

Inclusões de quitosana no subcutâneo de rato: avaliação clínica, histológica e morfométrica*

Chitosan inclusions in the subcutaneous space of rats: clinic, histologic and morphometric evaluation

Maila Karina Mattos de Brito¹
Claudia Helena Pellizzon⁴

Silvana Artioli Schellini²
Cypriano Galvão da T. Neto⁵

Carlos Roberto Padovani³

Resumo: FUNDAMENTOS: A quitosana é polímero derivado da quitina, com vários tipos de aplicação na área médica. OBJETIVO: Avaliar a biocompatibilidade de membranas de quitosana no subcutâneo de ratos.

MÉTODOS: Foram utilizados 20 ratos “Wistar” machos, nos quais foram implantadas membranas de quitosana, na região mediana dorsal. Os animais foram sacrificados: sete, 15, 30 e 60 dias após a cirurgia, tendo sido avaliados clinicamente durante o período experimental e com fotodocumentação no momento do sacrifício. Após o sacrifício, as membranas e tecidos adjacentes foram removidos e preparados para exame histológico e morfométrico. RESULTADOS: Nenhum animal apresentou efeitos adversos que pudessem ser atribuídos à implantação das membranas. O exame histológico mostrou que as inclusões são lisas e homogêneas e não são colonizadas por células do hospedeiro, sendo circundadas por pseudocápsula composta por fibroblastos e células inflamatórias. A morfometria da pseudocápsula revelou espessura semelhante durante todo o período experimental ($P > 0,05$).

CONCLUSÃO: A quitosana pode ser opção para uso como implante não integrado. Novos estudos devem ser realizados para comprovar a biocompatibilidade a longo prazo.

Palavras-chave: Materiais biocompatíveis; Quitosana; Ratos Wistar; Teste de materiais

Abstract: Background: Chitosan is a polymer derivative from chitin applied in many medical specialties. Objective: To evaluate the biocompatibility of chitosan membranes used as inclusion material into subcutaneous of rats.

Methods: Twenty male Wistar rats received chitosan membranes into the subcutaneous area of the dorsal medial region. The animals were randomly divided in four groups with 5 animals each, sacrificed on 7th (G1), 15th (G2), 30th (G3) and 60th (G4) postoperative day (PO). All animals were clinically evaluated daily and by photo-documentation at the sacrifice moment. The animals and the material were assessed for evidence of host response by histological and morphometric evaluation of the implants and the surrounding soft tissues. The material was fixed in 10% formalin and then the sections were stained with hematoxylin and eosin.

Results: None of animals presented side effects attributable to the implants. The histological evaluation showed smooth and homogeneous inclusions with no host cells inside and were encircled by a pseudocapsule of fibroblasts and inflammatory cells. The morphometric evaluation showed no statistical difference between different groups ($P > 0.05$).

Conclusion: Chitosan membrane might be suggested as an option of non-integrated implant. Other studies have to be carried out to evaluate longstanding biocompatibility.

Keywords: Biocompatible materials; Chitosan; Materials testing; Rats, Wistar

Recebido em 25.03.2008.

Aprovado pelo Conselho Consultivo e aceito para publicação em 26.12.08.

* Trabalho foi desenvolvido na Faculdade de Medicina de Botucatu e Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (Unesp) – São Paulo (SP), Brasil.
Suporte financeiro: Este estudo recebeu auxílio financeiro da Fapesp para aquisição de material de consumo e da Capes, que forneceu bolsa de pós-graduação para a autora.
Conflito de interesse: Declaramos não possuir nenhum tipo de conflito de interesse, assim como não recebemos nenhum tipo de suporte financeiro para a manufatura do produto ou para a realização do experimento.

¹ Mestre, Departamento de Oftalmologia, Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista (Unesp) – Botucatu (SP), Brasil.

² Professora titular, Departamento de Oftalmologia, Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista (Unesp) – Botucatu (SP), Brasil.

³ Professor titular, Departamento Bioestatística, Instituto de Biociências – Universidade Estadual Paulista (Unesp) – Rio Claro (SP), Brasil.

⁴ Professora doutora, Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências – Universidade Estadual Paulista (Unesp) – Rio Claro (SP), Brasil.

⁵ Doutorando, Departamento de Polímeros, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) – Natal (RN), Brasil.

INTRODUÇÃO

A quitosana é polímero natural, derivado da quitina, material que participa da composição do exoesqueleto de crustáceos, como camarão, lagosta e caranguejo, e de insetos, como formiga e besouro.¹

Esse tipo de material vem sendo utilizado com sucesso na área médica e farmacêutica, empregado para a obtenção de produtos cosméticos, no desenvolvimento de pele artificial para o tratamento de queimados, a fim de simular a permeabilidade de substâncias ativas através da pele humana,^{1,2} na obtenção de curativos com a capacidade de deter hemorragias,^{3,4} para prevenir infecções,⁵ no desenvolvimento de filmes com ação antimicrobiana para a conservação de carnes, frutas e cereais,^{6,7} membranas para hemodiálise, prevenindo a adsorção de proteínas, a adesão de plaquetas e a formação do trombo por mecanismo de repulsão elétrica, já que as interações que levam a trombose ocorrem na interface sangue-biomaterial.^{3,4,7}

Apesar da grande variedade de utilizações sugeridas, ainda pouco se conhece sobre a biocompatibilidade desse material.

Para ser utilizado na área biomédica, um polímero deve ser biocompatível, definido como material que não produza reação adversa e deve ter a habilidade de desencadear em um organismo resposta apropriada para uma aplicação específica.^{8,9}

No entanto, a biocompatibilidade de um material depende de diversos fatores inerentes ao organismo, como a espécie, a herança genética e o local de implantação ou ação, e ao material em si; e inerentes ao material que são a sua forma, tamanho, rugosidade e química de superfície, composição, morfologia, duração do contato com o organismo e degradação. Os polímeros naturais são geralmente biodegradáveis e possuem excelente biocompatibilidade quando comparados aos polímeros sintéticos.¹⁰⁻¹²

O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a biocompatibilidade de membranas de quitosana, colocadas no subcutâneo de ratos.

MATERIAL E MÉTODOS

Este foi um estudo experimental, de caráter intervencionista e randomizado, cujo protocolo foi aprovado para execução pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu (2005/494).

O estudo foi desenvolvido na Faculdade de Medicina de Botucatu, tendo sido utilizados 20 ratos machos, da linhagem Wistar, procedente do Biotério Central da Unesp. Os ratos foram divididos por sorteio em quatro momentos experimentais, contendo, cada um, cinco animais, sacrificados sete (G1), 15 (G2), 30 (G3) e 60 (G4) dias após a inclusão.

Foram feitas as seguintes avaliações: 1) clínica: avaliações diárias, atentando-se para sinais inflamatórios ou infecciosos no local da implantação e também para possíveis alterações de comportamento que pudessem

sugerir algum efeito sistêmico; 2) fotodocumentação: feita no momento do sacrifício, pelo mesmo observador e guardando a mesma distância do objeto a ser fotografado; 3) avaliação histológica: após o sacrifício, a região da implantação foi removida e preparada para análise em microscópio de luz, atentando-se para a interface entre o hospedeiro e a inclusão e para o próprio material implantado; 4) avaliação morfométrica: para quantificação da pseudocápsula formada ao redor do implante, utilizando teste de Tukey.

Caracterização da quitosana utilizada: a quitosana foi fabricada pela Polymar Ltda, Brasil, com grau de desacetilação em torno de 80%, com massa molar determinada pelo método de viscosimetria, utilizando a equação de Mark-Howink-Sakurada.^{13,14} A quitosana foi dissolvida em solução aquosa de ácido acético 2% (v/v), sob agitação por 24 horas, para obtenção de uma solução de polímero a 1,5% (m/v).¹⁵ Após esse período a solução foi filtrada, a fim de eliminar resíduos sólidos, colocada 24 horas em estufa a 50°C para evaporação do solvente, seguida da adição de solução aquosa de NaOH 5% por duas horas para neutralizá-la, sendo, em seguida, lavada com água destilada. Após estiramento e secagem à temperatura ambiente, foram obtidas membranas com espessura média de 40µm, de 2 x 1cm de tamanho (medidor de camadas Digiderm da Mitutoyo).^{13,15}

Procedimento cirúrgico para implantação das membranas: os procedimentos foram feitos sob anestesia geral, por meio da injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico 3% (1ml/kg de peso) e em condições de assepsia e antissepsia. Foram realizadas a tricotomia da região dorsal do rato e uma incisão longitudinal, de aproximadamente 1,5cm na região dorsal utilizando bisturi lâmina 15, seguida de criação de bolsão no subcutâneo com tesoura de ponta romba que abrigou as inclusões. A membrana de quitosana foi introduzida abaixo do subcutâneo e fixada no local com pontos separados, utilizando fio absorvível Vicryl 5-0 ("Ethicon") (Figura 1). Ao final do procedimento, os animais receberam uma dose de antibiótico enrofloxacino a 10% intraperitoneal e pomada de mupirocina 2%.

Os animais foram mantidos em caixas individuais, com temperatura constante de 36°C e ciclo de luz artificial de 12/12 horas, recebendo água filtrada e alimentação com ração Purina própria para a espécie *ad libitum*.

O sacrifício foi feito usando sobredose de pentobarbital sódico a 3% intraperitoneal. Após o sacrifício foi retirada a membrana de quitosana (Figura 2), sendo o material fixado em formol 10%, desidratado em série crescente de alcoóis, diafanizado, incluído em parafina, cortado com espessura de 4µm em micrótomo rotativo RM-2155 (Leica) e corado por hematoxilina-eosina (HE). O exame histológico buscou observar a integridade da membrana, a intensidade da reação inflamatória do tecido circunvizinho e o grau de integração do biomaterial com o tecido do receptor.

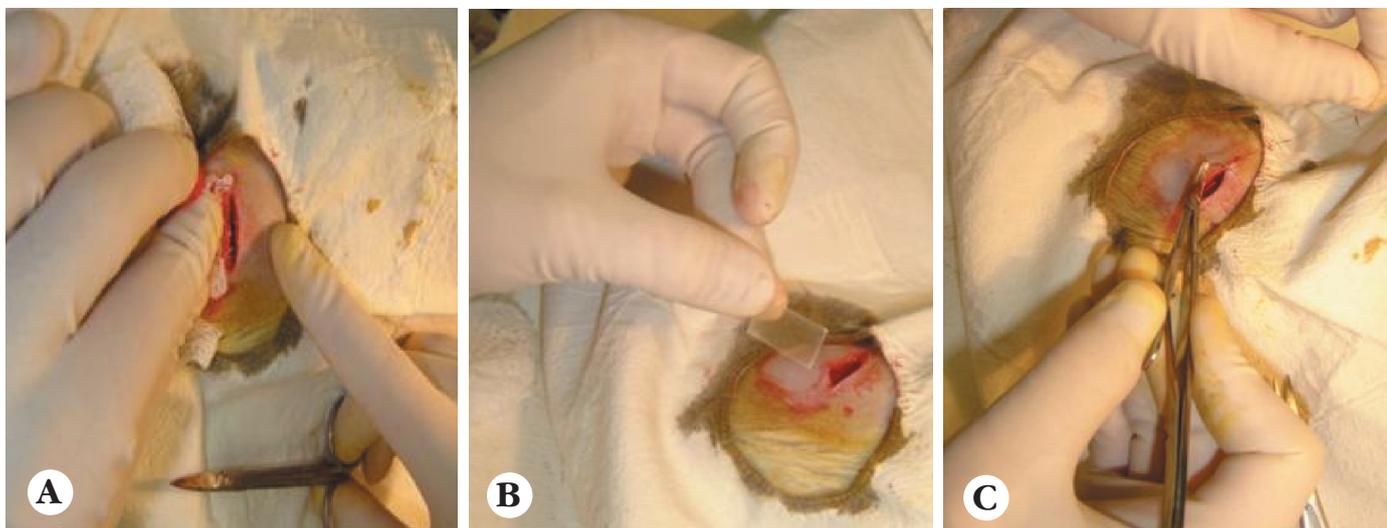


FIGURA 1: Demonstração da implantação das inclusões no subcutâneo do rato: A. incisão da pele na região dorsal com bisturi; B. apresentação da membrana a ser implantada; C. sutura na pele para fechamento da incisão, após o implante

As lâminas foram, então, analisadas e fotodocumentadas ao microscópio Leica DM, acoplado ao *software* Leica QWin Versão 3.1 (Leica – UK). Foi avaliada morfometricamente a espessura da pseudocápsula formada ao redor da implantação da quitosana, pelo módulo linear semi-automático do programa. Esse resultado foi transferido para a planilha Excel e submetido à análise estatística, utilizando-se a técnica de análise de variância para o experimento com um fator em grupos independentes complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey,¹⁶ considerando-se $P > 0,05$.

RESULTADOS

Os animais permaneceram aparentemente saudáveis e alimentando-se bem até o sacrifício, não havendo óbitos.

Exame clínico

A ferida cirúrgica evoluiu bem, sem sinais de infecção, deiscência ou extrusão em todos os animais dos quatro grupos. A cicatrização foi completa, tendo sido difícil verificar o local do procedimento nos animais sacrificados com 30 e 60 dias, devido ao crescimento dos pêlos que impediam a visibilização da cicatriz. A membrana não promoveu saliência, nem qualquer outra alteração visível da pele sobre o local em que foi implanta-



FIGURA 2: Animal pós-morte por sobredose de anestésico, demonstrando-se a remoção do fragmento da região dorsal, contendo a membrana de quitosana juntamente com a pele, tecido celular subcutâneo e fâscias adjacentes, a ser preparado para avaliação histológica

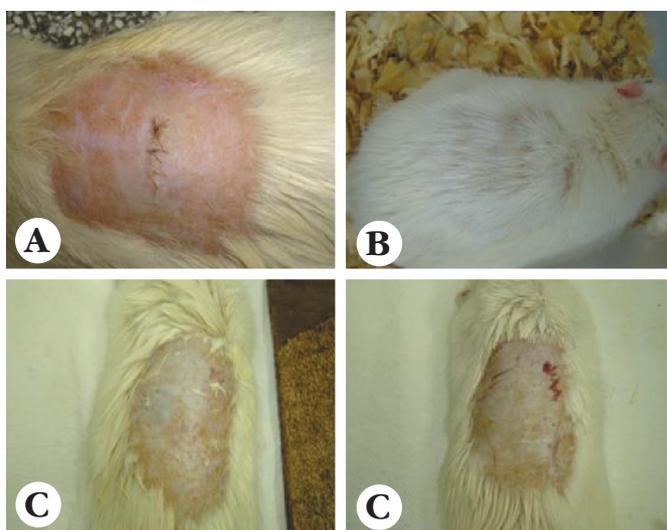


FIGURA 3: A. exame clínico no sétimo dia pós-operatório; B. no 15º dia após a implantação, a cicatriz cirúrgica estava em bom estado, com pêlos em crescimento; C. no 30º dia após a implantação, não era possível visualizar a cicatriz cirúrgica, sendo preciso realizar depilação; D. no 60º dia de pós-operatório não se observava nem a cicatriz cirúrgica, nem a membrana; animal em bom estado geral

da, sendo impossível intuir sua localização no subcutâneo não fosse a cicatriz cirúrgica (Figura 3).

Análise histológica

G1: a inclusão foi reconhecida nos cortes histológicos como material liso, espesso e homogêneo, formado por blocos semelhantes que se unem entre si. Ao redor da inclusão, foi observada a formação de uma pseudocápsula, composta de fibroblastos jovens, neovasos ativos, hemácias, fibras colágenas e poucas células inflamatórias, a maioria delas de neutrófilos e linfócitos. A fibrose esteve mais estreita no setor inferior da inclusão, e sobre toda a superfície da mesma foram observadas células distribuídas em camada única (Figura 4A).

G2: após 15 dias do procedimento cirúrgico, havia grande número de fibroblastos com características de células jovens. Também muitas células inflamatórias foram observadas ao redor da inclusão (Figura 4B).

G3: a fibrose apresentou-se mais espessa, com fibroblastos volumosos. As células inflamatórias encontravam-se ao redor da inclusão e eram predominantemente linfócitos, monócitos, neutrófilos e células gigantes de corpo estranho (Figura 5A).

G4: o implante apresenta-se rodeado por uma fibrose celularizada, com fibroblastos maduros e houve considerável diminuição da reação inflamatória (Figura 5B).

Exame morfológico

Embora ao exame macroscópico e histológico houvesse a impressão de fibrose (pseudocápsula) espessa, numericamente não houve diferença significativa entre os grupos (Tabela 1).

DISCUSSÃO

Esse trabalho foi realizado para validar a biocompatibilidade da membrana de quitosana, usando como modelo experimental o rato, animal de fácil manipulação e manutenção.^{8, 17}

A avaliação clínica dos animais durante o período estudado mostrou ausência de sinais inflamatórios evidentes ou extrusão das inclusões. Foi possível observar o crescimento de pêlos na região cirúrgica, o que é indicio de que a membrana implantada não promove danos à região de implantação, como já observado em estudos anteriores.^{9, 18, 19}

O estudo histológico revelou basicamente proliferação de fibroblastos (pseudocápsula) e células inflamatórias ao redor da membrana de quitosana, resposta compatível com a regeneração tecidual por tecido conjuntivo.

Apesar de as células inflamatórias serem abundantes no início do experimento, com o passar do tempo, houve diminuição da reação tecidual. Entretanto, na avaliação de 30 dias após a implantação, foram detectadas células gigantes, resposta do organismo à introdução de

TABELA 1: Média e desvio padrão dos valores médios da espessura (μm) da fibrose (pseudocápsula) formada ao redor das inclusões de quitosana implantada no subcutâneo de ratos, nos diversos momentos experimentais

| Momento de avaliação | | | | |
|--|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| G1 $49,9 \pm 9,4$ | G2 $54,6 \pm 3,4$ | G3 $54,3 \pm 6,9$ | G4 $57,1 \pm 4,8$ | Valor P P = 0,123 |
| G1 (7 ^o PO) = G2 (15 ^o PO) = G3 (30 ^o PO) = G4 (60 ^o PO) | | | | |

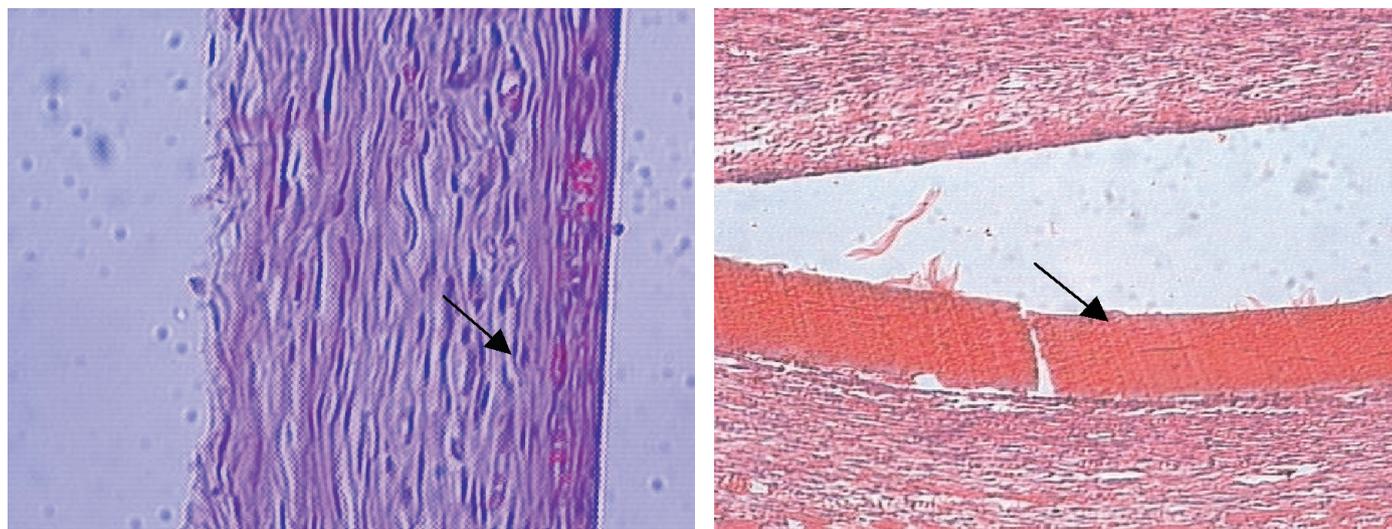


FIGURA 4: A. corte histológico da pseudocápsula que se forma ao redor do implante, mostrando fibrose, com grande número de fibroblastos (seta), em animal sacrificado sete dias após o procedimento (G1). (HE – 40x); B. a membrana de quitosana (seta), envolta pela pseudocápsula, 15 dias após o implante (HE – 10x)

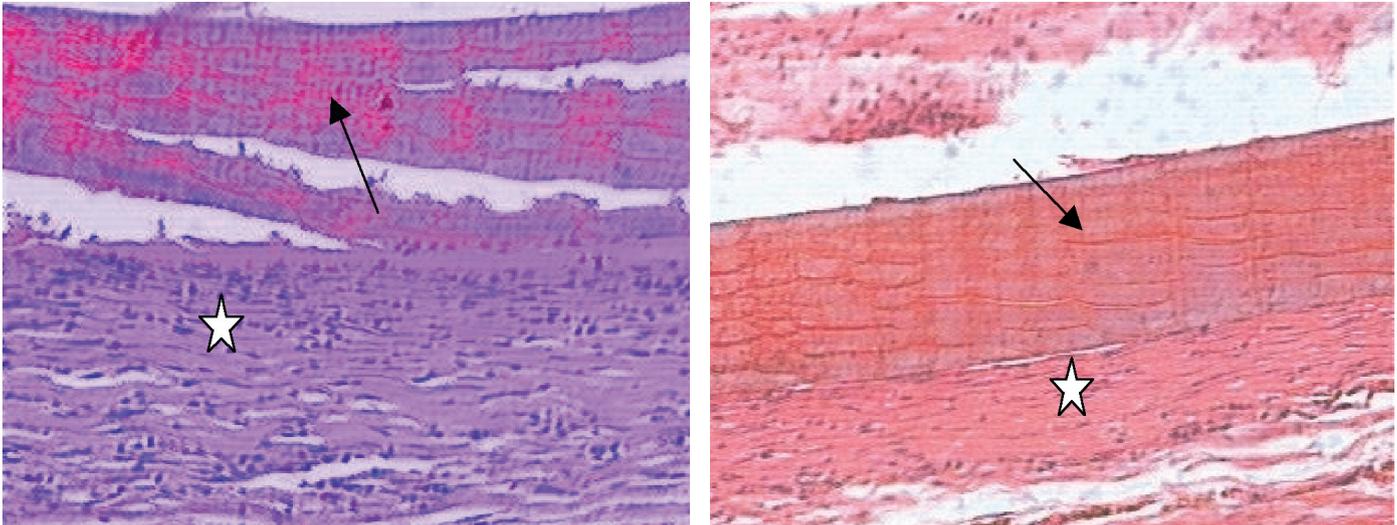


FIGURA 5: A. pseudocápsula (Estrela) ao redor da membrana (seta) encontra-se mais espessa e homogênea 30 dias após a cirurgia (HE – 20x); B. o material permanece sem reação tecidual em seu interior, envolto por pseudocápsula após 60 dias da implantação (HE – 20x)

material estranho, uma vez que essas células teriam a capacidade de envolver e até de fagocitar pequenas partículas não pertencentes ao organismo receptor.^{20, 21}

Dessa forma, considerou-se que a membrana de quitosana é indutora de pouca reação inflamatória, do tipo crônica. Não houve sinais de rejeição, o que pode ser indicativo favorável a seu uso como material para inclusões. Essa foi também a conclusão a que chegaram outros estudiosos, porém fazendo uso do material para outros fins.^{1, 19, 22, 23}

Outro aspecto a ressaltar foi que não houve colonização do implante por células do hospedeiro, sendo esse um material que não possui poros, de superfície totalmente lisa. Dessa forma, inclusões de quitosana devem ser consideradas implantes que não sofrem integração com o hospedeiro, permanecendo com as características que apresentavam antes do contato com o receptor.

O exame morfométrico da pseudocápsula que se forma ao redor do implante visou estabelecer indícios de aumento da reação tecidual contra o material implantado, o que não se confirmou, uma vez que não houve aumento da mesma ao longo do experimento. Esse tipo

de mensuração utilizado já havia sido empregado, em análise de fibras musculares,²⁴ para avaliação de células cancerígenas e de qualidade de carnes.^{25, 26}

Assim como outros polímeros, como poliésteres, poliaminoácidos, lecitinas, etc., a quitosana vem sendo utilizada com propósitos médicos, devido à necessidade de materiais biocompatíveis e de baixo custo, para utilização em dermatologia, ortopedia e oftalmologia.^{6, 7, 19}

Os resultados aqui obtidos nos autorizam a sugerir que membrana de quitosana possa ser aplicada também como inclusões, na forma de membranas a serem implantadas para reparação tecidual. Novos estudos devem ser realizados para definir os resultados ou a repercussão sistêmica a longo prazo da aplicação desse material.

CONCLUSÃO

A inclusão de membranas de quitosana no subcutâneo de ratos apresenta pouca reação inflamatória, com formação de fibrose (pseudocápsula) ao redor. As características observadas permitem considerar que esse tipo de material é do tipo não integrado e que pode ter lugar como implante a ser utilizado em reparações teciduais. □

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem ao dr. Alexandre Paratela Gama, oftalmologista que os auxiliou na execução dos procedimentos cirúrgicos para colocação dos implantes.

REFERÊNCIAS

1. Majeti NV, Kumar R. A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym.* 2000;46:1-27.
2. Dureja H, Tiwary AK, Gupta S. Simulation of skin permeability in chitosan membranes. *Int J Pharm.* 2001;213:193-8.
3. Benesch J, Tengvall P. Blood protein adsorption onto chitosan. *Biomaterials.* 2002;23:2561-8.
4. Okamoto Y, Yano R, Miyatako K, Tomohiro I, Shigemasa Y, Minami S. Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. *Carbohydr Polym.* 2003;53:337-42.
5. Burkatovskaya M, Tegos GP, Swietlik E, Demidova TN, Castano AP, Hamblin MR. Use of chitosan bandage to prevent fatal infections developing from highly contaminated wounds in mice. *Biomaterials.* 2006;27:4157-64.
6. Dodane V, Vilivalam VD. Pharmaceutical applications of chitosan. *Pharm Scie Technol To.* 1998;6:246-53.
7. Sandford PA. Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications. 4th ed. New York: Elsevier; 1988. 665p.
8. VandeVord PJ, Matthew HW, DeSilva SP, Mayton L, Wu B, Wooley PH. Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. *J Biomed Mater Res.* 2002; 59:585-90.
9. Xi-Guang C, Cheng-Sheng L, Chen-Guang L, Xiang-Hong M, Chong ML, Hyun-Jin P. Preparation and biocompatibility of chitosan microcarriers as biomaterial. *Biochem Eng J.* 2006;27:269-74.
10. Schellini SA, Marques MEA, Rahal SC, Ranzani JJ, Padovani CR. Vegetal polymer in anophthalmic socket reconstruction. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996;37:502.
11. Schellini SA, Marques MEA, Ranzani JJ, Taga EM. Synthetic hidroxyapatite in anophthalmic socket reconstruction. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39:502.
12. Schellini SA, Hoyama E, Padovani CR, Ferreira VLR, Rossa R. Complicações com o uso de esferas não integráveis e integráveis na reconstrução da cavidade anoftálmica. *Arq Bras Oftalmol.* 1999;62:382.
13. Hiemenz PC. *Polymer chemistry: the basic concepts.* New York: Marcel Dekker Inc;1984. 738p.
14. Lucas EF, Soares BG, Monteiro EEC. Caracterização de polímeros – determinação de peso molecular e análise térmica. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais Ltda; 2001. 366p.
15. Rinaudo M, Pavlov G, Desbrières J. Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. *Polymer.* 1999;40:7029-32.
16. Zar JH. *Biostatistical analysis.* 4th ed. New Jersey: Prentice-Hall; 1999. 942p.
17. Onishi H, Machida Y. Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. *Biomaterials.* 1999;20:175-82.
18. Khor E. Chitin: a biomaterial in waiting. *Curr Opin Solid State Mater Sci.* 2002;6:313-7.
19. Khor E, Lim LY. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials.* 2003;24:2339-49.
20. Robbins SL, Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Patologic Basis of Disease.* 6th ed. In: Tucker Collins, editor. Acute and chronic inflammation. Tissue repair: cellular, growth, fibrosis, and wound healing. Philadelphia: Saunders; 1999. p. 50-112.
21. Gartner LP, Hiatt JL. Tecido conjuntivo. In: *Tratado de histologia em cores.* 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 88-103.
22. Kratz G, Arnander C, Swedenborg J, Back M, Falk C, Gouda I, et al. Heparin-chitosan complexes stimulate wound healing in human skin. *J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 1997;31:119-23.
23. Shepherd R, Reade S, Falshaw A. Chitosan functional properties. *Glycoconj J.* 1997;14:535-42.
24. Brito MKM, Filho JCSC, Vanderlei LCM, Tarumoto MH, Dal Pai V, Giacometti JA. Geographical dimensions of fibers from de soleum muscle in rats exercised on treadmill: the importance of the analysis by means of digitalized images. *Rev Bras Med Esp.* 2006;12:93-6.
25. Heckman CA, Jamasbi RJ. Describing shape dynamics in transformed cells through latent factors. *Exp Cell Res.* 1999;246:69-82.
26. Velotto S, Guida G, Marino M, Mase G, Crasto A. Histomorphometrical and comparative analysis of three muscles of Buffalo (*Bubalus bubalis* L). *Ital J Anat Embryol.* 2002;107:233-42.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA / MAILING ADDRESS:

Silvana Artioli Schellini
 Depto de Oftalmologia - Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP
 18618 - 970 Botucatu SP
 Tel./Fax: 14 3811 - 6256 3811-6256
 e-mail: sartioli@fmb.unesp.br

Como citar este artigo/*How to cite this article*: Brito MKM, Schellini SA, Padovani CR, Pellizzon CH, Trindade-Neto CG. Inclusões de quitosana no subcutâneo de rato: avaliação clínica, histológica e morfométrica. *An Bras Dermatol.* 2008;84(1):35-40.