreta formação de tecido de granulação, enquanto no grupo CG λ , cujo estímulo inflamatório determinara uma maior ocorrência de infiltrado leucocitário, não houve qualquer formação desse tecido. Esses dados também estão de acordo com a literatura, uma vez que uma resposta inflamatória intensa e aguda tem seu processo de cronificação e reparo postergados quando comparados a estímulos leves, como é o caso do grupo controle, em que apenas a ferida cirúrgica foi realizada, sem implantação de biomaterial, o que caracteriza a cicatrização por primeira intenção (KUMAR *et al.*, 2005b). Por outro lado, ambas as quitosanas implantadas causaram uma proliferação de fibroblastos nas proximidades das membranas, em íntima associação com sua superfície, indicando a formação de tecido de granulação em grau leve a moderado. O grupo QS-BPM mostrou uma formação moderada de tecido de granulação, diferindo estatisticamente do controle e mais ainda da Cg λ . Esse dado sugere que a QS-BPM parece ter induzido uma formação mais precoce e intensa de tecido de granulação que os controles, o que poderia indicar alguma atividade deste material sobre a proliferação de fibroblastos, sugerida por alguns autores (UENO *et al.*, 2001; TANGSADTHAKUN *et al.*, 2007). Embora não tenham sido observadas diferenças estatísticas entre as quitosanas de diferentes MM, a QS-APM não demonstrou diferença estatística em relação ao controle, o que pode denotar uma menor intensidade de indução desse material sobre a formação de tecido de granulação. Em comparação à Cg λ , cujo potencial inflamatório é considerado intenso, ambas as quitosanas mostraram uma diferença significativa, evidenciando o comportamento biocompatível das membranas.

Prosseguindo no curso temporal, no 14^o dia observa-se que o tecido de granulação no grupo controle praticamente desaparece, enquanto o grupos de

quitosana mostram uma tendência à redução. A QS-BPM mostra ainda significativa diferença em relação ao controle, o que não ocorre com a QS-APM. Em contrapartida, o grupo CG λ mostra um aumento significativo de tecido de granulação em relação ao sétimo dia, confirmando o retardamento do processo inflamatório nesse grupo. Após 28 dias, os escores de tecido de granulação dos grupos com quitosana e o controle retornaram ao valor basal, enquanto o grupo CG λ mostrou um aumento significativo, com formação moderada a intensa de tecido de granulação, coerente com o seu perfil inflamatório.

De fato, segundo Anderson *et al* (2004), o tecido de granulação representa uma marca registrada da fase de reparo do processo inflamatório, caracterizando-se por intensa proliferação de fibroblastos jovens, síntese de MEC e neovascularização. Assim, o início precoce da formação de tecido de granulação indica uma resolução mais rápida da inflamação aguda, favorecendo o reparo da lesão tecidual. A QS-BPM apresentou grande proliferação de fibroblastos já no sétimo dia, superior ao controle e a Cg λ , sugerindo que este material promoveu maior proliferação de fibroblastos no tecido conjuntivo, que se manteve até o 14º dia. Estes resultados indicam que a quitosana, sobretudo a de menor massa molar, favoreceu a proliferação de fibroblastos e a aceleração da regeneração de tecido conjuntivo, estando em concordância com alguns estudos na literatura, que observaram maior proliferação de fibroblastos e síntese de MEC *in vitro* com quitosanas de baixo PM (UENO *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2002; TANGSADTHAKUN *et al.*, 2007). Há que se destacar que nestes trabalhos, os melhores resultados foram obtidos utilizando-se quitosanas de massas molares variando de 3,2 a 74 kDa, bem inferiores, portanto, a QS de 174 kDa utilizada no presente estudo. Em contrapartida, Hsu *et al* (2004) não observaram qualquer efeito estimulador de filmes de quitosana de MM variando de 180 a 340 kDa sobre a adesão e proliferação de fibroblastos *in vitro*, concluindo que a MM não influenciaria na biocompatibilidade da QS. No entanto, as diferenças entre as metodologias são muito significativas. Os estudos mencionados foram realizados *in vitro*, utilizando QS associada a outros materiais, como o alginato e o colágeno, na forma de filmes ou em solução, o que torna a comparação entre os resultados difícil e não conclusiva.

A avaliação histológica da formação de tecido fibroso mostrou resultados semelhantes ao tecido de granulação, no que diz respeito à comparação entre QS-

BPM e QS-APM, com ausência total no primeiro dia. A partir do sétimo dia, observou-se um significativo aumento de tecido fibroso nos grupos controle e com membranas de QS, mas sem diferenças estatísticas entre eles, ao contrário do grupo CG λ , onde a formação de tecido fibroso ainda não houvera iniciado em virtude da intensidade e longevidade da resposta inflamatória inicial, o que condiz com a ausência de tecido de granulação observada no sétimo dia. Contudo, no 14^o dia, a QS-BPM mostrou formação de tecido fibroso em grau intenso, significativamente maior que a QS-APM e CG λ e semelhante ao controle, indicando uma regeneração mais precoce do tecido conjuntivo. Somente no dia 28, os escores de tecido fibroso das duas membranas de QS atingiram valores semelhantes, juntamente com o controle.

Esses dados sugerem que a membrana de QS-BPM favoreceu uma regeneração mais rápida do tecido conjuntivo, indicando sua maior biocompatibilidade, o que seria esperado a partir dos resultados observados na formação de tecido de granulação, uma vez que o tecido fibroso é produzido exatamente pelos fibroblastos que sintetizam a MEC, inicialmente rica em proteoglicanos e posteriormente em fibras colágenas. Assim, os resultados de formação de tecido fibroso confirmam a maior proliferação de fibroblastos observada com a QS-BPM. Este possível efeito estimulador da QS de baixo PM sobre a síntese de MEC e fibras colágenas é relatado na literatura (UENO *et al.*, 1999; SHI *et al.*, 2006; MUZZARELLI, 2009), embora não tenham sido feitas, nesses estudos, comparações com quitosanas de maior massa molar.

É importante destacar que no modelo animal utilizado neste estudo, com implantação de biomateriais em tecido subcutâneo, que é um tecido conjuntivo propriamente dito, a formação de tecido fibroso representa exatamente a regeneração tecidual, com a re-estruturação da arquitetura original do tecido com fibras colágenas, predominantemente dos tipos I e III. Este processo é diferente de um reparo cicatricial por fibrose, onde ocorre a substituição de um tecido especializado (por exemplo epitélio ou tecido muscular) por tecido conjuntivo fibroso após uma lesão, ocasionando perda ou limitação da função (CHEN e THOUAS, 2015c; b). Portanto, os resultados obtidos pela análise histológica da formação de tecido fibroso sugerem que a QS-BPM apresentou maior biocompatibilidade e pareceu induzir mais precocemente a regeneração do tecido conjuntivo que a QS-APM. Este efeito não pode ser interpretado de maneira análoga para outros tecidos,

onde a fibrose indicaria um reparo cicatricial com perda de função, o que não seria desejável para um biomaterial com aplicação em regeneração tecidual.

Os resultados aqui apresentados, no que concerne à formação de tecido fibroso, divergem de outros estudos, em que não se constatou influência da MM sobre adesão e proliferação celular *in vitro* (SUPHASIROJ *et al.*, 2009), ou que relataram melhor desempenho de quitosanas de APM (ALSARRA, 2009; MECWAN *et al.*, 2011; FELICE *et al.*, 2015). Entretanto, Suphasiroj *et al* (2009) avaliaram a QS associada ao colágeno quanto à adesão e proliferação celular *in vitro*, em cultura de células osteoblásticas. Os mecanismos de interação célula-biomaterial são muito diversos entre osteoblastos e fibroblastos, e as diferenças metodológicas com o presente estudo são significativas, o que não permite estabelecer comparação entre os resultados. Ainda assim, houve diferença estatística em um dos grupos, com a QS-BPM apresentando maior proliferação celular que a QS-APM. Quanto ao estudo de Alsarra (2009), a QS foi utilizada na forma de gel de uso tópico sobre lesões de pele, com variações significativas de GD, o que pode ter influenciado nos resultados, uma vez que a MM não foi a única variável avaliada. No trabalho de Felice *et al* (2015), avaliou-se um derivado quaternário de amônio da quitosana em um modelo de cultura de fibroblastos. As amostras de QS utilizadas naquele estudo também apresentavam variações significativas de GD, o que pode ter influenciado nos resultados. No presente trabalho, as avaliações foram feitas *in vivo*, utilizando quitosanas naturais, sem modificações químicas, e com mínimas variações de GD. Mecwan *et al* (2011) utilizaram amostras de quitosana que foram submetidas à esterilização por micro-ondas e avaliadas *in vitro* quanto à adesão e proliferação de células de osteosarcoma em cultura. O tratamento com micro-ondas causou uma degradação térmica do polímero, reduzindo sua MM. A despolimerização por micro-ondas pode ter resultado em subprodutos atípicos da quitosana, o que explicaria a menor citocompatibilidade das amostras de menor MM em comparação à amostra de maior MM, que não foi submetida ao tratamento com micro-ondas.

Os mecanismos que explicariam a influência da MM sobre a biocompatibilidade da QS e seu efeito estimulatório sobre a regeneração do tecido conjuntivo não estão ainda esclarecidos. Existe uma carência de estudos que tenham investigado a correlação entre MM e biocompatibilidade buscando propor ou elucidar os mecanismos celulares ou biomoleculares envolvidos. Ueno *et al* (1999), em um estudo pioneiro que avaliou *in vivo* a regeneração epitelial em cães com

quitosana de BPM (30 a 80 kDa), propuseram que a QS atuaria estimulando macrófagos a liberar citocinas, como a IL-1, que, além de apresentar atividade pró-inflamatória, teria uma ação indutora sobre a produção de fibroblastos e a síntese de colágeno. O mesmo grupo de autores confirmaram, em um estudo *in vitro*, a hipótese de que a QS não atuaria diretamente sobre os fibroblastos, e sim estimulando macrófagos a liberarem, além da IL-1, fatores de crescimento, como o fator transformador de crescimento TGF- β (do inglês *transforming growth factor*), que atuaria na proliferação de fibroblastos e síntese de MEC e colágeno, acelerando a regeneração tecidual (UENO *et al.*, 2001). No entanto, nestes estudos, a MM da quitosana utilizada não foi analisada, reproduzindo-se somente a informação especificada pelo fabricante. Além disso, não foi utilizada quitosana de APM para comparação, o que não permitiu avaliar a influência da variável MM na biocompatibilidade.

De forma a compreender melhor os mecanismos biomoleculares envolvidos na interação entre a QS e os tecidos e sua possível relação com a MM, o presente estudo investigou por análises imunohistoquímicas a presença de dois mediadores químicos importantes envolvidos no processo inflamação-reparo: o NF- κ B, representativo das fases aguda e crônica do processo inflamatório, e o FGF-2, que está relacionado às fases proliferativa e regenerativa do reparo.

Os resultados de IHQ para NF- κ B mostraram que os grupos QS-BPM e QS-APM apresentaram maior expressão nuclear de NF- κ B que o controle, no dia 1, denotando uma resposta inflamatória inicial mais intensa uma vez que este fator de transcrição nuclear regula a liberação de várias citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como as interleucinas 1, 2, 6, 8, o TNF α , além de moléculas de adesão (BLANCO e NETO, 2003). Estes resultados estão coerentes com aqueles da avaliação histológica de infiltrado inflamatório leucocitário, que mostraram maiores escores de infiltração de leucócitos PMN no primeiro dia para os grupos com QS em relação ao controle, já que as citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão reguladas pela ativação nuclear do NF- κ B atuam estimulando a migração de neutrófilos. No entanto, quando se analisa a relação entre a imunomarcagem nuclear/citoplasmática, observa-se que o grupo QS-BPM apresentou uma relação próxima ao valor 1, indicando expressões de NF- κ B equivalentes no núcleo e citoplasma, não diferindo estatisticamente do controle. Em contrapartida, o grupo

QS-APM mostrou uma relação estatisticamente superior ao controle, indicando que a expressão de NF- κ B nuclear foi maior que a citoplasmática naquele grupo.

A relação da imunomarcacão núcleo/citoplasma para o NF- κ B indica a atividade mitótica deste fator, sendo que uma relação maior que 1,0 sugere uma maior translocação nuclear e atividade transcricional do NF- κ B o que implica em maior produção de citocinas pró-inflamatórias e, por consequência, maior inflamação (LIU *et al.*, 2010). Assim, os resultados do primeiro dia sugerem que a QS-BPM induziu menor inflamação que a QS-APM.

Aos 7 dias, observou-se uma redução significativa da marcação nuclear de NF- κ B no grupo de QS-BPM, confirmando que esta quitosana inibiu a translocação do NF- κ B do citoplasma para o núcleo e que este efeito foi dependente da MM da QS. Somente aos 14 dias, a imunomarcacão de NF κ B nuclear dos grupos QS-BPM e QS-APM apresentaram valores semelhantes ao controle e próximos ao valor basal. Estes resultados sugerem que a QS-BPM inibiu a ativação e/ou a translocação nuclear do NF κ B aos 7 dias, o que indicaria uma atividade anti-inflamatória dessa amostra. Este efeito está de acordo com os resultados dos estudos de Wu *et al* (2007), Wu *et al* (2015) e Zheng *et al* (2016) que demonstraram *in vitro* que quitosanas de baixo PM (20kDa e 50 kDa) inibiram a ativação de NF- κ B e sua translocação para o núcleo em cultura de macrófagos. No entanto, esse efeito não foi observado com quitosanas de baixo PM (PM < 1 kDa) e QS de PM extremamente baixo (3 kDa), onde houve, ao contrário, estimulação da ativação de NF- κ B (WU e TSAI, 2007; WU *et al.*, 2015; ZHENG *et al.*, 2016). Já os trabalhos de Liu *et al* (2010) e Li *et al* (2014) demonstraram que também os quitosanas de baixo PM apresentaram efeito anti-inflamatório em cultura de células do cordão umbilical humano e células endoteliais suínas pela inibição da ativação do NF- κ B e das citocinas e moléculas de adesão por ele reguladas (LIU *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2014).

Um possível mecanismo de atuação, sugerido por Liu *et al* (2010) e Zheng *et al* (2016), seria o bloqueio da degradação da proteína inibitória I κ B, que impede a ativação e a migração do NF κ B para o núcleo. Este efeito seria dependente do tamanho da molécula de QS, sendo mais acentuado com as cadeias menores nas quais os grupos amino e hidroxilas estariam mais disponíveis às interações moleculares, embora tenha sido observado um efeito contrário com QS de cadeias muito pequenas, com MM de 3 kDa. Possivelmente, exista uma faixa de

MM em que a QS teria um efeito mais pronunciado sobre a inibição da ativação do NFκB. Este mecanismo poderia explicar a ocorrência de imunomarcagem citoplasmática elevada, mas com marcação nuclear baixa, no grupo QS-BPM no dia 7, sugerindo que a presença da proteína IκB não degradada impediu a migração do NFκB para o núcleo nesse grupo. No entanto, este mecanismo não está ainda esclarecido e seria necessária uma análise específica da expressão de IκB para confirmar esta hipótese no presente experimento. É importante destacar que todos os estudos citados sobre a influência da QS na via do NFκB foram feitos em cultura de células e não avaliaram QS de cadeias maiores. O presente estudo parece ser o primeiro a avaliar o efeito *in vivo* de membranas de QS de diferentes MMs sobre a ativação de NFκB.

Quanto aos resultados de IHQ para FGF-2, observou-se que o grupo QS-BPM mostrou uma imunoexpressão significativamente maior que os grupos QS-APM e controle no primeiro dia. Este dado sugere que a quitosana de menor massa molar promoveu a expressão precoce de FGF-2 no tecido. Uma vez que o FGF-2 atua na modulação de diversos processos envolvidos no reparo tecidual, como adesão, proliferação, diferenciação, migração e motilidade de fibroblastos, produção de diversos componentes da MEC, angiogênese e remodelação vascular (DETILLIEUX *et al.*, 2003; PRESTA *et al.*, 2009), é lícito supor que a QS-BPM favoreceu uma aceleração do processo de reparo mediado pelo FGF-2. Este achado está coerente com os resultados histológicos de formação de tecido de granulação e de tecido conjuntivo fibroso, em que o grupo QS-BPM mostrou maiores escores destes parâmetros nos dias 7 e 14. A expressão de FGF-2 nos grupos com quitosana manteve-se alta em relação ao controle nos dias 7 e 14. Embora não tenha sido detectada diferença estatística entre as quitosanas nesses dias, observa-se uma tendência de maior expressão de FGF-2 no grupo QS-BPM, sobretudo no dia 7. Estes resultados estão de acordo com os estudos de Ueno *et al.* (1999; 2001), que demonstraram uma relação entre quitosana de baixo peso molecular (30 a 80 kDa) e a estimulação de fibroblastos através da imunoexpressão de colágeno e outros fatores de crescimento, como o TGF-β. Segundo estes autores, a QS não atuaria diretamente sobre os fibroblastos, mas estimulando macrófagos a liberarem citocinas e fatores de crescimento que estimulariam os fibroblastos, o que também é corroborado por outros estudos (LIU *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2015; ZHENG *et al.*, 2016). No entanto, em nenhum destes trabalhos foi avaliada a imunoexpressão de

FGF-2. De fato, este parece ser o primeiro trabalho que demonstra a existência de uma regulação positiva do FGF-2 *in vivo* pela quitosana na forma de membranas, em função de sua MM.

Este achado pode abrir novas possibilidades de pesquisa em regeneração tecidual guiada com este material, uma vez que o FGF-2 é reconhecido na literatura como um importante promotor da regeneração do tecido periodontal e do osso alveolar em estudos com animais e humanos (KITAMURA *et al.*, 2008; NAGAYASU-TANAKA *et al.*, 2015; COCHRAN *et al.*, 2016; MOMOSE *et al.*, 2016). No entanto, nestes trabalhos, os autores utilizaram FGF-2 recombinante aplicados topicamente ou associado a veículos como hidrogéis de colágeno, hidróxi-propil-celulose ou a β -TCP. A utilização de membranas de quitosana representaria uma nova abordagem, uma vez que o próprio biomaterial induziria a liberação de FGF. Além disso, o FGF-2 recombinante poderia ser incorporado à membrana acentuando seu potencial regenerativo, uma vez que a quitosana possui a propriedade de reter e liberar gradativamente FGF-2 exógeno adicionado à sua superfície, atuando como um veículo de liberação lenta, o que está demonstrado em alguns estudos (NAKAMURA *et al.*, 2008; WELTROWSKI *et al.*, 2012; BUSILACCHI *et al.*, 2013; KUMOREK *et al.*, 2016).

A possibilidade de se desenvolver uma membrana bioativa para RTG, que apresente uma atividade indutora sobre a produção endógena de FGF-2 seria de considerável relevância clínica, uma vez que as abordagens tradicionais em ROG envolvem membranas que atuam simplesmente como barreiras físicas, não agindo efetivamente no processo regenerativo, mas somente prevenindo a proliferação de células epiteliais para o defeito periodontal antes que ocorra a regeneração óssea e do ligamento periodontal (BUSER, 2010). Embora a utilização de membranas de quitosana tenha sido investigada na literatura para regeneração periodontal e de osso alveolar em estudos *in vitro* (MOTA *et al.*, 2012; QASIM *et al.*, 2017) e em animais (YEO *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2016; LOTFI *et al.*, 2016), nestes trabalhos, as quitosanas foram utilizadas em associação com partículas de vidro bioativo (MOTA *et al.*, 2012), com óxido de polietileno (QASIM *et al.*, 2017) ou com colágeno (LOTFI *et al.*, 2016), ou ainda com fármacos (LEE *et al.*, 2016). Seus resultados, apesar de terem mostrado um efeito positivo sobre a regeneração, não podem ser atribuídos especificamente à quitosana uma vez que esta não foi avaliada isoladamente. Além disso, as massas molares das quitosanas utilizadas não foram analisadas nem

consideradas nos resultados, o que dificulta a comparação com o presente trabalho, no qual a quitosana foi utilizada em sua forma natural, sem associações, comparando-se apenas seu efeito em função de suas massas molares. A membrana de QS-BPM avaliada neste estudo sugere um potencial de aplicação para RTG, uma vez que demonstrou tanto uma atividade inibitória sobre o NF- κ B como promoveu a expressão de FGF-2.

O mecanismo de ação da quitosana sobre o FGF-2 ainda não está totalmente esclarecido. Uma hipótese proposta na literatura se baseia na atuação da QS como um análogo das GAGs, uma vez que estas são polissacarídeos com estrutura semelhante à QS, que compartilham os mesmos grupamentos *N*-acetilglicosamina. Algumas GAGs, como o heparan sulfato, participam da via de sinalização do FGF-2, ligando-se quimicamente a este e facilitando sua interação com os receptores celulares do FGF (FGF-R) presentes nas células endoteliais e de diversos tecidos, ao mesmo tempo que o protegem da degradação química (PRESTA *et al.*, 2005; PRESTA *et al.*, 2009). A QS poderia mimetizar o heparan sulfato, facilitando sua ativação pelos FGF-R. Este efeito seria maior com as cadeias de menor tamanho, de massas molares mais próximas do heparan sulfato (da ordem de 50 kDa). (TANGSADTHAKUN *et al.*, 2007; DREYFUSS *et al.*, 2009; ZEINALI *et al.*, 2014; MENEGHETTI *et al.*, 2015). Além disso, Masuoka *et al.* demonstraram que a QS interage com o FGF-2 protegendo-o da inativação química e potencializando seu efeito (MASUOKA *et al.*, 2005). Portanto, os resultados do presente trabalho quanto ao efeito da quitosana sobre o FGF-2 corroboram a hipótese de que ela atuaria ligando-se a este fator, como um análogo do heparan sulfato, de uma forma dependente da massa molar. No entanto, a confirmação deste mecanismo requereria uma investigação específica da interação molecular entre quitosana e FGF-2.

É possível que as diferenças observadas na atividade biológica das quitosanas de diferentes massas molares sobre NF κ B e FGF-2 tenha relação com a cristalinidade da QS, já que esta tem uma relação direta com o tamanho da cadeia polimérica. O aumento da cristalinidade resulta em maior resistência mecânica devido às interações intermoleculares mais fortes. Em contrapartida, QS com cadeias poliméricas menores possuem interações mais brandas entre suas moléculas, o que as tornam mais solúveis, mais permeáveis e mais susceptíveis à interações com proteínas, como enzimas por exemplo, sendo assim mais facilmente

biodegradáveis. Os grupamentos funcionais da QS de cadeias menores estariam mais disponíveis às interações iônicas ou covalentes, deixando-as mais reativas (CHEN e HWA, 1996; KIM, I. Y. *et al.*, 2008; MECWAN *et al.*, 2011; RODRIGUEZ-VAZQUEZ *et al.*, 2015). Esta hipótese explicaria a atividade mais pronunciada da QS-BPM, que teria menor cristalinidade, sobre o NF κ B e o FGF-2, pois ela teria, em tese, maior interação com as proteínas I κ B e FGF-2. Novamente, trata-se de uma hipótese que carece de confirmação, sendo necessários novos estudos que permitam avaliar a relação entre cristalinidade e as interações moleculares entre QS e as proteínas de interesse. Ainda que alguns estudos recentes tenham indicado que as QS-BPM e os quitosano-oligosacarídeos apresentam grande bioatividade sobre macrófagos *in vitro* (WU *et al.*, 2015; ZHENG *et al.*, 2016) e também *in vivo* (WANG *et al.*, 2016), não há consenso sobre os mecanismos moleculares envolvidos. Contudo, a aplicabilidade dos quitosano-oligosacarídeos como *scaffolds* é questionável, devido à sua baixa resistência e alta solubilidade (SUPHASIROJ *et al.*, 2009).

A despeito da tendência na literatura em se estabelecer uma relação inversa entre a MM da quitosana e sua bioatividade, corroborada pelo presente estudo, não é possível comprovar, de forma inequívoca, esta relação. A carência de estudos *in vivo* e a enorme variabilidade dos biomateriais à base de quitosana avaliados na literatura dificultam o estabelecimento de um consenso sobre esta questão. Na verdade, a natureza química "modulável" da quitosana, ao mesmo tempo em que lhe confere uma grande versatilidade como biomaterial, representa também um grande empecilho para a padronização de suas aplicações. A simplicidade de modificação da estrutura química da quitosana permite sua utilização como copolímero associando-a com inúmeros outros materiais, o que faz da quitosana um vasto campo de experimentação. Por esta razão, a quantidade de estudos com aplicações da quitosana publicados na literatura é notável, ultrapassando 23 mil publicações somente entre 2001 e 2010 (BELLICH *et al.*, 2016). É possível que tamanha variabilidade seja uma das razões porque a enorme potencialidade da quitosana como biomaterial para regeneração tecidual, demonstrada pelo imenso número de pesquisas, ainda não tenha se traduzido no desenvolvimento de biomateriais que possam ser aplicados em estudos clínicos ou aprovados, de forma mais ampla, pelas agências regulatórias. Outro argumento mencionado na literatura seria que o potencial demonstrado pela quitosana nas pesquisas não receberia a atenção e importância que deveriam porque a indústria

não teria interesse em desenvolver novos materiais que competiriam com seus produtos comerciais e que poderiam reduzir sua lucratividade (BUSILACCHI *et al.*, 2013).

Os resultados do presente estudo *in vivo* suportam a ideia de que, de fato, a massa molar, um parâmetro básico intrínseco da quitosana, influencia em sua biocompatibilidade e em sua bioatividade. Não obstante a limitada significância estatística observada nos resultados das análises histológicas, os resultados de imunohistoquímica sugerem, com significância estatística, que as membranas de quitosana avaliadas foram biocompatíveis e bioativas em tecido conjuntivo, exercendo uma dupla atividade biológica, com ação inibitória sobre a ativação do NFκB e uma ação estimulatória sobre o FGF-2, com uma maior bioatividade da membrana de menor MM. É preciso se levar em conta que, mesmo comparando-se amostras de QS que não apresentaram diferenças tão grandes de MM, foi possível demonstrar o melhor comportamento biológico da amostra de menor MM. O conhecimento deste parâmetro e de como ele pode modular as demais propriedades da quitosana pode contribuir para a busca de uma padronização de seu uso nos estudos. A MM deve ser considerada em qualquer estudo que envolva a utilização da quitosana, combinada ou não com outros biomateriais, em regeneração tecidual. A bioatividade das membranas de quitosana, sobretudo quanto à regulação positiva do FGF-2 demonstrada pela primeira vez em um estudo *in vivo*, abre a perspectiva de se desenvolver novas pesquisas que avaliem a aplicabilidade deste material como membrana bioativa para regeneração tecidual guiada com potencial para aceleração do processo de regeneração do tecido periodontal e osso alveolar.

8. CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

- As massas molares das amostras comerciais de quitosana utilizadas, identificadas como de baixo peso molecular e alto peso molecular, apresentaram valores divergentes dos especificados pelo fabricante, devendo ser consideradas, de acordo com a literatura, como de médio peso molecular;
- O grau de desacetilação das amostras de quitosana mostrou-se compatível com os valores especificados pelo fabricante;
- As membranas de quitosana produzidas pelo GPSA e utilizadas neste estudo apresentaram biocompatibilidade adequada em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos, induzindo infiltrado leucocitário semelhante ao controle negativo e inferior ao controle positivo;
- A membrana de quitosana de menor massa molar promoveu formação de tecido conjuntivo fibroso mais precoce que a quitosana de maior massa molar, indicando uma regeneração tecidual mais rápida.
- As membranas de quitosana investigadas apresentaram bioatividade sobre a imunexpressão de NFκB e FGF-2, sendo que a amostra de menor massa molar mostrou ação inibitória sobre a expressão nuclear de NFκB e estimulatória sobre a expressão de FGF-2 superiores à amostra de maior massa molar.

A hipótese proposta, portanto, deve ser aceita, uma vez que a biocompatibilidade das membranas de quitosana foi influenciada pela variação de suas massas molares. A quitosana de menor massa molar induziu menor resposta inflamatória que a de maior massa molar, mostrando-se mais biocompatível.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR JUNIOR, J. N. M. **Análise da imuno expressão das proteínas IL-17, IL23 e ROR γ t na patogenia da doença periodontal.** 2015. 117 (Doutorado). Departamento de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN.
- AHAMED, M. I. et al. Evaluation of biomaterial containing regenerated cellulose and chitosan incorporated with silver nanoparticles. **Int J Biol Macromol**, v. 72, p. 680-6, Jan 2015.
- AKNCBAY, H.; SENEL, S.; AY, Z. Y. Application of chitosan gel in the treatment of chronic periodontitis. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 80, n. 2, p. 290-6, Feb 2007.
- ALSARRA, I. A. Chitosan topical gel formulation in the management of burn wounds. **Int J Biol Macromol**, v. 45, n. 1, p. 16-21, Jul 01 2009.
- AMARAL, I. F.; SAMPAIO, P.; BARBOSA, M. A. Three-dimensional culture of human osteoblastic cells in chitosan sponges: the effect of the degree of acetylation. **J Biomed Mater Res A**, v. 76, n. 2, p. 335-46, Feb 2006.
- ANDERSON, J. et al. Biological Testing of Biomaterials. In: RATNER, B.;HOFFMAN, A., *et al* (Ed.). **Biomaterials Science: an introduction to materials in medicine.** San Diego, USA Elsevier Academic Press v.1, 2004. cap. 5, p.355-378.
- ANDERSON, J. et al. Host reactions to biomaterials and their evaluation. In: RATNER, B.;HOFFMAN, A., *et al* (Ed.). **Biomaterials Science: an introduction to materials in medicine.** San Diego, USA: Elsevier Academic Press, v.1, 2004. cap. 4, p.293-354.
- ARPORNMAEKLONG, P.; PRIPATNANONT, P.; SUWATWIROTE, N. Properties of chitosan-collagen sponges and osteogenic differentiation of rat-bone-marrow stromal cells. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 37, n. 4, p. 357-66, Apr 2008.
- BALDRICK, P. The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 56, n. 3, p. 290-9, Apr 2010.
- BELLICH, B. et al. "The Good, the Bad and the Ugly" of Chitosans. **Mar Drugs**, v. 14, n. 5, May 17 2016.
- BERNKOP-SCHNURCH, A.; DUNNHAUPT, S. Chitosan-based drug delivery systems. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 81, n. 3, p. 463-9, Aug 2012.
- BIAZAR, E.; KESHEL, S. H. Chitosan-cross-linked nanofibrous PHBV nerve guide for rat sciatic nerve regeneration across a defect bridge. **ASAIO J**, v. 59, n. 6, p. 651-9, Nov-Dec 2013.

BLANCO, M. L.; NETO, A. C. O fator nuclear kappa B: uma nova perspectiva para o estudo de drogas anti-inflamatórias. **Rev. Ciênc. Méd.**, v. 12, n. 4, p. 341-349, 2003.

BORNSTEIN, M. M.; ARX, V. T.; D.D., B. Propriedades das Membranas usadas como Barreiras. In: BUSER, D. (Ed.). **20 anos de Regeneração Óssea Guiada na Implantodontia**. São Paulo: Quintessence, 2010. cap. 3, p.47-69. ISBN 978-85-7889-004-9.

BOSSHARDT, D. D.; SCHENK, R. K. Base Biológica da Regeneração Óssea. In: BUSER, D. (Ed.). **20 anos de Regeneração Óssea Guiada em Implantodontia**. São Paulo: Quintessence, 2010. cap. 2, p.15-45. ISBN 978-85-7889-004-9.

BROWN, B. N.; BADYLAK, S. F. The role of the host immune response in tissue engineering and regenerative medicine. In: LANZA, R.; LANGER, R., *et al* (Ed.). **Principles of Tissue Engineering**. San Diego, USA: Elsevier Academic Press, v.1, 2014. cap. 25, p.1887.

BRUN, V. et al. Chitosan/hydroxyapatite hybrid scaffold for bone tissue engineering. **Biomed Mater Eng**, v. 24, n. 1 Suppl, p. 63-73, 2014.

BUSER, D. Regeneração óssea guiada nos últimos 20 anos. In: D, B. (Ed.). **20 anos de Regeneração Óssea Guiada na Implantodontia**. São Paulo: Quintessence, 2010. cap. 1, p.1-13. ISBN 978-85-7889-004-9.

BUSILACCHI, A. et al. Chitosan stabilizes platelet growth factors and modulates stem cell differentiation toward tissue regeneration. **Carbohydr Polym**, v. 98, n. 1, p. 665-76, Oct 15 2013.

CARIDADE, S. G. et al. Myoconductive and osteoinductive free-standing polysaccharide membranes. **Acta Biomater**, v. 15, p. 139-49, Mar 2015.

CHEN, J. et al. Simultaneous regeneration of articular cartilage and subchondral bone in vivo using MSCs induced by a spatially controlled gene delivery system in bilayered integrated scaffolds. **Biomaterials**, v. 32, n. 21, p. 4793-805, Jul 2011.

CHEN, Q.; THOUAS, G. A. **Biomaterials: a basic introduction**. Boca Raton, USA.: CRC Press, 2015a. ISBN 978-1-4822-2769-7.

_____. Histology and tissue properties II: connective tissues. In: CHEN, Q. e THOUAS, G. A. (Ed.). **Biomaterials: a basic introduction** Boca Raton, USA.CRC Press, v.1, 2015b. cap. 18, p.609-633.

_____. Immune system and body responses to biomaterials. In: CHEN, Q. e THOUAS, G. A. (Ed.). **Biomaterials: a basic introduction**. Boca Raton, USA: CRC Press, v.1, 2015c. cap. 19, p.635-651.

CHEN, R. H.; HWA, H. D. Effect of molecular weight of chitosan with the same degree of deacetylation on the thermal, mechanical and permeability properties of the prepared membrane. **Carbohydr Polym**, v. 29, n. 4, p. 353-358, 1996.

- CHEN, X. et al. Bone marrow stromal cells-loaded chitosan conduits promote repair of complete transection injury in rat spinal cord. **J Mater Sci Mater Med**, v. 22, n. 10, p. 2347-56, Oct 2011.
- CHEN, X. G. et al. The effect of carboxymethyl-chitosan on proliferation and collagen secretion of normal and keloid skin fibroblasts. **Biomaterials**, v. 23, n. 23, p. 4609-14, Dec 2002.
- COCHRAN, D. L. et al. A Randomized Clinical Trial Evaluating rh-FGF-2/beta-TCP in Periodontal Defects. **J Dent Res**, v. 95, n. 5, p. 523-30, May 2016.
- COSTA-PINTO, A. R. et al. Chitosan-poly(butylene succinate) scaffolds and human bone marrow stromal cells induce bone repair in a mouse calvaria model. **J Tissue Eng Regen Med**, v. 6, n. 1, p. 21-8, Jan 2012.
- COSTA SILVA, H. S. R.; SANTOS, K.; E.I., F. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.
- D'MELLO, S. et al. Incorporation of copper into chitosan scaffolds promotes bone regeneration in rat calvarial defects. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 103, n. 5, p. 1044-9, Jul 2015.
- DANILCHENKO, S. N. et al. Characterization and in vivo evaluation of chitosan-hydroxyapatite bone scaffolds made by one step coprecipitation method. **J Biomed Mater Res A**, v. 96, n. 4, p. 639-47, Mar 15 2011.
- DE FAVERE, V. T.; HINZE, W. L. Evaluation of the potential of chitosan hydrogels to extract polar organic species from nonpolar organic solvents: application to the extraction of aminopyridines from hexane. **J Colloid Interface Sci**, v. 330, n. 1, p. 38-44, Feb 01 2009.
- DENG, J. et al. A silk fibroin/chitosan scaffold in combination with bone marrow-derived mesenchymal stem cells to repair cartilage defects in the rabbit knee. **J Mater Sci Mater Med**, v. 24, n. 8, p. 2037-46, Aug 2013.
- DENOST, Q. et al. Colorectal tissue engineering: A comparative study between porcine small intestinal submucosa (SIS) and chitosan hydrogel patches. **Surgery**, v. 158, n. 6, p. 1714-23, Dec 2015.
- DETILLIEUX, K. A. et al. Biological activities of fibroblast growth factor-2 in the adult myocardium. **Cardiovasc Res**, v. 57, n. 1, p. 8-19, Jan 2003.
- DHANDAYUTHAPANI, B. et al. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review. **International Journal of Polymer Science**, v. 2011, p. Article ID 290602 2011.
- DI MARTINO, A.; SITTINGER, M.; RISBUD, M. V. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. **Biomaterials**, v. 26, n. 30, p. 5983-90, Oct 2005.

DREYFUSS, J. L. et al. Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling. **An Acad Bras Cienc**, v. 81, n. 3, p. 409-29, Sep 2009.

DVIR, T. et al. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. **Nat Nanotechnol**, v. 6, n. 1, p. 13-22, Jan 2011.

EBEWELE, R. O. Chemical Bonding and Polymer Structure. In: EBEWELE, R. O. (Ed.). **Polymer Science and Technology**. New York, USA: CRC Press LLC, v.1, 2000. cap. 3, p.73-108. ISBN 0-8493-8939-9.

FELICE, F. et al. Effect of different chitosan derivatives on in vitro scratch wound assay: a comparative study. **Int J Biol Macromol**, v. 76, p. 236-41, May 2015.

FISCHBACH, C. et al. Does UV irradiation affect polymer properties relevant to tissue engineering? **Surface Science**, v. 491, n. 3, p. 333-345, 2001.

FLORCZYK, S. J. et al. Evaluation of three-dimensional porous chitosan-alginate scaffolds in rat calvarial defects for bone regeneration applications. **J Biomed Mater Res A**, v. 101, n. 10, p. 2974-83, Oct 2013.

GARG, T.; CHANANA, A.; JOSHI, R. Preparation of chitosan scaffolds for tissue engineering using freeze drying technology. **IOSR Journal of Pharmacy**, v. 2, n. 1, p. 2, 2012.

GUAY, J. et al. Carrageenan-induced paw edema in rat elicits a predominant prostaglandin E2 (PGE2) response in the central nervous system associated with the induction of microsomal PGE2 synthase-1. **J Biol Chem**, v. 279, n. 23, p. 24866-72, Jun 4 2004.

GUO, R. et al. The healing of full-thickness burns treated by using plasmid DNA encoding VEGF-165 activated collagen-chitosan dermal equivalents. **Biomaterials**, v. 32, n. 4, p. 1019-31, Feb 2011.

GUPTA, V. et al. Repair and reconstruction of a resected tumor defect using a composite of tissue flap-nanotherapeutic-silk fibroin and chitosan scaffold. **Ann Biomed Eng**, v. 39, n. 9, p. 2374-87, Sep 2011.

HAN, F. et al. Preparation, characteristics and assessment of a novel gelatin-chitosan sponge scaffold as skin tissue engineering material. **Int J Pharm**, v. 476, n. 1-2, p. 124-33, Dec 10 2014.

HARDING, S. E. Some observations on the effects of bioprocessing on biopolymer stability. **J Drug Target**, v. 18, n. 10, p. 732-40, Dec 2010.

HOU, J. et al. Segmental bone regeneration using rhBMP-2-loaded collagen/chitosan microspheres composite scaffold in a rabbit model. **Biomed Mater**, v. 7, n. 3, p. 035002, Jun 2012.

HOWLING, G. I. et al. The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro. **Biomaterials**, v. 22, n. 22, p. 2959-66, Nov 2001.

HSU, S. H. et al. Chitosan as Scaffold Materials: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation. **Journal of Polymer Research**, v. 11, n. 2, p. 7, 2004.

HUTMACHER, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. **Biomaterials**, v. 21, n. 24, p. 2529-43, Dec 2000.

ILLUM, L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. **Pharm Res**, v. 15, n. 9, p. 1326-31, Sep 1998.

JEAN, M. et al. Chitosan-plasmid nanoparticle formulations for IM and SC delivery of recombinant FGF-2 and PDGF-BB or generation of antibodies. **Gene Ther**, v. 16, n. 9, p. 1097-110, Sep 2009.

Jl, J. et al. Sphere-shaped nano-hydroxyapatite/chitosan/gelatin 3D porous scaffolds increase proliferation and osteogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells from gingival fibroblasts. **Biomed Mater**, v. 10, n. 4, p. 045005, Aug 2015.

JIA, S. et al. Incorporation of osteogenic and angiogenic small interfering RNAs into chitosan sponge for bone tissue engineering. **Int J Nanomedicine**, v. 9, p. 5307-16, 2014.

JIANG, H. et al. Biomimetic spiral-cylindrical scaffold based on hybrid chitosan/cellulose/nano-hydroxyapatite membrane for bone regeneration. **ACS Appl Mater Interfaces**, v. 5, n. 22, p. 12036-44, Nov 27 2013.

JIANG, W. et al. Incorporation of aligned PCL-PEG nanofibers into porous chitosan scaffolds improved the orientation of collagen fibers in regenerated periodontium. **Acta Biomater**, v. 25, p. 240-52, Oct 2015.

KANG, H. W.; TABATA, Y.; IKADA, Y. Fabrication of porous gelatin scaffolds for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 20, n. 14, p. 1339-44, Jul 1999.

KEANE, T. J.; BADYLAK, S. F. Biomaterials for tissue engineering applications. **Semin Pediatr Surg**, v. 23, n. 3, p. 112-8, Jun 2014.

KIM, I. Y. et al. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. **Biotechnol Adv**, v. 26, n. 1, p. 1-21, Jan-Feb 2008.

KIM, K. S. et al. The osteogenic differentiation of rat muscle-derived stem cells in vivo within in situ-forming chitosan scaffolds. **Biomaterials**, v. 29, n. 33, p. 4420-8, Nov 2008.

KITAMURA, M. et al. Periodontal tissue regeneration using fibroblast growth factor-2: randomized controlled phase II clinical trial. **PLoS One**, v. 3, n. 7, p. e2611, Jul 02 2008.

KUMAR, V. et al. Acute and Chronic Inflammation. In: KUMAR, V.;ABBAS, A. K., *et al* (Ed.). **Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 7/E**. 7th. Philadelphia, USA: Elsevier Saunders, v.1, 2005a. cap. 2, p.48-87. ISBN 0-7216-0187-1.

_____. Tissue renewal and repair: regeneration, healing and fibrosis. In: KUMAR, V.;ABBAS, A. K., *et al* (Ed.). **Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 7/E**. 7th. Philadelphia, USA: Elsevier Saunders, v.1, 2005b. cap. 3, p.88-119. ISBN 0-7216-0187-1

KUMOREK, M.; KUBIES, D.; RIEDEL, T. Protein interactions with quaternized chitosan/heparin multilayers. **Physiol Res**, v. 65, n. Supplementum 2, p. S253-S261, Oct 20 2016.

LAI, G. J.; SHALUMON, K. T.; CHEN, J. P. Response of human mesenchymal stem cells to intrafibrillar nanohydroxyapatite content and extrafibrillar nanohydroxyapatite in biomimetic chitosan/silk fibroin/nanohydroxyapatite nanofibrous membrane scaffolds. **Int J Nanomedicine**, v. 10, p. 567-84, 2015.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue engineering. **Science**, v. 260, n. 5110, p. 920-6, May 14 1993.

LANZA, R.; LANGER, R.; VACANTI, J. **Principles of Tissue Engineering**. San Diego, USA: Elsevier Academic Press, 2014. 1887 ISBN 978-0-12-398358-9.

LEE, B. S. et al. A functional chitosan membrane with grafted epigallocatechin-3-gallate and lovastatin enhances periodontal tissue regeneration in dogs. **Carbohydr Polym**, v. 151, p. 790-802, Oct 20 2016.

LEONG, K. F.; CHEAH, C. M.; CHUA, C. K. Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. **Biomaterials**, v. 24, n. 13, p. 2363-78, Jun 2003.

LEVENGOOD, S. L.; ZHANG, M. Chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering. **J Mater Chem B Mater Biol Med**, v. 2, n. 21, p. 3161-3184, Jun 7 2014.

LI, C. et al. A viscoelastic chitosan-modified three-dimensional porous poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone) scaffold for cartilage tissue engineering. **J Biomater Sci Polym Ed**, v. 23, n. 1-4, p. 405-24, 2012.

LI, J.; DU, Y.; LIANG, H. Influence of molecular parameters on the degradation of chitosan by a commercial enzyme. **Polymer Degradation and Stability**, v. 92, p. 10, 2007.

LI, Y. et al. Chitosan oligosaccharides downregulate the expression of E-selectin and ICAM-1 induced by LPS in endothelial cells by inhibiting MAP kinase signaling. **Int J Mol Med**, v. 33, n. 2, p. 392-400, Feb 2014.

LIAO, C. D. et al. Peripheral nerve repair: monitoring by using gadofluorine M-enhanced MR imaging with chitosan nerve conduits with cultured mesenchymal stem cells in rat model of neurotmesis. **Radiology**, v. 262, n. 1, p. 161-71, Jan 2012.

LIM, L. Y.; KHOR, E.; KOO, O. Gamma irradiation of chitosan. **J Biomed Mater Res**, v. 43, n. 3, p. 282-90, Fall 1998.

LIU, H. T. et al. Chitosan oligosaccharides inhibit the expression of interleukin-6 in lipopolysaccharide-induced human umbilical vein endothelial cells through p38 and ERK1/2 protein kinases. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 106, n. 5, p. 362-71, May 2010.

LOTFI, G. et al. Biological Evaluation (In Vitro and In Vivo) of Bilayered Collagenous Coated (Nano Electrospun and Solid Wall) Chitosan Membrane for Periodontal Guided Bone Regeneration. **Ann Biomed Eng**, v. 44, n. 7, p. 2132-44, Jul 2016.

MADIHALLY, S. V.; MATTHEW, H. W. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 20, n. 12, p. 1133-42, Jun 1999.

MASUOKA, K. et al. The interaction of chitosan with fibroblast growth factor-2 and its protection from inactivation. **Biomaterials**, v. 26, n. 16, p. 3277-84, Jun 2005.

MECWAN, M. M. et al. Effect of molecular weight of chitosan degraded by microwave irradiation on lyophilized scaffold for bone tissue engineering applications. **J Biomed Mater Res A**, v. 97, n. 1, p. 66-73, Apr 2011.

MENEGHETTI, M. C. et al. Heparan sulfate and heparin interactions with proteins. **J R Soc Interface**, v. 12, n. 110, p. 0589, Sep 06 2015.

MESQUITA JR, D. et al. Aspectos celulares e moleculares da inflamação. **Sinopse de Reumatologia**, v. 10, n. 3, p. 66-81, 2008.

MIRANDA, D. G. et al. A chitosan-hyaluronic acid hydrogel scaffold for periodontal tissue engineering. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 104, n. 8, p. 1691-1702, Nov 2016.

MIRANDA, S. C. et al. Three-dimensional culture of rat BMMSCs in a porous chitosan-gelatin scaffold: A promising association for bone tissue engineering in oral reconstruction. **Arch Oral Biol**, v. 56, n. 1, p. 1-15, Jan 2011.

MIRANDA, S. C. et al. Mesenchymal stem cells associated with porous chitosan-gelatin scaffold: a potential strategy for alveolar bone regeneration. **J Biomed Mater Res A**, v. 100, n. 10, p. 2775-86, Oct 2012.

MOMOSE, T. et al. Collagen Hydrogel Scaffold and Fibroblast Growth Factor-2 Accelerate Periodontal Healing of Class II Furcation Defects in Dog. **Open Dent J**, v. 10, p. 347-59, 2016.

MOTA, J. et al. Chitosan/bioactive glass nanoparticle composite membranes for periodontal regeneration. **Acta Biomater**, v. 8, n. 11, p. 4173-80, Nov 2012.

MUCHA, M.; LUDWICZAK, S.; KAWINSKA, M. Kinetics of water sorption by chitosan and its blends with poly (vinyl alcohol). **Carbohydr Polym**, v. 62, n. 1, p. 42-49, 2005.

MUZZARELLI, R. A. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. **Carbohydr Polym**, v. 76, n. 2, p. 167-182, 2009.

MUZZARELLI, R. A. et al. Osteoconductive properties of methylpyrrolidinone chitosan in an animal model. **Biomaterials**, v. 14, n. 12, p. 925-9, Oct 1993.

NAGAYASU-TANAKA, T. et al. Action Mechanism of Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) in the Promotion of Periodontal Regeneration in Beagle Dogs. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0131870, 2015.

NAKAMURA, S. et al. Effect of controlled release of fibroblast growth factor-2 from chitosan/fucoidan micro complex-hydrogel on in vitro and in vivo vascularization. **J Biomed Mater Res A**, v. 85, n. 3, p. 619-27, Jun 01 2008.

NIU, X. et al. Repair of bone defect in femoral condyle using microencapsulated chitosan, nanohydroxyapatite/collagen and poly(L-lactide)-based microsphere-scaffold delivery system. **Artif Organs**, v. 35, n. 7, p. E119-28, Jul 2011.

PANG, E. K. et al. Effects of chitosan on human periodontal ligament fibroblasts in vitro and on bone formation in rat calvarial defects. **J Periodontol**, v. 76, n. 9, p. 1526-33, Sep 2005.

PENICHE, C. et al. Cell supports of chitosan/hyaluronic acid and chondroitin sulphate systems. Morphology and biological behaviour. **J Mater Sci Mater Med**, v. 18, n. 9, p. 1719-26, Sep 2007.

PRASHANTH, K. V.; KITTUR, F. S.; THARANATHAN, R. N. Solid state structure of chitosan prepared under different N-deacetylating conditions. **Carbohydr Polym**, v. 50, n. 1, p. 27-33, 2002.

PRESTA, M. et al. Inflammatory cells and chemokines sustain FGF2-induced angiogenesis. **Eur Cytokine Netw**, v. 20, n. 2, p. 39-50, Jun 2009.

PRESTA, M. et al. Antiangiogenic activity of semisynthetic biotechnological heparins: low-molecular-weight-sulfated Escherichia coli K5 polysaccharide derivatives as fibroblast growth factor antagonists. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 25, n. 1, p. 71-76, 2005.

QASIM, S. B. et al. Potential of electrospun chitosan fibers as a surface layer in functionally graded GTR membrane for periodontal regeneration. **Dent Mater**, v. 33, n. 1, p. 71-83, Jan 2017.

REBOLLAR, E. et al. Influence of polymer molecular weight on the chemical modifications induced by UV laser ablation. **J Phys Chem B**, v. 110, n. 29, p. 14215-20, Jul 27 2006.

REVI, D. et al. Chitosan scaffold co-cultured with keratinocyte and fibroblast heals full thickness skin wounds in rabbit. **J Biomed Mater Res A**, v. 102, n. 9, p. 3273-81, Sep 2014.

RINAUDO, M. Chitin and Chitosan: properties and applications. **Prog Polym Sci**, v. 31, p. 603-632, 2006.

RODRIGUES, S. et al. Biocompatibility of chitosan carriers with application in drug delivery. **Journal of functional biomaterials**, v. 3, p. 615-641, 2012.

RODRIGUEZ-VAZQUEZ, M. et al. Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 821279, 2015.

SALGADO, A. J.; COUTINHO, O. P.; REIS, R. L. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. **Macromol Biosci**, v. 4, n. 8, p. 743-65, Aug 9 2004.

SARKAR, S. D. et al. Chitosan-collagen scaffolds with nano/microfibrous architecture for skin tissue engineering. **J Biomed Mater Res A**, v. 101, n. 12, p. 3482-92, Dec 2013.

SEONWOO, H. et al. Regeneration of chronic tympanic membrane perforation using an EGF-releasing chitosan patch. **Tissue Eng Part A**, v. 19, n. 17-18, p. 2097-107, Sep 2013.

SHALUMON, K. T. et al. Modulation of Bone-Specific Tissue Regeneration by Incorporating Bone Morphogenetic Protein and Controlling the Shell Thickness of Silk Fibroin/Chitosan/Nanohydroxyapatite Core-Shell Nanofibrous Membranes. **ACS Appl Mater Interfaces**, v. 7, n. 38, p. 21170-81, Sep 30 2015.

SHI, C. et al. Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine. **J Surg Res**, v. 133, n. 2, p. 185-92, Jun 15 2006.

SIMOES, M. J. et al. In vitro and in vivo chitosan membranes testing for peripheral nerve reconstruction. **Acta Med Port**, v. 24, n. 1, p. 43-52, Jan-Feb 2011.

SOGIAS, I. A.; WILLIAMS, A. C.; KHUTORYANSKIY, V. V. Why is chitosan mucoadhesive? **Biomacromolecules**, v. 9, n. 7, p. 1837-42, Jul 2008.

SUN, C. et al. Degradation behavior of chitosan chains in the 'green' synthesis of gold nanoparticles. **Carbohydr Res**, v. 343, n. 15, p. 2595-9, Oct 13 2008.

SUNDARAMURTHI, D. et al. Electrospun nanostructured chitosan-poly(vinyl alcohol) scaffolds: a biomimetic extracellular matrix as dermal substitute. **Biomed Mater**, v. 7, n. 4, p. 045005, Aug 2012.

SUPHASIROJ, W. et al. The fundamental parameters of chitosan in polymer scaffolds affecting osteoblasts (MC3T3-E1). **J Mater Sci Mater Med**, v. 20, n. 1, p. 309-20, Jan 2009.

TANGSADTHAKUN, C. et al. The influence of molecular weight of chitosan on the physical and biological properties of collagen/chitosan scaffolds. **J Biomater Sci Polym Ed**, v. 18, n. 2, p. 147-63, 2007.

TCHEMTCHOUA, V. T. et al. Development of a chitosan nanofibrillar scaffold for skin repair and regeneration. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 9, p. 3194-204, Sep 12 2011.

TOLAIMATE, A. et al. On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin. **Polymer**, v. 41, n. 7, p. 7, 2000.

UENO, H. et al. Evaluation effects of chitosan for the extracellular matrix production by fibroblasts and the growth factors production by macrophages. **Biomaterials**, v. 22, n. 15, p. 2125-30, Aug 2001.

UENO, H. et al. Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. **Biomaterials**, v. 20, n. 15, p. 1407-14, Aug 1999.

VELEIRINHO, B. et al. Nanofibrous poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/chitosan scaffolds for skin regeneration. **Int J Biol Macromol**, v. 51, n. 4, p. 343-50, Nov 2012.

VIEIRA, R. S. **Adsorção competitiva dos íons cobre e mercúrio em membranas de quitosana natural e reticulada**. 2008. 148 (Doutorado). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

WANG, Q. Z. et al. Protonation constants of chitosan with different molecular weight and degree of deacetylation. **Carbohydr Polym**, v. 65, n. 2, p. 194-201, 2006.

WANG, Y. et al. Chitosan Degradation Products Promote Nerve Regeneration by Stimulating Schwann Cell Proliferation via miR-27a/FOXO1 Axis. **Mol Neurobiol**, v. 53, n. 1, p. 28-39, Jan 2016.

WASIKIEWICZ, J. et al. Degradation of chitosan and sodium alginate by gamma radiation, sonochemical and ultraviolet methods. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 73, n. 5, p. 287-295, 2005.

WEI, Y. et al. Chitosan/silk fibroin-based tissue-engineered graft seeded with adipose-derived stem cells enhances nerve regeneration in a rat model. **J Mater Sci Mater Med**, v. 22, n. 8, p. 1947-64, Aug 2011.

WELTROWSKI, A. et al. Mitogenic activity of sulfated chitosan and cellulose derivatives is related to protection of FGF-2 from proteolytic cleavage. **Macromol Biosci**, v. 12, n. 6, p. 740-50, Jun 2012.

WHU, S. W. et al. In vitro and in vivo evaluation of chitosan-gelatin scaffolds for cartilage tissue engineering. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 33, n. 5, p. 2855-63, Jul 1 2013.

WILLIAMS, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**, v. 29, n. 20, p. 2941-53, Jul 2008.

_____. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, v. 30, n. 30, p. 5897-909, Oct 2009.

WONG, T. W. Chitosan and its use in design of insulin delivery system. **Recent Pat Drug Deliv Formul**, v. 3, n. 1, p. 8-25, Jan 2009.

WOODBURY, M. E.; IKEZU, T. Fibroblast growth factor-2 signaling in neurogenesis and neurodegeneration. **J Neuroimmune Pharmacol**, v. 9, n. 2, p. 92-101, Mar 2014.

WU, G. J.; TSAI, G. J. Chitooligosaccharides in combination with interferon-gamma increase nitric oxide production via nuclear factor-kappaB activation in murine RAW264.7 macrophages. **Food Chem Toxicol**, v. 45, n. 2, p. 250-8, Feb 2007.

WU, N. et al. Immunostimulative Activity of Low Molecular Weight Chitosans in RAW264.7 Macrophages. **Mar Drugs**, v. 13, n. 10, p. 6210-25, Sep 30 2015.

WU, Y. et al. The pilot study of fibrin with temporomandibular joint derived synovial stem cells in repairing TMJ disc perforation. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 454021, 2014.

XIAO, W. et al. Rapid sciatic nerve regeneration of rats by a surface modified collagen-chitosan scaffold. **Injury**, v. 44, n. 7, p. 941-6, Jul 2013.

XUE, C. et al. Joint use of a chitosan/PLGA scaffold and MSCs to bridge an extra large gap in dog sciatic nerve. **Neurorehabil Neural Repair**, v. 26, n. 1, p. 96-106, Jan 2012.

YEO, Y. J. et al. Effects of chitosan nonwoven membrane on periodontal healing of surgically created one-wall intrabony defects in beagle dogs. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 72, n. 1, p. 86-93, Jan 15 2005.

YOUNES, I.; RINAUDO, M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. **Mar Drugs**, v. 13, n. 3, p. 1133-74, Mar 2015.

YOUSIF, E.; HADDAD, R. Photodegradation and photostabilization of polymers, especially polystyrene: review. **Springerplus**, v. 2, p. 398, 2013.

YUAN, Y. et al. The interaction of Schwann cells with chitosan membranes and fibers in vitro. **Biomaterials**, v. 25, n. 18, p. 4273-8, Aug 2004.

ZANG, S. et al. A comparison of physicochemical properties of sterilized chitosan hydrogel and its applicability in a canine model of periodontal regeneration. **Carbohydr Polym**, v. 113, p. 240-8, Nov 26 2014.

ZEINALI, R. et al. Regeneration of full-thickness skin defects using umbilical cord blood stem cells loaded into modified porous scaffolds. **ASAIO J**, v. 60, n. 1, p. 106-14, Jan-Feb 2014.

ZHANG, H.; NEAU, S. H. In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation. **Biomaterials**, v. 22, n. 12, p. 1653-8, Jun 2001.

ZHANG, K. et al. In-situ birth of MSCs multicellular spheroids in poly(L-glutamic acid)/chitosan scaffold for hyaline-like cartilage regeneration. **Biomaterials**, v. 71, p. 24-34, Dec 2015.

ZHANG, K. et al. Repair of an articular cartilage defect using adipose-derived stem cells loaded on a polyelectrolyte complex scaffold based on poly(L-glutamic acid) and chitosan. **Acta Biomater**, v. 9, n. 7, p. 7276-88, Jul 2013.

ZHANG, X. et al. Repair of rabbit femoral condyle bone defects with injectable nanohydroxyapatite/chitosan composites. **J Mater Sci Mater Med**, v. 23, n. 8, p. 1941-9, Aug 2012.

ZHAO, S. et al. Histological evaluation of different biodegradable and non-biodegradable membranes implanted subcutaneously in rats. **J Craniomaxillofac Surg**, v. 28, n. 2, p. 116-22, Apr 2000.

ZHENG, B. et al. Molecular Weight-Dependent Immunostimulative Activity of Low Molecular Weight Chitosan via Regulating NF-kappaB and AP-1 Signaling Pathways in RAW264.7 Macrophages. **Mar Drugs**, v. 14, n. 9, Sep 20 2016.

ZHOU, M. et al. Development and in vivo evaluation of small-diameter vascular grafts engineered by outgrowth endothelial cells and electrospun chitosan/poly(epsilon-caprolactone) nanofibrous scaffolds. **Tissue Eng Part A**, v. 20, n. 1-2, p. 79-91, Jan 2014.

APÊNDICE A - TABELA DE RESULTADOS DOS PARÂMETROS HISTOLÓGICOS

Tabela 3 - Parâmetros inflamatórios resultantes da implantação de membranas de quitosana em tecido conjuntivo subcutâneo do dorso de ratos.

	Dia			
	1	7	14	28
Infiltrado leucocitário				
Controle	0,5 (0-1)	1 (0-2)	0 (0-2)	0 (0-2)
Cg λ	2 (1-3)*	3 (3-3)*	1,5 (1-2)* [¶]	1 (1-2) [¶]
QS-BPM	3 (2-3)*	1 (1-1) [§]	1 (1-2)*	1 (1-1)
QS-APM	3 (2-3)*	1 (0-1) [§]	1 (0-1)	1 (0-1)
Tecido de granulação				
Controle	0 (0-0)	1 (0-1) [†]	0 (0-1)	0 (0-0) [‡]
Cg λ	0 (0-0)	0 (0-0)*	1 (1-2)* ^{¶¶}	2 (2-3)* ^{¶¶}
QS-BPM	0 (0-0)	2 (1-3)* [§]	1,5 (0-2)*	0 (0-0) [§]
QS-APM	0 (0-0)	1,5 (1-2) [§]	1 (0-2)	0 (0-0) [§]
Fibrose				
Controle	0 (0-0)	1,5 (0-2) [†]	3 (3-3) ^{†‡}	3 (3-3) ^{†‡}
Cg λ	0 (0-0)	0 (0-0)*	1 (1-1)* ^{¶¶}	1 (0-1)*
QS-BPM	0 (0-0)	2 (1-3) ^{§**}	3 (2-3) ^{§**}	3 (3-3) ^{§**}
QS-APM	0 (0-0)	1 (1-3) [§]	1,5 (0-3) ^{**#}	3 (2-3) [§]

Os implantes de QS-BPM e QS-APM foram mantidos por 1, 7, 14 ou 28 dias nos dorsos dos animais, quando então foram processados para HE e comparados aos tecidos controle ou com implante de Cg λ . Os valores representam mediana dos escores (valores mínimo e máximo) que variaram de 0 (ausente) a 3 (>75%) por 5 campos. *P<0,05 vs Controle mesmo dia; †P<0,05 vs Controle 1d; ‡P<0,05 vs Controle 7d; §P<0,05 vs Cg λ mesmo dia; ¶P<0,05 vs Cg λ 1d; ¶¶P<0,05 vs Cg λ 7d; #P<0,05 vs BPM mesmo dia; **P<0,05 vs BPM 1d. Kruskal-Wallis; Mann-Whitney.

APÊNDICE B - TABELA DE RESULTADOS DAS ANÁLISES IMUNOHISTOQUÍMICAS

Tabela 4 - Valores percentuais de imunomarcção celular para NFκB e FGF-2 resultantes da implantação de membranas de quitosana no tecido subcutâneo do dorso de ratos.

	Dia			<i>p</i> -Valor
	1	7	14	
NFκB citoplasmático				
Controle	5,0±2,3	55,0±0,6	8,0±3,5	0,084
QS-BPM	9,7±1,6	62,0±9,2	16,5±1,4	
QS-APM	5,5±0,3	42,0±3,5	15,7±4,8	
NFκB Nuclear				
Controle	1,8±0,7	12,0±3,5	1,7±0,4	0,012
QS-BPM	8,2±1,3*	5,0±0,6*	2,7±0,8	
QS-APM	8,1±1,1*	11,2±2,2	6,9±2,4	
NFκB Relação Núcleo/Citoplasma				
Controle	0,5±0,1	0,2±0,1	0,6±0,3	0,005
QS-BPM	1,0±0,3	0,1±0,0	0,2±0,0	
QS-APM	1,5±0,1*	0,3±0,0	0,4±0,0	
FGF-2				
Controle	6,4±1,5	19,2±1,2	2,9±0,3	<0,001
QS-BPM	21,8±0,3*	64,5±3,2*	27,5±6,1*	
QS-APM	4,2±0,2	59,5±7,8*	35,5±8,4*	

Imunomarcções para NFκB nuclear e citoplasmático e FGF-2 por coloração DAB/Peróxido nos tecidos adjacentes às membranas de QS-BPM e QS-APM em comparação ao controle. Os valores representam a média e EPM do percentual de células marcadas nos 5 campos selecionados e avaliados nos dias 1, 7 e 14. * $p < 0,05$ vs controle no mesmo dia. Teste 2-way-ANOVA/Bonferroni (Média±EPM).

ANEXO A - PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - CEPA/UFC




Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO


Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 68/2013, sobre o projeto intitulado: **“AVALIAÇÃO DE ESPONJAS DE QUITOSANA IMPREGNADAS COM ALENDRONATO NA REGENERAÇÃO ÓSSEA EM DEFEITOS CRÍTICOS DE CALVÁRIA DE RATOS,”**, de responsabilidade da Profa. Dra. Vilma de Lima e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 26 de setembro de 2013.

Fortaleza, 27 de novembro de 2013


Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

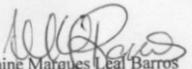
ANEXO B - ATA DA SESSÃO DE DEFESA DA TESE APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA

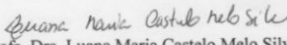
	ATA DE SESSÃO DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO
---	---

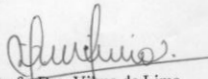
Instituição Universidade Federal do Ceará	
Centro/Faculdade Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem - FFOE	
Departamento Departamento de Clínica Odontológica	Curso de Pós-Graduação Doutorado em Odontologia/UFC
Ata da Sessão de Defesa da Tese de Doutorado de JOSÉ CARLOS VIANA RIBEIRO	
Realizada no dia 31 de janeiro de 2017	

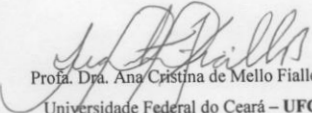
Às oito horas e trinta minutos do dia trinta e um de janeiro do ano de dois mil e dezessete, realizou-se a sessão de defesa de Tese de Doutorado do aluno **José Carlos Viana Ribeiro**. O trabalho tinha como título "INFLUÊNCIA DA MASSA MOLAR NA BIOCMPATIBILIDADE DE MEMBRANAS DE QUITOSANA EM TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS" compunham a banca examinadora as professoras doutoras **Vilma de Lima** (orientadora), **Luana Maria Castelo Melo Silva**, **Natássia Albuquerque Ribeiro**, **Ana Cristina de Mello Fiallos** e **Denusa Moreira Veríssimo**. A defesa foi aberta pela Professora Dra. **Vilma de Lima** do Programa de Pós-graduação em Odontologia, que apresentou a banca examinadora, explicou as normas de sessão de defesa e passou a palavra para a discente. Após a exposição do trabalho, seguiu-se o processo de arguição do doutorando. A primeira examinadora a arguir o trabalho foi a professora **Luana Maria Castelo Melo Silva**. Logo após procederam à arguição as professoras doutoras **Natássia Albuquerque Ribeiro**, **Ana Cristina de Mello Fiallos** e **Denusa Moreira Veríssimo** e **Vilma de Lima**. Em seguida, a banca examinadora reuniu-se reservadamente a fim de avaliar o desempenho do doutorando para fazer jus ao título de DOUTOR EM ODONTOLOGIA. A versão final da tese devidamente conferida pelo orientador deverá ser entregue no prazo de 60 dias a partir da data da defesa. Por unanimidade, a banca examinadora considerou APROVADO o trabalho do aluno. Nada mais havendo a relatar, a sessão foi encerrada às doze horas, e para constar, eu, **Janaine Marques Leal Barros**, secretária executiva do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, lavrei a presente ata que, depois de lida e aprovada, será assinada por mim e pelos membros da banca examinadora, com ciência do aluno.

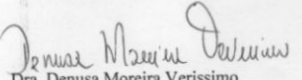
Fortaleza, 31 de janeiro de 2017.

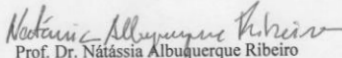

Janaine Marques Leal Barros
Secretária Executiva do PPGO - UFC


Profa. Dra. Luana Maria Castelo Melo Silva
Faculdade Nordeste-FANOR


Profa. Dra. Vilma de Lima
Orientadora- UFC


Profa. Dra. Ana Cristina de Mello Fiallos
Universidade Federal do Ceará - UFC


Dra. Denusa Moreira Verissimo
Universidade Federal do Ceará - UFC


Prof. Dr. Natássia Albuquerque Ribeiro
Faculdade Nordeste-FANOR

Ciência (assinatura do aluno):

