



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ESTRUTURAL E FUNCIONAL

SILVANO DA CUNHA DIONIZIO

**EFEITO DA LASERTERAPIA EM CÉLULAS PRÉ-OSTEOBLÁSTICAS MC3T3-E1  
CULTIVADAS SOBRE ARCABOUÇOS DE QUITOSANA**

NATAL/RN  
2018

SILVANO DA CUNHA DIONIZIO

**EFEITO DA LASERTERAPIA EM CÉLULAS PRÉ-OSTEOBLÁSTICAS MC3T3-E1  
CULTIVADAS SOBRE ARCABOUÇOS DE QUITOSANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Estrutural e Funcional da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Galvão Barboza

NATAL/RN  
2018

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN  
Sistema de Bibliotecas - SISBI

Catálogo de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Leopoldo Nelson - -Centro de Biociências - CB

Dionizio, Silvano da Cunha.

Efeito da laserterapia em células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 cultivadas sobre arcabouços de quitosana / Silvano da Cunha Dionizio. - Natal, 2019.

57 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia Estrutural e Funcional.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Galvão Barboza.

1. Laser - Dissertação. 2. Biomateriais - Dissertação. 3. Polímeros - Dissertação. 4. Proliferação celular - Dissertação. I. Barboza, Carlos Augusto Galvão. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 621.375.826

SILVANO DA CUNHA DIONIZIO

**EFEITO DA LASERTERAPIA EM CÉLULAS PRÉ-OSTEOBLÁSTICAS MC3T3-E1  
CULTIVADAS SOBRE ARCABOUÇOS DE QUITOSANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Estrutural e Funcional da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Natal, 27 de Junho de 2019

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Carlos Augusto Galvão Barbosa  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
(Orientador)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Naisandra Bezerra da Silva Farias  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
(Membro Interno)

---

Prof. Dr. Raniero Fagundes de Melo Silveira  
Faculdade Maurício de Nassau  
(Membro Externo)

Dedico este trabalho à minha família, minha esposa Conceição que sempre me apoiou na procura do crescimento profissional e pessoal, e ao meu filho Murilo, que agora é o motivo maior da busca do meu sucesso.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, agradeço pelo dom da vida e por sempre me colocar no caminho do bem.

A minha família, por sempre me incentivar na busca dos meus objetivos.

Ao meu orientador, Carlos Augusto Galvão Barboza, pelos ensinamentos transmitidos, por toda paciência, compreensão e por despertar em mim a paixão pela pesquisa.

Aos meus professores do Programa de Pós-graduação em Biologia Estrutural e Funcional, por todos os conhecimentos transmitidos e pelo incentivo na busca do saber.

Ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), que cedeu seus laboratórios para a realização da pesquisa.

Ao Laboratório de Tecnologia e Biotecnologia Farmacêutica-TECBIOFAR da UFRN, pela contribuição na caracterização das membranas de quitosana.

À Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), pelo processamento dos espécimes para análise sob microscopia eletrônica de varredura.

Ao Laboratório de Caracterização Estrutural de Materiais do Departamento de Engenharia de Materiais da UFRN, pela contribuição nas análises de microscopia.

Aos meus colegas de mestrado, pela amizade, troca de conhecimentos e pelo apoio incondicional.

A Vladimir Sabino, pela grande contribuição nas realizações dos experimentos.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Rio Grande do Norte-RN pela concessão da bolsa de mestrado.

Muito obrigado por tudo!

## EPIGRAFE

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.*

*(José de Alencar)*

## RESUMO

A quitosana é um biopolímero que apresenta uso potencial como arcabouço na engenharia tecidual devido às suas propriedades mecânicas e biológicas, tais como biodegradabilidade não toxicidade, efeito antibacteriano e biocompatibilidade. A laserterapia tem sido estudada como uma ferramenta auxiliar nas técnicas de engenharia tecidual pelo seu efeito bioestimulatório *in vitro* em diversos tipos celulares, contudo seu efeito sobre células cultivadas em arcabouços de quitosana ainda é desconhecido. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da laserterapia em células pré-osteoblásticas cultivadas sobre arcabouços de quitosana. A quitosana e as membranas produzidas foram submetidas a caracterização físico-química e de superfície. As células da linhagem MC3T3-E1 foram expandidas e cultivadas em quatro grupos, de acordo com a superfícies de cultivo e a aplicação ou não de irradiação: P – plástico da placa de cultivo, sem irradiação, como controle positivo do crescimento celular; L0 – arcabouços de quitosana, sem irradiação; L1 – arcabouços de quitosana, com células irradiadas com dose de 1 J/cm<sup>2</sup>; e L4 - arcabouços de quitosana, com células irradiadas com dose de 4 J/cm<sup>2</sup>. A laserterapia foi realizada com laser diodo de InGaAlP, com comprimento de onda de 660 nm, potência de 30 mW, em dose única. A proliferação celular foi analisada nos intervalos de 24, 48 e 72 horas após a irradiação, através do ensaio de redução metabólica do Alamar Blue, enquanto a viabilidade celular foi avaliada através dos ensaios de Live/Dead e da Anexina/PI. A morfologia celular e a integração célula/biomaterial foram avaliados no intervalo de 72 horas por MEV. Os dados do ensaio de proliferação mostraram que o grupo L4 apresentou maior proliferação em comparação com grupos P e L0 no intervalo de 24 h ( $p < 0,01$ ) e exibiu uma tendência proliferativa em relação a L0 e L1 no intervalo de 72 h. A avaliação da viabilidade por Live/Dead revelou um grande número de células viáveis em todos os grupos, o que foi confirmado pela análise por Anexina/PI, que mostrou alta porcentagem de viabilidade celular nos grupos estudados (P: 89,2%; L0: 82,1%; L1: 82%; e L4: 85,2%). A análise por MEV revelou que no grupo não irradiado (L0) as células apresentaram-se mais isoladas e com formato arredondado, enquanto nos grupos irradiados (L1 e L4) as células exibiram projeções mais evidentes e formaram grupamentos celulares. Em conjunto, os dados do presente estudo mostraram que o arcabouço de quitosana produzido não influenciou a proliferação das células MC3T3-E1, no entanto também não prejudicou a viabilidade celular. A fotobiomodulação, principalmente na dose de 4 J/cm<sup>2</sup>, promoveu aumento da proliferação celular e permitiu que as células superassem eventuais condições desfavoráveis da superfície do biomaterial. Estes resultados sugerem que a laserterapia pode ser uma ferramenta eficaz para promover a proliferação celular nas técnicas de engenharia tecidual com arcabouços de quitosana.

**Palavras-chave:** Laser; biomateriais; polímeros; proliferação celular.

## ABSTRACT

Chitosan is a biopolymer that presents potential use as a scaffold in tissue engineering due to its mechanical and biological properties, such as biodegradability, non-toxicity, antibacterial effect and biocompatibility. Laser therapy has been studied as an auxiliary tool in tissue engineering techniques due to its *in vitro* biostimulating effect on several cell types, but its effect on cells grown on chitosan scaffolds is still unknown. The aim of this study was to evaluate the effect of laser therapy on pre-osteoblastic cells cultured on chitosan scaffolds. Chitosan and membranes produced were subjected to physical-chemical and surface characterization. Cells of the MC3T3-E1 lineage were expanded and divided into four groups according to the surface and the use or not of irradiation: P – plastic of the culture dish, without irradiation, as a positive control of cell growth; L0 – chitosan scaffolds, without irradiation; L1 – chitosan scaffolds, cells submitted to irradiation with a dose of 1 J/cm<sup>2</sup>; and L4 – chitosan scaffolds, cells submitted to irradiation with a dose of 4 J/cm<sup>2</sup>. Laser therapy was performed with InGaAlP diode laser, with wavelength of 660 nm, power of 30 mW, in a single dose. Cell proliferation was analyzed at 24, 48 and 72 h after irradiation through the Alamar Blue metabolic reduction assay, while cell viability was assessed by Live/Dead and Annexin V/PI assays. Cell morphology and cell-biomaterial integration were evaluated at 72 h by SEM. Data from the proliferation assay showed that L4 group exhibited greater proliferation compared to P and L0 groups at 24 h ( $p < 0.01$ ) and showed a proliferative tendency in relation to L0 and L1 at 72 h. The evaluation of viability by Live/Dead assay revealed a large number of viable cells in all groups, which was confirmed by Annexin V/PI analysis, which showed a high percentage of cell viability in the studied groups (P: 89.2%; L0: 82.1%; L1: 82%; e L4: 85.2%). SEM analysis revealed that in the non-irradiated group (L0) the cells were more isolated and rounded, while in the irradiated groups (L1 and L4) the cells showed more evident projections and formed cellular clusters. Taken together, data from the present study showed that the chitosan scaffolds produced did not influence the proliferation of MC3T3-E1 cells, but also did not impair cell viability. Photobiomodulation, especially at the dose of 4 J/cm<sup>2</sup>, promoted an increase in cell proliferation and allowed the cells to overcome any unfavorable conditions on the surface of the biomaterial. These results suggest that laser therapy may be an effective tool to promote cell proliferation in tissue engineering techniques with chitosan scaffolds.

**Key words:** Laser; biomaterials; polymers; cell proliferation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Estrutura química da quitina e quitosana. Adaptado de Dutta, Tripathi e Dutta (2012). A figura mostra a estrutura química da quitina, que apresenta o grupo acetil no carbono 2, e a quitosana sem o grupo acetil no carbono 2..... 18
- Figura 2.** (a) Desenho experimental do cultivo, irradiação e parâmetros utilizados no ensaio. Etapa de cultivo, irradiação e os ensaios realizados no experimento; (b) divisão dos grupos testados no experimento - P: Superfícies de poliestireno das placas de cultivo; L0: Controle não irradiado; L1: Controle com dose de 1 J/cm<sup>2</sup>; L4: controle irradiado com dose de 4 J/cm<sup>2</sup>; (c) parâmetros utilizados na irradiação; (d) doses e os tempos empregados na irradiação..... 31
- Figura 3.** Caracterização dos filmes de quitosana. Imagens do MEV- Hitachi TM300 mostram a superfície (a) e espessura (b) da membrana (2000X e 400X); a imagem da microscopia de força atômica (c) mostra a rugosidade da superfície da membrana em 3D; o difratograma de raios-X (d) mostra a cristalinidade da membrana de quitosana..... 36
- Figura 4.** Caracterização da membrana de quitosana. Espectro do FTIR da quitosana em pó e na forma de membrana (a); curva calorimétrica da membrana de quitosana (b); estrutura química da quitosana (c); percentual de intumescimento da membrana de quitosana (média ± desvio padrão) (d)..... 37
- Figura 5.** Redução do Alamar Blue nos grupos ao longo do experimento. Os dados representam a média ± desvio padrão. Asteriscos representam diferenças significativas (\*p<0,05; \*\*p<0,01; Teste de Mann Whitney)..... 39
- Figura 6.** Resultado do ensaio *Live/Dead*. As fotomicrografias (200 e 100 µm) das células MC3T3-E1 mostram células viáveis marcadas com calceína AM (verde), no intervalo de 72h..... 41
- Figura 7.** Imunomarcagem das células MC3T3-E1 com Annexin V/PI nos grupos estudados, em 72 h. Os quadrantes representam o percentual de células exibindo os eventos celulares, de acordo com a marcação: Q1 (Anex-/PI+): necrose; Q2: (Anex+/PI+): apoptose tardia; Q3 (Anex+/PI-): apoptose inicial; Q4 (Anex-/PI-): viabilidade celular..... 42
- Figura 8.** Eletromicrografias de varredura das células cultivadas sobre as membranas de quitosana, no intervalo de 72 horas. Aumento de 1500x. L0: controle não irradiado; L1: controle irradiado com dose de 1 J/cm<sup>2</sup>; L4: controle irradiado com dose de 4 J/cm<sup>2</sup>..... 43

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1.</b> Caracterização da quitosana em pó.....	35
---	----

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>ATP</b>	do inglês <i>adenosine triphosphate</i> – adenosina trifosfato
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Cálcio
<b>cm<sup>2</sup></b>	Centímetro ao quadrado
<b>COX</b>	do inglês <i>cytochrome c oxidase</i> - Citocromo c oxidase
<b>DNA</b>	do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i> - ácido desoxirribonucléico
<b>DRX</b>	Difração de Raios-X
<b>DSC</b>	do inglês <i>Differential Scanning Calorimeter</i> - Calorimetria diferencial de varredura
<b>FGFβ</b>	do inglês <i>Basic Fibroblast Growth Fator</i> - fator de crescimento básico de fibroblastos
<b>FTIR</b>	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
<b>h</b>	Hora
<b>InGaAIP</b>	índio, gálio, alumínio e fósforo
<b>J</b>	Joules
<b>J/cm<sup>2</sup></b>	Joule por centímetro ao quadrado
<b>LED</b>	do inglês <i>Light Emitting Diode</i> - Diodo emissor de luz
<b>LBI</b>	Laser de baixa intensidade
<b>L0</b>	Grupo não irradiado
<b>L1</b>	Grupo irradiado com 1 J/cm <sup>2</sup>
<b>L4</b>	Grupo irradiado com J/cm <sup>2</sup>
<b>MEC</b>	Matrix extracelular
<b>MEV</b>	Microscopia eletrônica de varredura
<b>mg/mL</b>	Miligrama por mililitro
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mW</b>	Miliwat
<b>NAD</b>	do inglês <i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i> - Dinucleótido de nicotinamida e adenina
<b>Nm</b>	Nanômetro
<b>NO</b>	do inglês nitric oxide – óxido nítrico
<b>O<sub>2</sub></b>	Gás oxigênio

<b>P</b>	Placa de cultivo
<b>PBS</b>	do inglês <i>phosphate-buffered saline</i> - solução salina tamponada com sais de fosfato
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>RNA</b>	do inglês ribonucleic acid - ácido ribonucleico
<b>ROS</b>	do inglês <i>reactive oxygen species</i> – espécies reativas de oxigênio
<b>µm</b>	Micrometro
<b>°C</b>	Grau Celsius

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO:.....	15
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 QUITOSANA.....	17
2.1.1 UTILIZAÇÃO DA QUITOSANA NA ENGENHARIA DE TECIDOS.....	19
2.1.2. UTILIZAÇÃO DA QUITOSANA NO REPARO DO TECIDO ÓSSEO.....	20
2.2 LASERTERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE.....	22
2.2.1 PROPRIEDADES METABÓLICAS DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE.....	23
3. OBJETIVOS.....	26
3.1 OBJETIVO GERAL.....	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
4. METODOLOGIA.....	27
4.1 PREPARAÇÃO DOS FILMES DE QUITOSANA.....	27
4.2 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA.....	27
4.2.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR REAL DE MASSA ( $W_R$ ).....	27
4.2.2 MASSA MOLAR VISCOSIMÉTRICA MÉDIA.....	28
4.2.3 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE DESACETILAÇÃO.....	28
4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE QUITOSANA.....	28
4.3.1 SUPERFÍCIE DA MEMBRANA.....	28
4.3.2 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX).....	29
4.3.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) .....	29
4.3.4 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC).....	29
4.3.5 ESTUDO DE INTUMESCIMENTO E PH DE SUPERFÍCIE.....	29
4.4 DESINFECÇÃO DOS FILMES.....	30
4.5 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS.....	30

4.6 IRRADIAÇÃO .....	31
4.7 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR .....	32
4.8 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR.....	32
4.9 ANÁLISE DA INTEGRAÇÃO CÉLULA-BIOMATERIAL .....	33
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
5. RESULTADOS.....	35
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA .....	35
5.2 PROLIFERAÇÃO CELULAR (ALAMAR BLUE) .....	38
5.3 VIABILIDADE (LIVE/DEAD).....	39
5.4 VIABILIDADE (ANEXINA/PI) .....	41
5.5 MORFOLOGIA CELULAR (MEV).....	42
6. DISCUSSÃO .....	43
7 CONCLUSÕES .....	49
REFERÊNCIAS .....	50

## 1. INTRODUÇÃO:

Nos últimos anos há uma crescente produção de conhecimento relacionado à aplicação de biomateriais para a produção de tecidos *in vitro*. A área da ciência que abrange todo esse saber é a engenharia de tecidos. Este é um campo interdisciplinar que aplica os princípios da engenharia e das ciências da vida ao desenvolvimento de substitutos biológicos que restauram, mantêm ou melhoram as funções do tecidos (LANGER; VACANTI, 2016). Sua função biológica apropriada pode ser alcançada quando existe uma interação adequada entre o arcabouço, as células e os fatores ambientais (TOLOUE et al., 2019). Para tal finalidade, são utilizados biomateriais naturais derivados da matriz extracelular (MEC), materiais sintéticos ou a combinação de ambos (SENGUPTA; WALDMAN; LI, 2014).

Um ramo da engenharia tecidual com grande destaque na atualidade é o relacionado à formação óssea, já que a regeneração do tecido ósseo é um importante desafio no campo da cirurgia ortopédica e craniofacial, e a reconstrução do tecido *in vitro* é uma estratégia que tem demonstrado potencial terapêutico para contornar a questão da perda óssea (FERNANDEZ-YAGUE et al., 2015).

A utilização de biomateriais na forma de arcabouços promove ambientes adequados à reconstrução de tecidos perdidos. Neste contexto, um biomaterial que vem ganhando grande destaque é a quitosana, um biopolímero derivado da quitina produzido por um processo de desacetilação, onde ocorre a perda de um grupamento acetil das subunidades deste polímero (ELIEH-ALI-KOMI; HAMBLIN, 2016). Esta conversão confere à quitosana inúmeras propriedades que são bastante apreciadas pela engenharia de tecidos. A quitosana apresenta biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade, atividades antibacterianas e antifúngicas, oferecendo também uma estrutura tridimensional similar à da matriz extracelular (MEC) natural, características estas que são muito importantes para a atividade proliferativa e viabilidade do cultivo celular (YOUNES; RINAUDO, 2015).

Outro ramo que tem se destaca por estar atuando sobre a atividade proliferativa é a laserterapia. O laser de baixa intensidade é uma técnica simples e não invasiva, altamente útil em diferentes ramos da medicina regenerativa, e pode ter efeitos benéficos em uma variedade de condições patológicas (MIGLIARIO et al., 2014) , incluindo cicatrização de feridas, redução do edema e dor de várias etiologias (EISSA; SALIH, 2017). Além disso, a laserterapia tem ganhado grande destaque em estudos

de proliferação celular, mostrando resultados significativos em ensaios “*in vivo*” e “*in vitro*” (BORZABADI-FARAHANI, 2016).

Apesar da literatura relatar resultados positivos a respeito do uso da quitosana visando o reparo do tecido ósseo (ELIEH-ALI-KOMI; HAMBLIN, 2016; ORYAN et al., 2014) e da aplicação da laserterapia com a mesma finalidade (BUCHIGNANI et al., 2019; ZEIN; SELTING; BENEDICENTI, 2017), não há estudos que avaliem o comportamento de células cultivadas sobre arcabouços de quitosana e posteriormente submetidas à irradiação com laser de baixa intensidade (LBI). Assim, sabendo do grande potencial que esse biomaterial e esse tratamento apresentam isoladamente para a engenharia de tecidos, o presente estudo tem por objetivo avaliar o efeito da laserterapia em células pré-osteoblásticas cultivadas sobre membranas produzidas com quitosana.

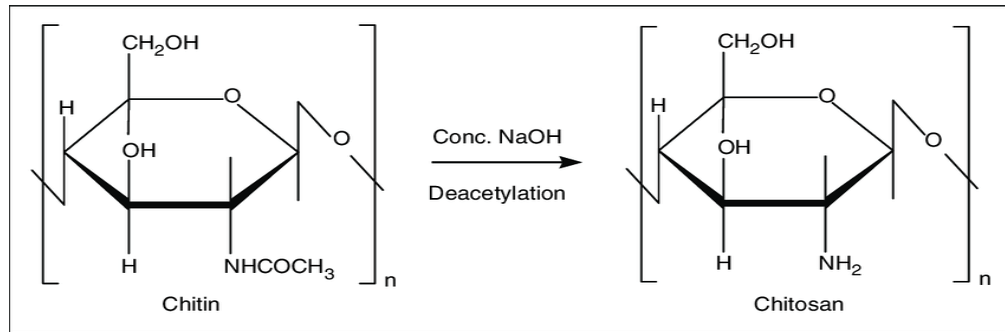
## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 QUITOSANA

A Quitosana é um biopolímero derivado da quitina, produzida a partir da desacetilação desta, se apresenta como o segundo polissacarídeo mais abundante do planeta, perdendo apenas para a celulose (YOUNES; RINAUDO, 2015). A quitina é largamente encontrada na natureza como componente estrutural do exoesqueleto de artrópodes (incluindo crustáceos e insetos), paredes celulares de alguns fungos e algas, podendo ser extraída por processos químicos ou enzimáticos (OPRENYESZK et al., 2015; YAN et al., 2018; YOUNES; RINAUDO, 2015).

A quitina foi isolada pela primeira vez em 1811 por H. Brancota. Já a sua conversão em quitosana, foi descrita por Rouget em 1859 pelo aquecimento da quitina em solução concentrada de hidróxido de potássio, resultando na sua desacetilação (GOSK; MARTYNKIEWICZ; STEPNIEWSKI, 2017). A conversão de quitina em quitosana é geralmente alcançada pelo tratamento com solução concentrada de hidróxido de sódio (40-50%) a 100 °C ou temperatura superior para remover alguns ou todos os grupos acetil da quitina (KUMARI; RATH, 2014). Ambas as moléculas podem ser diferenciadas pela quantidade de unidades básicas de acetilação de D-glucosamina. Quitina contém mais de 70% de unidades acetiladas, enquanto quitosana tem menos de 30% de acetilação (LIAQAT; ELTEM, 2018).

A quitosana é um copolímero que consiste em unidades monoméricas de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-desoxi-D-glicopiranoose e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glicopiranoose (AHMED; IKRAM, 2016). Esse polissacarídeo possui uma estrutura molecular quimicamente similar à fibra vegetal celulose, diferenciando-se somente nos grupos funcionais, enquanto a celulose apresenta um grupo hidroxila (OH) no carbono 2, a quitosana apresenta um grupo amino (NH<sub>2</sub>) neste mesmo carbono (Figura 1) (KUMAR, 2000).



**Figura 1:** Estrutura química da quitina e quitosana. Adaptado de Dutta, Tripathi e Dutta (2012). A figura mostra a estrutura química da quitina, que apresenta o grupo acetil no carbono 2, e a quitosana sem o grupo acetil no carbono 2.

Na forma de quitina este polímero apresenta baixa solubilidade em meios aquosos, o que torna muito difícil a sua utilização na área biomédica (KUMAR, 2000). Já a quitosana apresenta solubilidade em meios com ácidos fracos, como ácido acético e ácido fórmico (CUI et al., 2018). Além disso, a quitosana é capaz de formar complexos eletrostáticos com macromoléculas de carga oposta, já que ela apresenta forte carga elétrica positiva (PERIAYAH et al., 2016; YOUNES; RINAUDO, 2015). E isso se deve a presença de grupos hidroxila primários e secundários em cada unidade de repetição, e o grupo amina em cada unidade desacetilada (ISLAM; RAHMAN BHUIYAN; ISLAM, 2017). Sua natureza catiônica é bastante especial, uma vez que a maioria dos polissacarídeos são geralmente neutra ou negativa em ambiente ácido. Esta propriedade permite à quitosana formar complexos eletrostáticos ou estruturas em multicamadas com outros polímeros sintéticos ou naturais carregados negativamente (CHEUNG et al., 2015). Sendo assim, esta característica permite a interação com moléculas como, proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos, já que estas apresentam grupos com eletronegatividade.

A quitosana apresenta um potencial multidimensional de aplicações, passando desde da utilização na área alimentícia como em nutrição, na biotecnologia, ciência dos materiais, drogas e produtos farmacêuticos, agricultura e proteção ambiental (RAVI KUMAR, 2000). Esta potencialidade de utilização em diversas áreas deve-se especialmente às suas propriedades de biodegradabilidade, não toxicidade, efeito antibacteriano e biocompatibilidade (AHMED; IKRAM, 2016), além de apresentarem propriedades físicas adequadas, como alta área de superfície, porosidade, resistência a tração e condutibilidade (CHEUNG et al., 2015). Tais propriedades estão relacionadas ao peso molecular, grau de desacetilação e solubilidade deste polímero (YOUNES; RINAUDO, 2015). Em conjunto, estas características explicam o grande

destaque que a quitosana vem apresentando em várias áreas das ciências biomédicas, em especial a engenharia de tecidos.

A quitosana apresenta inúmeras formas de utilidades, oferecendo a vantagem de ser facilmente processada em géis, membranas, nanofibras, nanofibrilas, micropartículas, nanopartículas, *scaffolds* e formas esponjosas (AHMED; IKRAM, 2016) e estas aplicações são dependentes do grau de desacetilação e peso molecular (CHEUNG et al., 2015). Sua utilização está intimamente relacionada a várias atividades farmacológicas como as antibacterianas, antifúngicas, antitumorais e antioxidantes (CHEUNG et al., 2015).

### 2.1.1 UTILIZAÇÃO DA QUITOSANA NA ENGENHARIA DE TECIDOS

A engenharia de tecidos consiste em uma abordagem multidisciplinar da ciência, incluindo princípios fundamentais da engenharia de materiais e biologia molecular e celular em esforços para desenvolver substitutos biológicos para tecidos e órgãos lesados (KIM et al., 2008). Este ramo da ciência é baseado na utilização celular, construção de arcabouços e vias bioquímicas ou físico-químicas (ROY et al., 2018).

Neste campo de atuação a quitosana tem se destacado como um constituinte de arcabouços, apresentando um microambiente que propicia a proliferação, diferenciação, migração e adesão celular (KIM et al., 2008). Isso se deve principalmente as propriedades físico-químicas que a tornam um excelente biomaterial para a engenharia de tecidos (ELIEH-ALI-KOMI; HAMBLIN, 2016).

Vários estudos tem demonstrado a vasta utilização da quitosana neste campo, tendo grande destaque na formação de tecidos ósseos, podendo ter potencial na fabricação de enxertos desse tecido para a substituição de partes perdidas dos tecidos (GEORGOPOULOU et al., 2018a). O uso desse biomaterial parece ser amplificado quando este está ligado a outros materiais, pois estas interações podem promover o melhoramento de suas características farmacológicas (GOSK; MARTYNKIEWICZ; STEPNIEWSKI, 2017).

Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que arcabouços à base de quitosana/ácido glicólico/nanohidroxiapatita apresentaram-se adequados para a adesão, proliferação e diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais do cordão umbilical (WANG et al., 2014). Pesquisas mais recentes demonstraram que os arcabouços à

base de quitosana suportam a formação da matriz extracelular, enquanto os fibroblastos que cercam o arcabouço poroso produzem colágeno com mínima reação inflamatória, sugerindo que o uso de quitosana pode trazer muitos benefícios quando utilizada na engenharia de tecidos (GEORGOPOULOU et al., 2018).

Cai et al. (2017) demonstraram que o arcabouço de quitosana é biocompatível com a liberação de fatores de crescimento, como fatores de crescimento de transformação beta (TGF $\beta$ 1) e fatores de crescimento fibroblástico beta (FGF $\beta$ ), que atuam na regulação da proliferação de células endoteliais e fibroblastos. Chung et al. (2002) descreveram o crescimento de células endoteliais humanas cultivadas sobre membranas de quitosana combinada com peptídeos adesivos celulares. Nesse trabalho, a quitosana contendo os peptídeos apresentou melhor suporte para a proliferação de células endoteliais humanas.

O estudo de Yang et al. (2015) mostrou que o composto de fosfato tricálcico/quitosana apresentou histocompatibilidade com células-tronco mesenquimais e não exerceu efeito sobre o crescimento celular e a proliferação, porém apresentou eficácia na melhoria da osteogênese, vascularização e reparação de defeitos ósseos. Assim, a engenharia de tecidos vem se utilizando de forma crescente das propriedades fornecidas pela quitosana, principalmente na confecção de arcabouços, visto que esta forma de utilização tem se mostrado muito vantajosa devido às características desse material, pois a torna similar à matriz extracelular natural.

#### 2.1.2. UTILIZAÇÃO DA QUITOSANA NO REPARO DO TECIDO ÓSSEO

Ossos são órgãos do sistema esquelético, que promovem a forma, suporte mecânico e proteção do corpo, além de auxiliarem no movimento (MAROT; KNEZEVIC; NOVAKOVIC, 2010). Lesões por fraturas e doenças degenerativas trazem muitos prejuízos a esse tecido, atuando na sua perda e dificultando o seu reparo. Contudo, esse problema pode ser superado através de técnicas que utilizam enxertos para acelerar o processo de reparo desse tecido (FILLINGHAM; JACOBS, 2016).

O enxerto ósseo tem sido empregado há muitos anos por cirurgiões ortopédicos para auxiliar no processo de reparo ósseo e é usado em todas as subespecialidades dentro da ortopedia (FILLINGHAM; JACOBS, 2016), pois atua estimulando a

formação de novo tecido ósseo (POLO-CORRALES; LATORRE-ESTEVEES; RAMIREZ-VICK, 2014). O enxerto ósseo é definido como um material implantado que promove o reparo ósseo, sendo utilizado de forma isolada ou combinado com outro material, apresentando como principais características a osteogênese, osteoindução, osteocondução e osteointegração (ORYAN et al., 2014).

Os enxertos podem ser classificados em três formas: autógeno, alógeno e xenógeno. O autógeno é removido do próprio paciente, o alógeno é obtido de outro indivíduo e o xenógeno é derivado de outras espécies de vertebrados (DEEV et al., 2015). Porém, a utilização desses enxertos podem trazer várias dificuldades para o reparo do tecido, principalmente problemas relacionado ao sistema imunológico, como a imunossupressão (POLO-CORRALES; LATORRE-ESTEVEES; RAMIREZ-VICK, 2014).

Para minimizar esses problemas, a engenharia de tecidos está tirando proveito das propriedades farmacológicas dos biomateriais. Atualmente a utilização de biomateriais na produção de enxertos ósseos tem ganhado destaque, principalmente os constituídos à base de quitosana, que como já mencionado anteriormente, apresenta várias características que torna esse biopolímero um ótimo material para esse tipo de arcabouço (LU et al., 2016).

Gosk, Martynkiewicz e Stępniewski (2017) relatam em seus estudos com osteoblastos que a quitosana isolada não atende a todos os requisitos do enxerto ideal, mas quando adicionado a outros compostos pode apresentar propriedades semelhantes ao osso. Mencionam também que em implantes ósseos, o composto hidroxiapatita quando combinado com a quitosana, apresentam ótimas qualidades mecânicas, boa osteocondução, osteoindutividade e estimulação da osteogênese.

O complexo de hidrogel composto de quitosana/ácido glutâmico apresentou formação precoce de novos ossos na cavidade alveolar após a extração dentária (CHANG et al., 2014). Zhou et al (2017) mostrou em estudos *in vitro*, que a membrana de whitlockite/quitosana apresentou biocompatibilidade, não apenas promovendo a proliferação de células-tronco mesenquimais de ossos humanos (hBMSCs), mas também melhorando a osteoindutividade. Pesquisas recentes realizadas por Georgopoulou et al (2018a) demonstraram que arcabouços confeccionados por quitosana/policaprolactona promovem a viabilidade, proliferação e diferenciação osteogênica de células pré-osteoblastos *in vitro*, mostrando que a quitosana tem se apresentado como um ótimo material para o reparo do tecido ósseo.

Assim, devido as propriedades de não toxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade que já são conhecidas da quitosana, quando combinada com outros materiais, apresenta as características que são necessárias para a utilização na regeneração do tecido ósseo. Torna-se evidente que sua utilização pode trazer vários benefícios para a engenharia de tecidos ligada a esse tecido.

## 2.2 LASERTERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE

A sigla LASER tem origem na língua inglesa representa um acrônimo de *“light amplification by stimulated emission of radiation”*. A palavra laser é consagrada pelo uso e define fonte de luz monocromática, intensa, coerente e colimada, cuja emissão de radiação se faz pelo estímulo de campo externo, com aplicações variadas e crescentes na indústria, na engenharia e na medicina (INOE; ZAFANELLI; ROSSATO, 2008).

As propriedades do laser vêm sendo estudadas desde que o físico alemão Albert Einstein em 1917 expôs os princípios físicos da emissão estimulada, sobre os quais está apoiado o laser (CATÃO, 2004). Sua utilização foi sugerida pela primeira vez em 1958, por dois cientistas americanos, Charles Townes e Arthur Achawlow, tornando-se realidade em 1960 com a construção do primeiro emissor de laser a Rubi por Theodore Maiman (PROCKT; TAKAHASHI; PAGNONCELLI, 2008)

Nos últimos anos, o uso de novos equipamentos relacionados a técnicas que atuam na proliferação de células vêm aumentando. Um exemplo é o uso do laser de baixa intensidade (LBI), que vem se destacando em estudos advindos da área biomédica. Essa terapia envolve a aplicação de luz, seja uma luz de laser com um comprimento de onda específico ou um diodo emissor de luz (LED), que tem como características estimular processos em nível celular (PERCIVAL; FRANCOLINI; DONELLI, 2015).

O laser é um dispositivo composto por substâncias denominadas de meio ativo (gás, sólidos e líquidos), que quando excitadas por uma fonte de energia geram luz (LINS et al., 2010). Assim, definimos a luz laser como sendo ondas eletromagnéticas não ionizantes com características especiais (CATÃO, 2004).

A terapia com a luz laser em baixa intensidade deve seguir parâmetros específicos como potência, comprimento de onda, taxa de pulso e dose (LIN et al., 2010). Em relação aos tipos de lasers utilizados nas terapias biomédicas, a literatura

aponta o Hélio-Neônio, Rubi e o Arseneto de Gálio e Alumínio como os principais utilizados em uma variedade de tratamentos (FREITAS; HAMBLIN, 2016).

Variações nos parâmetros do laser podem promover a modulação do metabolismo da célula, podendo acelerá-los ou retardá-los. O efeito cumulativo de baixas doses (2,5 ou 5J/cm<sup>2</sup>) determina um efeito estimulador enquanto múltiplas exposições a altas doses (10 e 16J/cm<sup>2</sup>) resultam em um efeito inibidor e são caracterizadas por uma diminuição na viabilidade e proliferação celular com uma quantidade significativa de danos à membrana celular e ao DNA (KARU, 1988).

O laser de baixa intensidade é definido de acordo com o comprimento de onda utilizado, sendo determinado por dois espectros de ondas diferentes, onde a eficácia do espectro de ação do laser vermelho ou visível apresenta comprimento de onda que varia de 630 a 670 nm, enquanto o infravermelho ou invisível compreende comprimentos de onda próximo a 780 - 830 nm (BENSADOUN; NAIR, 2015)

#### 2.2.1 PROPRIEDADES METABÓLICAS DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE

Quando a luz de baixa intensidade é usada, não há efeitos térmicos, a energia dos fótons absorvida não é transformada em calor, mas em efeitos fotoquímicos, fotofísicos e fotobiológicos (ROCHA JÚNIOR et al., 2007) . A luz é absorvida pela Citocromo-c oxidase (COX), uma enzima terminal da cadeia transportadora de elétrons que atua transferindo elétrons para o oxigênio, desempenhando assim um papel vital na bioenergética das células (FREITAS; HAMBLIN, 2016; SRINIVASAN; AVADHANI, 2012).

A luz absorvida pela COX causa a oxidação da dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD), aumentando o potencial de membrana mitocondrial (MMP) e os níveis de adenosina trifosfato (ATP), adenosina monofosfato cíclico (cAMP) e espécies reativas de oxigênio (ROS), levando a mudanças no status redox tanto da mitocôndria como do citoplasma (FREITAS; HAMBLIN, 2016).

Isso afeta a permeabilidade da membrana e a atividade da ATPase que, por sua vez, modula o fluxo de Ca<sup>2+</sup>. O aumento do Ca<sup>2+</sup> intracelular estimula o DNA, a síntese de RNA e a proliferação celular (BURST et al., 2014; KARU, 1988). Freitas (2016) também menciona que mudanças na ultraestrutura da mitocôndria pode levar a alterações na concentração de Ca<sup>2+</sup>, e que a laserterapia pode induzir a abertura dos canais de Ca<sup>2+</sup>.

Os efeitos dos lasers de baixa intensidade ocorrem no nível celular e podem estimular ou inibir as atividades proliferativas, bioquímicas e fisiológicas, alterando a comunicação intercelular (NOBA et al., 2017). Neste sentido, destacam-se atividade anti-inflamatória, analgésica e regenerativos (PERCIVAL; FRANCOLINI; DONELLI, 2015).

Para Henriques, Cazal e Castro (2010) quando a laserterapia é usada no espectro eletromagnético visível, existe uma fotobioestimulação inicial na mitocôndria, a qual ativa uma cadeia de eventos biológicos. Quando a irradiação é no espectro infravermelho, há estímulo dos canais da membrana plasmática, resultando em mudanças na permeabilidade da membrana, temperatura e gradiente de pressão.

Estudos mostram que a atividade da COX é inibida pelo óxido nítrico (NO), esta inibição pode ser explicada por uma competição direta entre o NO e o O<sub>2</sub>, pois ambos apresentam o mesmo centro de ligação na COX. Assim, irradiações com laser pode reverter essa inibição pela fotodissociação do NO de seus locais de ligação, o que aumentaria a taxa de respiração e conseqüentemente a de ATP (FARIVAR; MALEKSHAHABI; SHIARI, 2014).

Para Renno et al (2007) e Karu (1987) a absorção da luz do LBI pelas mitocôndrias resulta num aumento da produção de oxigênio molecular e ATP, o qual estimula a atividade do DNA e RNA para síntese de proteínas reguladoras do ciclo celular e assim a velocidade de mitose pode ser aumentada

O laser parece produzir uma mudança no potencial redox total da célula na direção de maior oxidação e aumento da geração de ROS e atividade redox das células. O estado redox de uma célula regula as vias de sinalização celular que controlam a expressão gênica, o aumento do ROS inibi a ativação de fatores que estão relacionados a síntese de ácidos nucléicos, síntese de proteínas, ativação enzimática e progressão do ciclo celular, enquanto a sua diminuição aumenta a ativação desses fatores (FARIVAR; MALEKSHAHABI; SHIARI, 2014; FREITAS; HAMBLIN, 2016).

Após a fotorrecepção, existe transdução e amplificação de sinais, tendo como resposta subsequente proliferação, diferenciação ou síntese de proteínas, incluindo fatores de crescimento celular que aumentam ainda mais o processo proliferativo (HAWKINS-EVANS; ABRAHAMSE, 2008).

Assim, a LBI é uma terapia com enorme destaque na proliferação celular, já que sua ação atua sobre o metabolismo celular, especialmente no metabolismo mitocondrial, resultando na produção de compostos que possivelmente estão

relacionados a regulação dos mecanismos que levam aos processos proliferativos. Destacando-se ainda, a importância da utilização dos parâmetros adequados do LBI para efetividade dos processos proliferativos, com adequado estado funcional celular.

Dessa forma, pode-se hipotetizar que a utilização do LBI em células cultivadas sobre arcabouços de quitosana pode promover grandes avanços para a engenharia de tecidos, já que o uso isolado destes dois fatores (laserterapia e quitosana) têm mostrado resultados positivos na terapia dos distúrbios que acometem o tecido ósseo. Como não há dados na literatura avaliando esta associação, fica evidente a justificativa deste trabalho experimental *in vitro*.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da laserterapia em células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 cultivadas sobre arcabouços de quitosana.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização físico-química das membranas de quitosana produzidas para uso no modelo estudado;
- Analisar os efeitos da laserterapia em duas doses diferentes ( $1 \text{ J/cm}^2$  e  $4 \text{ J/cm}^2$ ) na proliferação de células pré-osteoblásticas cultivadas sobre arcabouço de quitosana;
- Verificar a viabilidade das células MC3T3-E1 cultivados sobre arcabouço de quitosana e submetidas ou não à irradiação com laser de baixa intensidade;
- Avaliar a morfologia celular e a integração células-biomaterial nas diferentes condições experimentais.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 PREPARAÇÃO DOS FILMES DE QUITOSANA

Para a preparação das membranas de quitosana foi utilizada a metodologia descrita por Campos, Mei e Santos Jr. (2015), com algumas modificações. Na preparação 2 g de Quitosana (Polymar, Brasil) foi dissolvida em 100 ml de solvente a 2,0% (p/p) de ácido acético (Dinâmica, Brasil) por 24h. Em seguida, foi adicionado D-sorbitol (Sigma, USA), componente plastificante, na concentração de 0,2g/20mL de solução de quitosana com agitação durante 2h. Posteriormente, um volume de 30 mL foi distribuído em placas de Petri de 90 mm de diâmetro e secas em estufa a 40° C até a formação de uma película. Para a neutralização foi empregado hidróxido de sódio a 2% (m/v) por 30 minutos e lavadas em água ultrapura até pH neutro, estiradas e secas a temperatura ambiente.

Uma alíquota da quitosana em pó e amostras aleatórias (n=6) dos filmes produzidos foram avaliados no Laboratório de Caracterização Estrutural de Materiais do Departamento de Engenharia de Materiais e no Laboratório de Tecnologia e Biotecnologia Farmacêutica-TECBIOFAR, ambos na Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, Brasil, visando sua caracterização físico-química.

### 4.2 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA

#### 4.2.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR REAL DE MASSA ( $W_R$ )

O  $W_R$  foi calculado através de um analisador de umidade por infravermelho, modelo TOP RAY, marca Bel Engineering (Monza, Italy), com resolução 0,01% e precisão de 0,001g. Pesou-se aproximadamente 1 g da amostra de quitosana ( $m_T$ ) sobre o prato de pesagem de alumínio. O equipamento foi programado para uma temperatura de 110 °C e com desligamento automático até atingir uma massa de peso constante ( $m_C$ ), foi realizado em triplicata. O teor real de massa foi calculado pela equação a seguir (SANTOS et al., 2009).

$$W_R = 100. m_C/m_T$$

#### 4.2.2 MASSA MOLAR VISCOSIMÉTRICA MÉDIA

A determinação da massa molar viscosimétrica média ( $M_v$ ) da quitosana foi realizada por viscosimetria, que consiste no tempo de escoamento de uma solução de quitosana através de um viscosímetro Cannon-Fenske Routine, modelo CFRC-100, em um ambiente com temperatura controlada em  $25 \pm 0,1$  °C, realizado em sextuplicata. Após determinar a viscosidade intrínseca ( $\eta$ ), utilizando a equação empírica de Mark-Houwink-Sakurada, foi possível relacionar a viscosidade intrínseca à massa molecular do polímero, conforme a Equação (NASCIMENTO et al., 2017).

$$[\eta] = kM_v^a$$

onde: K e a = constantes para um determinado polímero-solvente a uma determinada temperatura.

#### 4.2.3 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE DESACETILAÇÃO

O grau de desacetilação foi realizado pelo método condutivimétrico, que consiste na determinação dos grupamentos amínicos protonados presentes na amostra de quitosana. As medições de condutância durante a titulação foram aferidas por um condutivímetro GEHAKA, modelo CG 2000 (São Paulo, SP, Brazil). Todo o experimento foi realizado em quadruplicata utilizando como solvente a água Milli-Q (NASCIMENTO et al., 2017).

### 4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE QUITOSANA

#### 4.3.1 SUPERFÍCIE DA MEMBRANA

A rugosidade da superfície da membrana foi visualizada pela microscopia de força atômica (MFA), analisada através do SPM 9700, Shimadzu (Kyoto, Japan). A análise foi operada de forma dinâmica, com uma área de varredura de  $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ , com uma frequência de ressonância de 70 kHz e força constante de 1 a 5 N/m (VUDDANDA et al., 2017).

#### 4.3.2 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)

No estudo da cristalinidade do material foi realizado a difração de raios X através do XRD 7000, Shimadzu (Kyoto, Japan), com passo angular de  $0,02^\circ$ , velocidade de varredura de 2 grau/minuto, corrente de 30 mA, voltagem de 40 kV, sendo registrado em  $2\theta$  com variação angular de 5 a  $40^\circ$  (VUDDANDA et al., 2017).

#### 4.3.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A amostra da membrana foi analisada pela espectrofotometria de infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) utilizando a técnica de Reflexão Total Atenuada (ATR), modelo IRPrestige-21 (Shimadzu, Kyoto, Japan), na região espectral mediana (MIR) e na faixa de 700 a  $4000\text{ cm}^{-1}$ , com 20 varreduras e resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$  (MARTINS et al., 2018).

#### 4.3.4 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)

A análise calorimétrica (DSC) foi feita num analisador da Shimadzu, modelo DSC-60 (Kyoto, Japan). Fragmentos da membrana foram colocados em um cadinho de alumínio com um peso de 4 mg em seguida fechado hermeticamente, operando com uma taxa de aquecimento de  $10\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , de 30 a  $400\text{ }^\circ\text{C}$ , com fluxo de  $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  com purga de nitrogênio (MARTINS et al., 2018).

#### 4.3.5 ESTUDO DE INTUMESCIMENTO E PH DE SUPERFÍCIE

Primeiramente foi determinado a variação do peso da amostra através de uma balança de precisão ( $0,001\text{ g}$ ) da Shimadzu (Kyoto, Japan), utilizando fragmentos do filme milimetricamente cortados ( $18 \times 18\text{ mm}$ ). Este ensaio foi feito em sextuplicata. Em seguida, estas tiras de filme foram utilizadas para realizar o estudo de intumescimento, na qual as amostras foram imersas em PBS (pH 6,8) à temperatura  $25\text{ }^\circ\text{C}$ . Os pesos das amostras foram determinados a 0,5, 1, 2, 5, 7, 25 horas após a secagem cuidadosa das membranas em papel de filtro para remoção da solução adsorvida na superfície, em seguida aferida seus pesos em uma balança de precisão

(SALDANHA et al., 2006). O percentual de intumescimento foi determinado pela equação:

$$\% \text{intumescimento} = [(W_t - W_o)/W_o] \times 100$$

Onde:  $W_t$  é o peso da amostra úmida no tempo  $t$ , e o  $W_o$  é o peso da amostra seca.

A determinação do pH de superfície foi realizada pelo eletrodo do equipamento Skin-pH-Meter, de marca COURAGE+ KHAZAKA (Koln, Germany) na tira da membrana (18 x 18 mm) e em seguida imersa em um placa de petri contendo PBS por 1 minuto. Após a secagem superficial da membrana no papel de filtro foi feita a leitura (triplicata) (GAJDOŠOVÁ et al., 2016).

#### 4.4 DESINFECÇÃO DOS FILMES

Antes do cultivo, as membranas foram lavadas (3 lavagens de 2 minutos cada) em tampão fosfato salino (PBS) para remoção dos resquícios de substâncias químicas residuais e submetidos ao protocolo de desinfecção desenvolvido no nosso grupo de pesquisa: irradiação por luz ultravioleta por 30 minutos sob fluxo laminar e lavagens por imersão (3 x 5 min) em solução com 4% de antibióticos (400 IU/mL de penicilina, 400 mg/mL de estreptomicina e 1 µg/ml de anfotericina B; todos da Gibco, USA). Em seguida, as membranas foram lavadas em PBS para remoção do antibiótico residual e distribuídos em placas de cultivo de 6, 24 e 96 poços (amostras de 6.4, 1.0 e 0.6 mm de diâmetro, respectivamente) e então imersos por 12h em meio  $\alpha$ -MEM suplementado com 1% de antibióticos-antimicóticos (100 IU/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina e 0.25 µg/ml de anfotericina B; todos da Gibco, USA), a 37° C com 5% CO<sub>2</sub>.

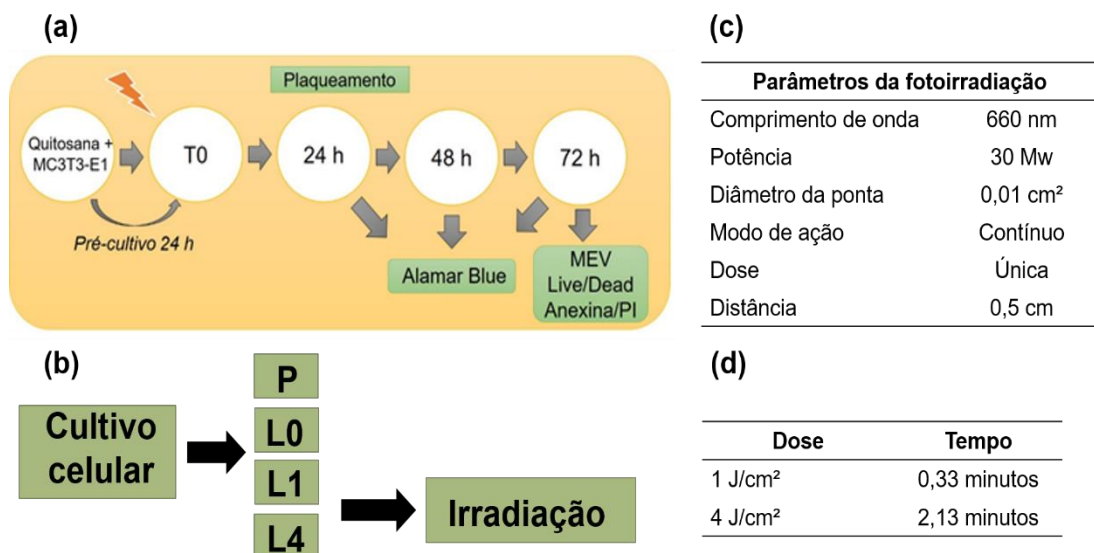
#### 4.5 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS

As células MC3T3-E1 consistem de uma linhagem comercial de pré-osteoblastos isolados de calvária de camundongo, que foram previamente obtidas do American Type Culture Collection (ATTC, USA) e mantidas em criopreservação para uso neste projeto. No experimento, as células foram cultivadas em meio  $\alpha$ MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de antibióticos (todos da Gibco, USA).

## 4.6 IRRADIAÇÃO

As células foram cultivadas por 24h sobre os filmes de quitosana para garantir a adesão celular, e então, divididas em três Grupos: (L0) controle não irradiado; (L1) irradiado com dose de 1 J/cm<sup>2</sup>; e (L4) irradiadas com dose de 4 J/cm<sup>2</sup>. Células cultivadas diretamente sobre a superfícies de poliestireno das placas de cultivo formaram um quarto grupo (P) (Fig. 2-a), como controle interno da proliferação celular durante o experimento.

As irradiações foram realizadas com laser diodo InGaAlP (Kondortech, Brasil), com comprimento de onda de 660 nm, potência de 30 Mw, diâmetro da ponta de 0.01 cm<sup>2</sup> e modo de ação contínuo, em dose única. Para isso, a ponteira do laser foi posicionada de modo perpendicular à placa, a 0,5 cm de distância dos filmes contendo as células na superfície, com tempos de irradiação determinados automaticamente pelo aparelho (33 segundos para a dose de 1 J/cm<sup>2</sup> e 2 minutos e 13 segundos para a dose de 4 J/cm<sup>2</sup>) (Fig. 2-c; d). Todos os ensaios foram conduzidos em quadruplicata (n=4).



**Figura 2:** (a) Desenho experimental do cultivo, irradiação e parâmetros utilizados no ensaio. Etapa de cultivo, irradiação e os ensaios realizados no experimento; (b) divisão dos grupos testados no experimento - P: Superfícies de poliestireno das placas de cultivo; L0: Controle não irradiado; L1: Controle com dose de 1 J/cm<sup>2</sup>; L4: controle irradiado com dose de 4 J/cm<sup>2</sup>; (c) parâmetros utilizados na irradiação; (d) doses e os tempos empregados na irradiação.

#### 4.7 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

A proliferação celular foi avaliada nos intervalos de 24, 48 e 72 horas após a irradiação (Fig. 2-a), através de ensaio do Alamar Blue (Invitrogen, USA), que consiste em um método colorimétrico que permite a detecção da atividade metabólica das células a partir da redução da resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido), um corante azul fracamente fluorescente, em resorufina, um corante rosa com altíssima fluorescência em vermelho. As células foram cultivadas em placas de 96 poços, na densidade de  $5 \times 10^3$  células por poço. Em cada intervalo do experimento o meio foi removido e as células foram cultivadas com 10  $\mu$ L de Alamar Blue (Invitrogen, USA) e 90  $\mu$ L de meio  $\alpha$ MEM sob condições normais de cultivo. Após quatro horas, os filmes foram removidos e a absorbância das soluções foram medidas em leitor de microplaca (Epoch, USA) a 570 nm (forma reduzida) e 600 nm (forma oxidada) e a redução do Alamar Blue foi então calculada a partir da equação fornecida pelo fabricante.

#### 4.8 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi avaliada utilizando-se o ensaio Live/Dead (*Live-Dead Assay Cytotoxicity Kit for mammalian cells*, Molecular Probes, USA). Para tanto, as células foram cultivadas sobre as membranas de quitosana em placas de 24 poços, na densidade de  $5 \times 10^4$  células por poço. No intervalo de 72h, os poços foram incubados com 2  $\mu$ M de calceína AM (que cora em verde o citoplasma de células vivas) e 4  $\mu$ M de homodímero de etídio (que cora em vermelho o núcleo de células mortas), por 20 minutos, em ambiente protegido da luz. As amostras foram avaliadas em microscópio de fluorescência (Zeiss Imager A2, Alemanha) e foram obtidas fotomicrografias do campo central de cada amostra (n=4) para análise descritiva de células vivas e mortas.

Para análise dos efeitos do laser de baixa intensidade utilizado sobre a morte celular foi utilizado o *FITC Annexin V/ Dead Cell Apoptosis Kit with FITC Annexin and PI, for Flow Cytometry* (Invitrogen, USA). O marcador anexina V-FITC permite detectar os estágios iniciais de apoptose celular devido ao fato de se ligar preferencialmente aos fosfolipídios negativamente carregados (fosfatidilserina) expostos no início do processo apoptótico, enquanto o iodeto de propídeo (PI) permite avaliar os momentos

finais deste processo de morte celular, por ser um marcador que interage com o DNA, mas não é capaz de atravessar a membrana plasmática, devido ao seu alto peso molecular. Assim, a marcação positiva para o PI indica que há poros na membrana, fenômeno característico de processos de necrose ou estágio final de apoptose. Para tanto, as células foram cultivadas sobre as membranas de quitosana em placas de 6 poços, na densidade de  $1 \times 10^5$  células por poço. Decorridas 72 h de cultivo, as células foram tripsinizadas, coletadas e lavadas com tampão PBS gelado. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 200  $\mu$ L de *Binding Buffer* 1X. Foi adicionado 3  $\mu$ L de *Annexin V-FITC* e 1  $\mu$ L da solução de PI a 100  $\mu$ g/mL. As células foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente e mantidas sob proteção de luz. Após o período de incubação, foram adicionados 400  $\mu$ L de tampão de ligação para anexina V 1X e as células foram analisadas em citômetro de fluxo FASCCanto II (BD Biosciences, USA), medindo a emissão de fluorescência a 530 nm e 575 nm.

#### 4.9 ANÁLISE DA INTEGRAÇÃO CÉLULA-BIOMATERIAL

A disposição das células sobre os arcabouços foi avaliada no intervalo de 72h por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para tanto, os arcabouços foram lavados duas vezes com PBS para remover as células não aderidas, e, subsequentemente, fixados em glutaraldeído a 2,5% tamponado com fosfato a 48°C durante 12h. Em seguida, as amostras foram submetidas a processamento por ponto crítico, revestidas com ouro pela técnica do *sputtering* e analisadas em microscópio eletrônico de varredura Hitachi TM300 (Hitachi, Japan). Foram obtidas eletromicrografias com magnificação variando de 100 a 1000x, para avaliação descritiva da interrelação célula-biomaterial, especialmente o padrão de distribuição das células na superfície dos arcabouços e o padrão geral de morfologia celular.

#### 4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados quantitativos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, utilizando-se o software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, USA). Como os dados não demonstraram distribuição gaussiana, foram submetidos à análise não paramétrica. A diferença entre os grupos para cada um dos intervalos de tempo

estudados foi analisada pelos testes estatísticos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, considerando-se um nível de significância de 5% ( $p < 0.05$ ).

## 5. RESULTADOS

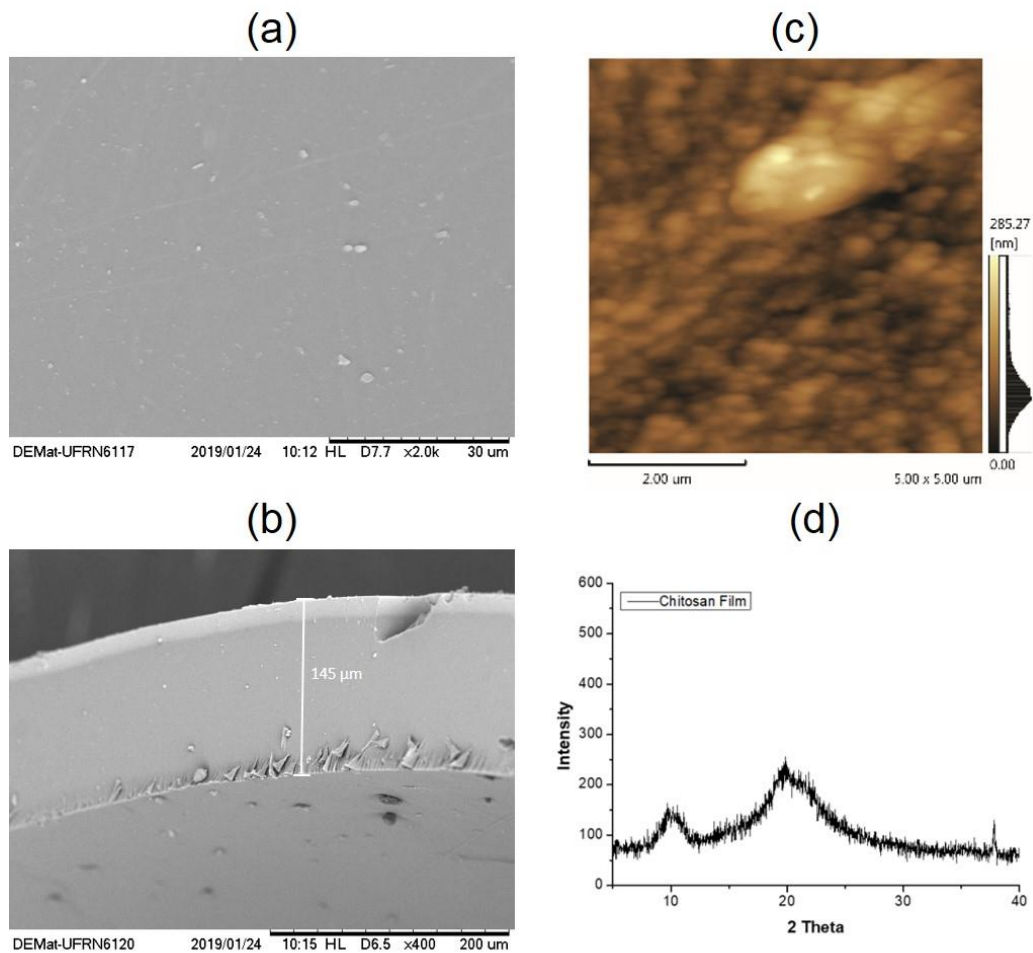
### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA

A análise da caracterização da quitosana (Tabela 1) mostrou um percentual de massa de 88,02%, a massa molecular viscosimétrica exibiu o valor de  $3,99 \times 10^5$  g.mol<sup>-1</sup>, o grau de desacetilação com de valor de 91,37% ( $\pm 3,77\%$ ).

**Tabela 1:** Caracterização da quitosana em pó.

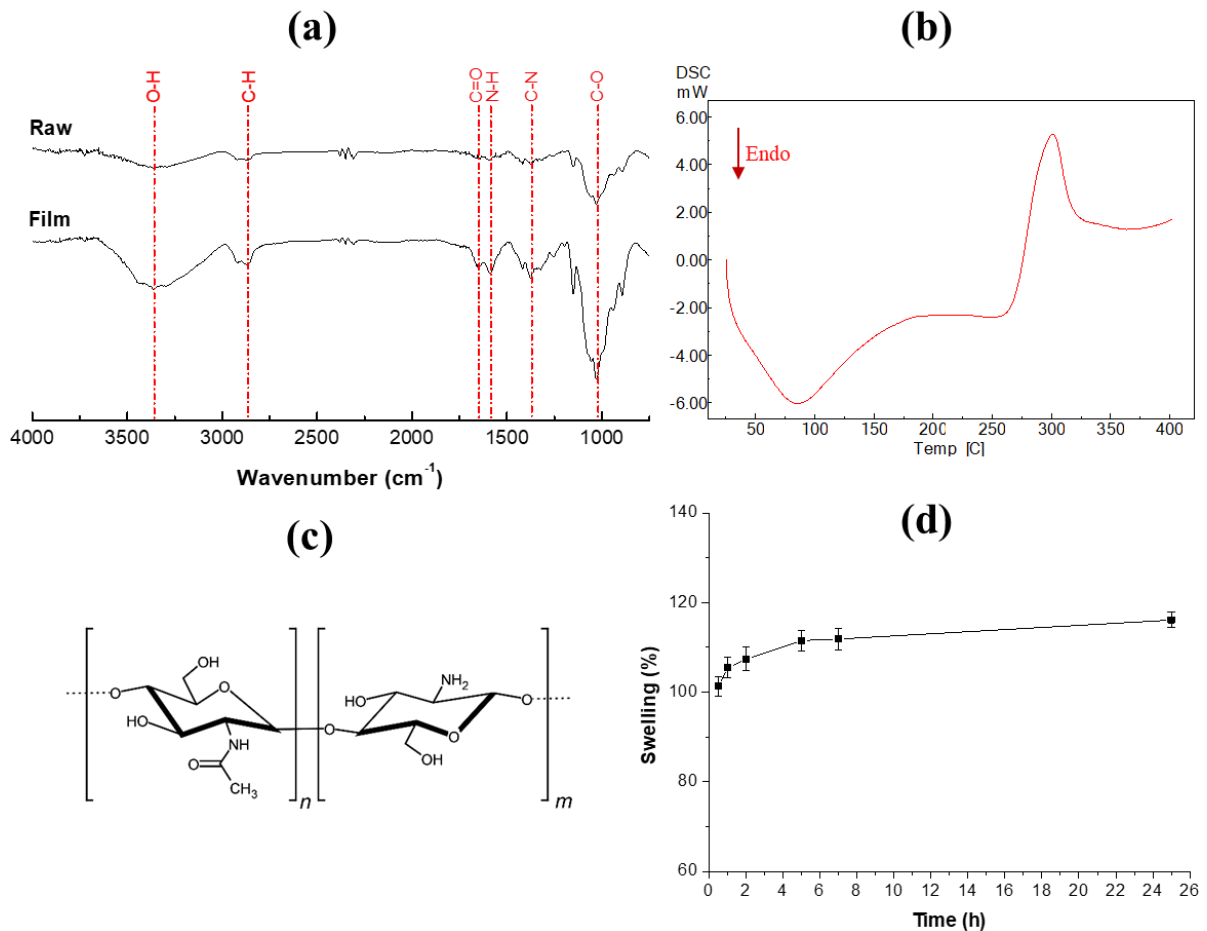
Análise	Resultado
Determinação do Teor Real de Massa (WR)	88,02%
Massa Molar Viscosimétrica Média	$3,99 \times 10^5$ g.mol <sup>-1</sup>
Determinação do Grau de Desacetilação	91,37% ( $\pm 3,77\%$ )

A caracterização morfológica da membrana de quitosana mostrou uma superfície uniforme e homogênea (Fig. 3-a). Além disso, através da imagem da microscopia de força atômica (AFM) foi possível observar uma leve rugosidade em torno de 285 nm (Fig. 3-c). O difratograma mostrou que a membrana possui característica amorfo, embora presente nos ângulos 10 e 20 um halo de baixa cristalinidade característico do polímero (Fig. 3-d). A espessura do filme foi de 145  $\mu\text{m}$  (Fig. 3-b).



**Figura 3:** Caracterização dos filmes de quitosana. Imagens do MEV- Hitachi TM300 mostram a superfície **(a)** e espessura **(b)** da membrana (2000X e 400X); a imagem da microscopia de força atômica **(c)** mostra a rugosidade da superfície da membrana em 3D; o difratograma de raios-X **(d)** mostra a cristalinidade da membrana de quitosana.

O espectro de infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) (Fig. 4-a), mostra a presença dos grupos funcionais da quitosana presente nos espectros, sendo de forma com maior intensidade no espectro da membrana. Ressalta-se a sobreposição do alongamento C=O na região de  $1648\text{ cm}^{-1}$ , referente a banda de amida I e o dobramento nessa região com N-H em  $1585\text{ cm}^{-1}$  (banda de amida II). Outra região de destaque é a ligação de hidrogênio do O-H na banda  $3358\text{ cm}^{-1}$ . A região  $2869\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao grupamento metileno (monômero acetilado) e em  $1027\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento C-O. Na região de  $1374\text{ cm}^{-1}$  observa-se também a presença da deformação da ligação C-N.



**Figura 4:** Caracterização da membrana de quitosana. Espectro do FTIR da quitosana em pó e na forma de membrana (a); curva calorimétrica da membrana de quitosana (b); estrutura química da quitosana (c); percentual de intumescimento da membrana de quitosana (média  $\pm$  desvio padrão) (d).

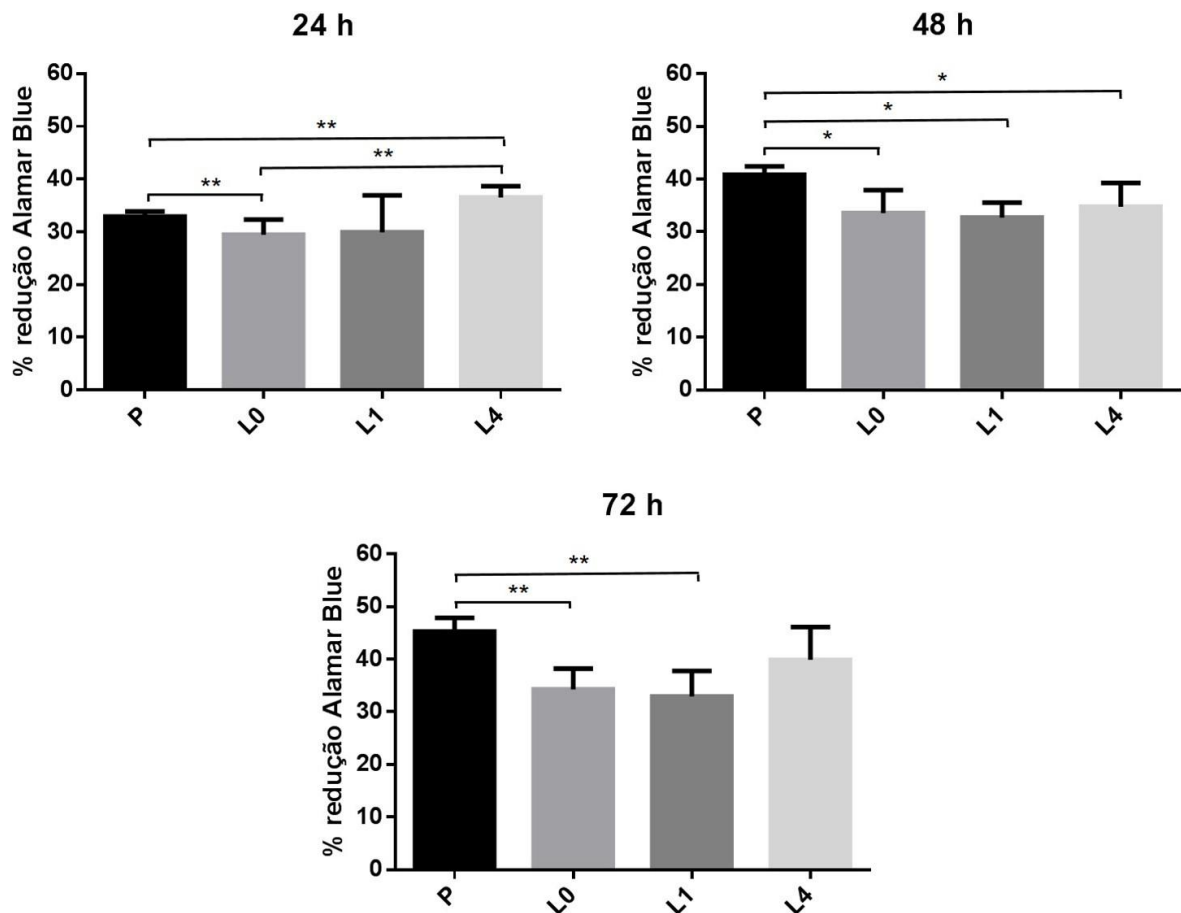
No termograma de DSC da membrana de quitosana (Fig. 4-b) mostra um pico endotérmico de 85,3 °C e um pico exotérmico a 301,1 °C. A variação do peso das membranas foi da faixa de 0,03 a 0,04 g indicando a sua uniformidade. O pH de superfície das membranas apresentou uma média de pH igual a 6,9 ( $\pm 0,25$ ). E na figura 4-c mostra o percentual de intumescimento da membrana de quitosana em função do tempo imerso em solução de PBS, nele é possível observar um inchaço de mais de 100% do seu próprio peso nas primeiras 0,5 horas, e em seguida, com o passar do tempo esse intumescimento vai chegando gradativamente a aproximadamente 116% no tempo de 25 horas de ensaio.

## 5.2 PROLIFERAÇÃO CELULAR (ALAMAR BLUE)

A avaliação da proliferação celular foi realizada a partir da redução do composto Alamar Blue. Assim, quanto maior a redução, maior é a proliferação celular. Os dados da média  $\pm$  desvio padrão da redução do Alamar blue de todos os grupos em todos os intervalos experimentais estão representados na figura 5. No intervalo de 24h, os dados mostraram que os grupos L0 e L1 apresentaram médias inferiores à média do grupo P, que representa a superfície padrão-ouro de crescimento nos ensaios de cultivo celular, enquanto o grupo L4 exibiu a maior média de redução do Alamar Blue. A análise estatística dos dados mostrou diferenças significativas entre os grupos L0 x P ( $p=0,0087$ ), L4 x P ( $p=0,0022$ ) e L4 x L0 ( $p=0,0022$ ). Considerando-se apenas os grupos testados, só foi percebido aumento de proliferação celular quando as células receberam a irradiação com  $4 \text{ J/cm}^2$ , mostrando um aumento significativo na proliferação celular em comparação com o grupo L0.

No intervalo de 48h diferenças significativas foram encontradas entre os grupos: L0 x P ( $p=0,026$ ), L1 x P ( $p=0,0022$ ) e L4 x P ( $p=0,026$ ). Todavia, nenhum dos grupos tratados (L1 e L4) apresentou aumento da proliferação celular, quando comparados com o grupo não irradiado (L0) (Fig. 5).

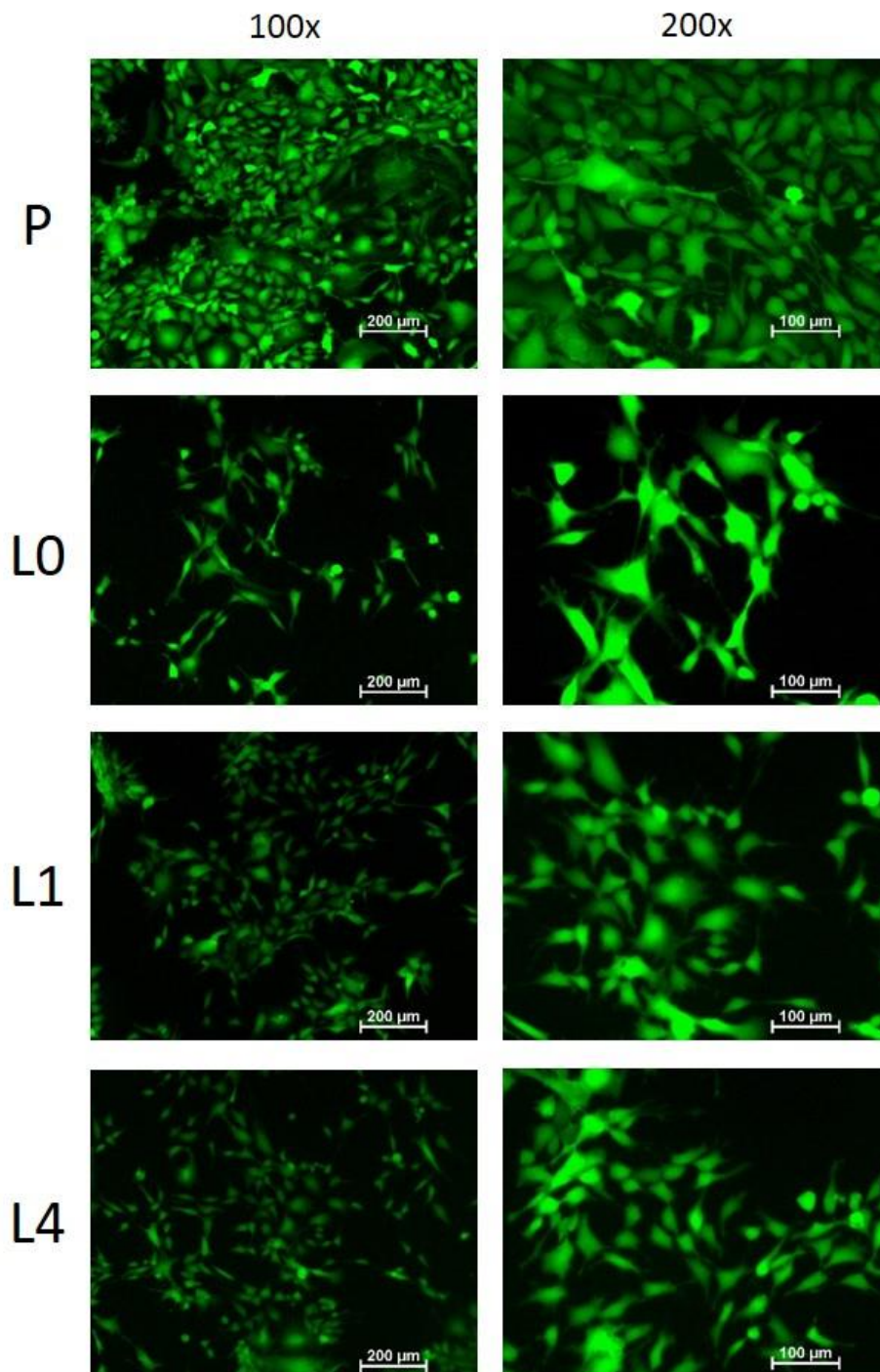
No intervalo de 72h as diferenças significativas foram encontradas entre os grupos L0 x P ( $p=0,0022$ ) e L1 x P ( $p= 0,0022$ ). O grupo L4 apresentou uma média superior aos demais grupos (L0 e L1), sem diferenças estatísticas em comparação ao grupo P, o que pode representar uma tendência de maior proliferação neste grupo (Fig. 5).



**Figura 5:** Redução do Alamar Blue nos grupos ao longo do experimento. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão. Asteriscos representam diferenças significativas (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; Teste de Mann Whitney).

### 5.3 VIABILIDADE (LIVE/DEAD)

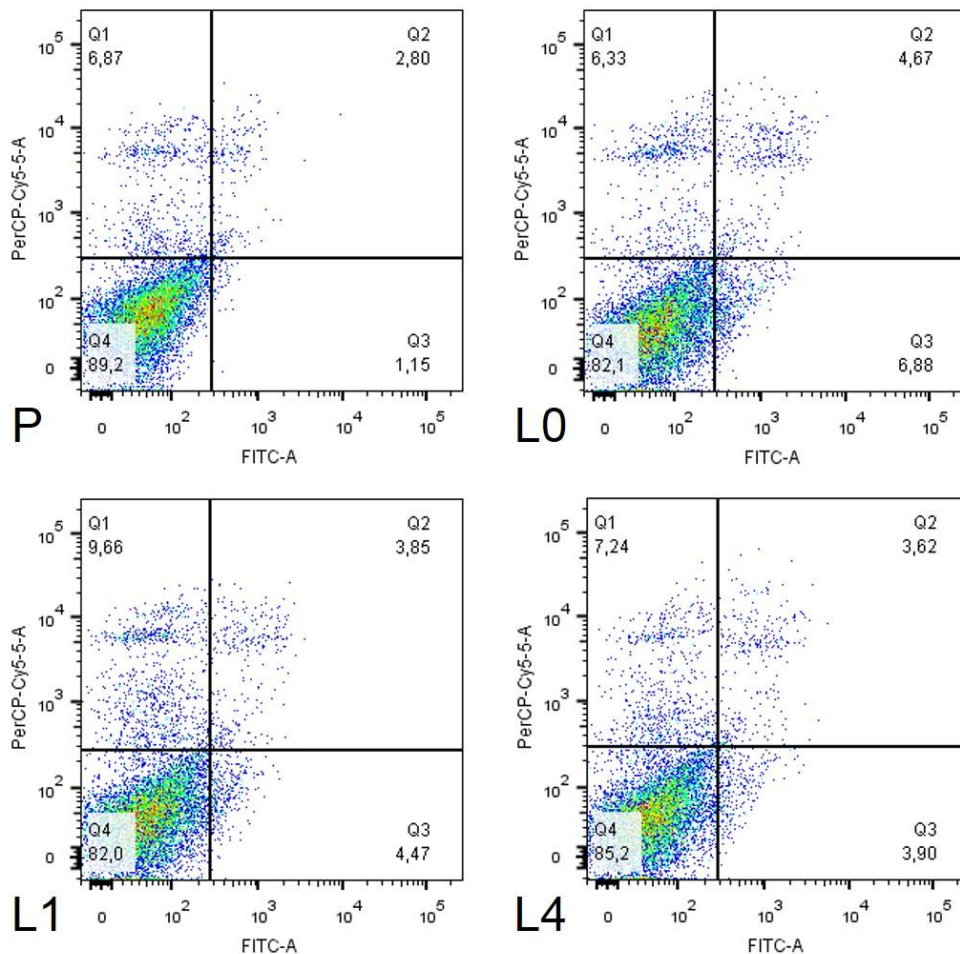
A avaliação das superfícies das placas de cultivo e das membranas contendo células marcadas com o *Live/Dead* (Fig. 6) no intervalo de 72 h mostrou que o grupo P apresenta numerosas células de citoplasma marcado em verde pela calceína AM, o que evidencia sua viabilidade. Houve a redução das células nos grupos L0 e L1 e um leve aumento no grupo L4. Esses achados corroboram com os dados encontrados no Alamar Blue. Células marcadas com núcleos em vermelho pelo homodímero de etideo não foram visualizadas. Uma explicação para isso, é que essas células já estivessem desprendidas das membranas e da placa e foram perdidas durante os procedimentos de lavagens.



**Figura 6:** Resultado do ensaio *Live/Dead*. As fotomicrografias (200 e 100 μm) das células MC3T3-E1 mostram células viáveis marcadas com calceína AM (verde), no intervalo de 72h.

#### 5.4 VIABILIDADE (ANEXINA/PI)

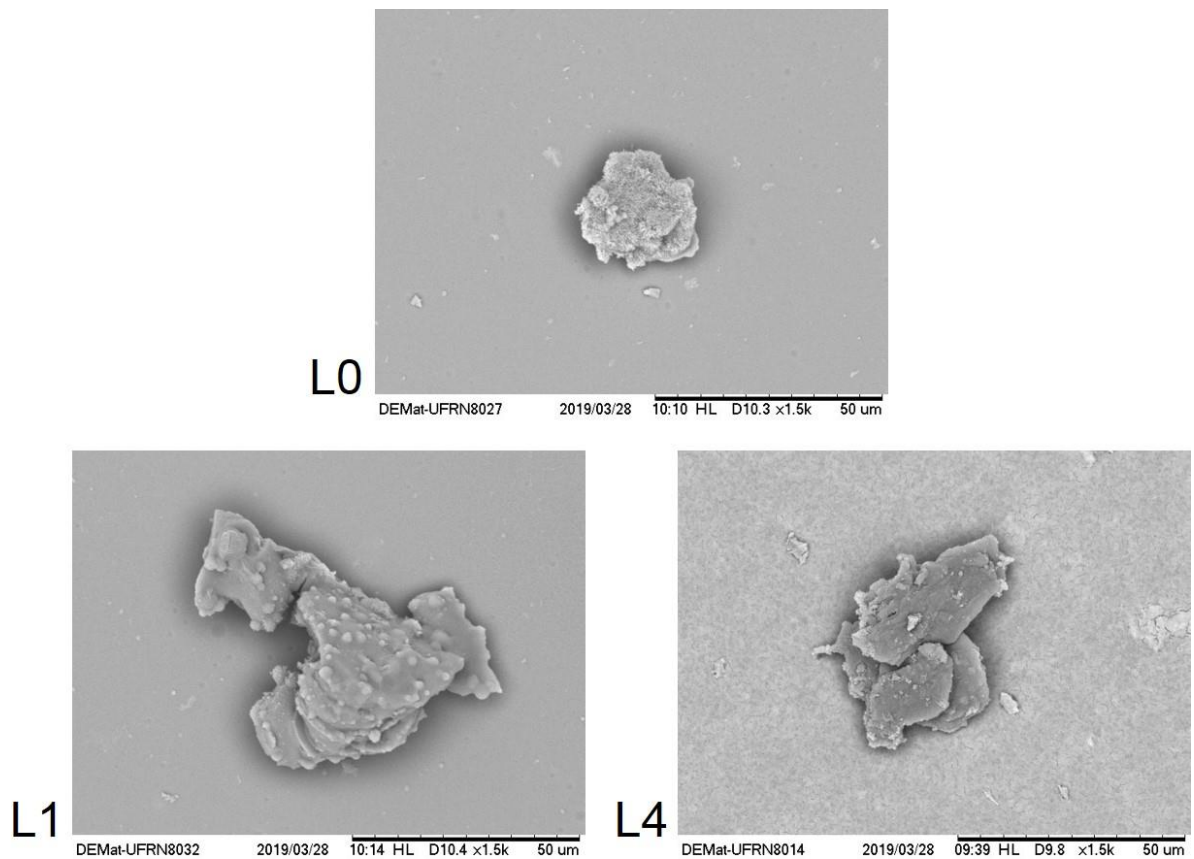
A avaliação da morte celular/apoptose pela marcação da Anexina V/PI em citometria de fluxo mostrou que as células se mantiveram viáveis quando cultivadas sobre membranas de quitosana recebendo ou não irradiações dos lasers (Fig. 7). As células no grupo P apresentaram um maior índice de viabilidade (89,2%) em comparação com os demais grupos experimentais. Entretanto, analisando-se os histogramas dos grupos com células cultivadas sobre a quitosana, é possível perceber que as células irradiadas com 4 J/cm<sup>2</sup> apresentaram um maior percentual de viabilidade (85,2%) do que no grupo irradiado com 1 J/cm<sup>2</sup> (82,0%) e no não irradiado (82,1%).



**Figura 7:** Imunomarcção das células MC3T3-E1 com Annexin V/PI nos grupos estudados, em 72 h. Os quadrantes representam o percentual de células exibindo os eventos celulares, de acordo com a marcação: Q1 (Anex-/PI+): necrose; Q2: (Anex+/PI+): apoptose tardia; Q3 (Anex+/PI-): apoptose inicial; Q4 (Anex-/PI-): viabilidade celular.

## 5.5 MORFOLOGIA CELULAR (MEV)

A análise dos filmes por MEV (Fig. 8) revelou que no grupo não irradiado (L0) as células apresentaram-se mais isoladas, exibindo formato arredondado e com poucas projeções celulares. Já nos grupos irradiados (L1 e L4) as células exibiram projeções mais evidentes e formaram grupamentos celulares.



**Figura 8:** Eletromicrografias de varredura das células cultivadas sobre as membranas de quitosana, no intervalo de 72 horas. Aumento de 1500x. L0: controle não irradiado; L1: controle irradiado com dose de 1 J/cm<sup>2</sup>; L4: controle irradiado com dose de 4 J/cm<sup>2</sup>.

## 6. DISCUSSÃO

As perdas ou injúrias do tecido ósseo causam grandes impactos na qualidade de vida de milhões de pessoas ao redor do mundo, o que leva à necessidade de pesquisas para regeneração ou reposição desse tecido, incluindo-se nesse contexto a engenharia tecidual (BRASSOLATTI et al., 2018; NETO; FERREIRA, 2018). Nos últimos anos as pesquisas têm dado grande destaque à utilização isolada da quitosana e ao uso da fotobioestimulação como fatores que favorecem o reparo tecidual. Os arcabouços de quitosana têm se destacado nesse tipo de pesquisa devido às suas propriedades químicas, físicas e biológicas, o que faz deste biomaterial um ambiente adequado para a proliferação e diferenciação celular, já que tais características o tornam similar à MEC natural (PERIAYAH et al., 2016), enquanto a fotobioestimulação vem mostrando grandes atuações sob a modulação de alguns mecanismos celulares envolvidos no aumento da proliferação celular (ARAGÃO-NETO et al., 2017).

Um modelo para avaliar a modulação do metabolismo ósseo são as células MC3T3-E1, que constituem uma linhagem celular de pré-osteoblastos derivados da calvária de camundongos e são consideradas modelo arquetipo da osteogênese *in vitro*, sendo essa a linhagem celular mais comumente utilizada na pesquisa em biologia óssea *in vitro* (ADDISON et al., 2015). Estas células exibem uma sequência temporal de estágios distintos de proliferação e diferenciação representativos do fenótipo osteoblástico (QUARLES et al., 1992) e assim sua escolha para utilização neste trabalho deve-se ao fato de ser um sistema biológico mais simples para estudar a proliferação de células da linhagem osteogênica, permitindo portanto uma melhor correlação entre a estrutura e propriedades do material e o comportamento celular. O presente trabalho constitui o primeiro a avaliar *in vitro* o comportamento biológico de células pré-osteoblásticas cultivadas na superfície de membranas de quitosana submetidas a diferentes doses de irradiação com LBI, o que representa uma nova possibilidade de utilização para às técnicas de engenharia tecidual óssea.

Para realizar esse estudo foi feito a caracterização da quitosana, já que a compreensão de suas propriedades é muito importante para a sua utilização. O emprego deste biomaterial depende principalmente da sua solubilidade em ambiente aquoso, que está intimamente relacionada ao seu grau de desacetilação e peso

molecular (PERIAYAH et al., 2016). O grau de desacetilação determina a quantidade de grupos amínicos livres no biopolímero, o que torna o biomaterial mais ou menos reativos com outras substâncias, por exemplo, de caráter iônico negativo (ANTONINO et al., 2017). Os achados na caracterização da quitosana mostraram que o grau de desacetilação apresentou um valor 91,37% ( $\pm 3,77\%$ ), evidenciando que a quitosana utilizada apresenta muitos grupos eletronicamente positivos, o que facilita seu manuseio e a torna muito reativa com outras moléculas orgânicas eletronegativas, como, proteínas e ácidos nucleicos (YOUNES; RINAUDO, 2015). Já a massa molecular se apresentou relativamente baixa, com o valor de  $3,99 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ , o que parece ser adequado para a aplicação na forma de filmes ou membranas (ANTONINO et al., 2017). Esses dados comprovam que a quitosana utilizada no experimento, apesar de ser de baixo custo, apresenta boa solubilidade, o que facilita seu manuseio e utilização nos estudos *in vitro*.

A análise das membranas realizadas por meio do FTIR revelou a presença de grupos funcionais que já são bem conhecidos pela literatura (CUI et al., 2018; GATTO et al., 2019; MOURA et al., 2015). O ensaio de DSC da membrana de quitosana mostrou um pico endotérmico de 85,3 °C e um pico exotérmico a 301,1 °C. O primeiro evento térmico provavelmente foi ocasionado pela perda de água do material e no outro evento é referente a degradação da membrana e decomposição dos resíduos de amina da quitosana (BOGGIONE et al., 2017). Esses dados estão de acordo com a literatura (GATTO et al., 2019; MOURA et al., 2015), que ainda mencionam que essas propriedades térmicas são adequadas para a produção de biofilmes.

A rugosidade de um arcabouço é uma característica muito importante para a adesão celular, pois uma maior rugosidade é responsável pelo aumento das interações entre as células e as superfícies (VAGASKÁ et al., 2010). No nosso estudo, a análise morfológica da membrana mostrou superfície uniforme e amorfa com picos de rugosidade de 285,27 nm, um valor que pode ser considerado baixo e que confirma o que é relatado na literatura para membranas de quitosana pura. No estudo de Trakoolwannachai et al (2019) as membranas puras apresentaram rugosidade de 40 nm, enquanto blendas de quitosana e casca de ovo exibiram variação entre 300 e 600 nm. Divya et al (2019) mostraram que membranas de quitosana pura exibiram picos de rugosidade de 169,7 nm, enquanto nas membranas de quitosana com nanofolhas de dissulfeto de molibdênio esfoliadas (E-MoS<sub>2</sub>) o valor chegou a 986,8 nm. Isso indica

que a baixa rugosidade é uma característica dos filmes de quitosana, porém pode ser melhorada quando combinada com outros materiais.

A avaliação da cristalinidade é um importante parâmetro para compreender propriedades mecânicas dos biomateriais, bem como algumas de suas propriedades biológicas, como a degradação. Neste estudo o difratograma mostrou que a membrana possui característica amorfo, apresentando nos ângulos  $10^\circ$  e  $20^\circ$  um halo de baixa cristalinidade. Para Brita et al (2018) a diminuição da cristalinidade acelera a biodegradação da membrana. De fato, a característica amorfa da quitosana já é bem relatada na literatura (NAGARPITA et al., 2017; TOLOUE et al., 2019), o que evidencia as propriedades de biodegradação adequadas deste biomaterial (COMBLAIN et al., 2017; VEDAKUMARI et al., 2017), sugerindo-se assim que as membranas produzidas no presente estudo podem ter potencial para uso em futuros ensaios *in vivo*.

Na análise do intumescimento da membrana de quitosana foi possível observar um inchaço de mais de 100% do seu próprio peso nas primeiras 0,5 horas, mostrando que o filme de quitosana tem uma alta capacidade de absorção de água. Essa característica é muito importante para arcabouços, pois um maior absorção de água fornece nutrientes suficientes para as células (HU et al., 2019). A alta absorção de água pela quitosana também foi mencionada por Wang (2016), indicando que a membrana de quitosana é altamente hidrofílica. Em conjunto, os parâmetros encontrados pela caracterização da membrana de quitosana corroboram os achados mencionados na literatura (ANTONINO et al., 2017; BOGGIONE et al., 2017; BRITA et al., 2018; CUI et al., 2018; DIVYA et al., 2019; GATTO et al., 2019; MOURA et al., 2015; NAGARPITA et al., 2017; PERIAYAH et al., 2016; TRAKOOLWANNACHAI; KHEOLAMAI; UMMARTYOTIN, 2019; WANG et al., 2016; YOUNES; RINAUDO, 2015), confirmando que a membrana produzida neste estudo apresenta as características convencionais das membranas de quitosana.

Muito já se sabe sobre a utilização do LBI na área médica, principalmente no espectro de luz vermelha. Estudos *in vivo* e *in vitro* apontam sua eficiência, mostrando efeitos positivos na cicatrização de feridas cutâneas (ARAGÃO-NETO et al., 2017), no reparo ósseo (BRASSOLATTI et al., 2018), na proliferação de fibroblastos (MARQUES et al., 2017) e de células-tronco (GINANI et al., 2015). Todavia, cada linhagem celular parece responder melhor a parâmetros diferentes de irradiação (RENNO et al., 2007). A estimulação das células pelo laser de luz vermelha, aponta que para se alcançar resultados positivos é necessário utilizar doses baixas de

energia, já que muitos estudos mostram resultados positivos com doses entre  $0,5 \text{ J/cm}^2$  e  $5 \text{ J/cm}^2$  (DEANA et al., 2018; EBRAHIMI et al., 2012; MARQUES et al., 2017). Com relação à fotoestimulação, pouco se sabe sobre os parâmetros adequados para utilização em estudos com células MC3T3-E1. Nosso estudo mostrou resultados favoráveis nesta linhagem de células com dose de  $4 \text{ J/cm}^2$ .

A análise do ensaio de proliferação celular mostrou que as células pré-osteoblásticas cultivadas sobre a membrana de quitosana e sem a ação do laser não exibiram aumento no índice de proliferação celular, evidenciando um percentual proliferativo abaixo do grupo de controle (superfície da placa de cultivo), o que pode estar relacionado à baixa rugosidade da superfície da membrana de quitosana. Isso pode ser um indicativo de que a quitosana isolada não apresenta todas as propriedades necessárias para induzir um aumento na proliferação celular e pode justificar resultados mais favoráveis encontrados na literatura quando a quitosana é utilizada em combinação com outros materiais (BELLINI et al., 2015; VEDAKUMARI et al., 2017; YANG; DI CHEN, 2013; ZHOU et al., 2017).

Contudo, mesmo a quitosana não apresentando estímulos para atividade proliferativa das células, a irradiação nas primeiras 24h com doses de  $4 \text{ J/cm}^2$  mostrou ser bastante eficaz, promovendo diferenças significativas em comparação com o grupo não irradiado. Isso sugere que, mesmo em condições de superfície não favoráveis, a fotobioestimulação pode desencadear mecanismos moleculares nas células e assim a proliferação celular ocorreria como resposta às reações primárias provocadas pela irradiação (KARU, 1999).

No intervalo de 48h, as membranas irradiadas e não irradiadas não mostraram diferenças significativas na proliferação celular. Isso pode indicar que após o intervalo de 24 h, a aplicação de laser não interfere no mecanismo proliferativo dessa linhagem de células quando cultivadas sobre membranas de quitosana. Em um estudo in vitro com parâmetros do laser semelhantes aos do nosso trabalho, Ginani et al (2018) mostraram que uma segunda aplicação de laser em células-tronco pulparens no intervalo de 48 h promoveu um aumento na proliferação celular em 72 h. Assim, é possível hipotetizar que para as técnicas de engenharia tecidual talvez seja necessário a aplicação de mais doses para manter o índice de proliferação celular constante ao longo dos primeiros dias de cultivo.

O grupo L4 apresentou uma leve proliferação celular no intervalo de 72 h. Como não há estudos sobre os parâmetros do laser que foram avaliados em nossa

linhagem de célula, pouco se sabe sobre sua ação neste intervalo. Entretanto, a literatura apresenta estudos com parâmetros próximos aos utilizados em nosso trabalho. Asai et al (2014) mostraram um tendência proliferativa no intervalo de 72 h com comprimento de onda de 633 nm e dose de 3 J/cm<sup>2</sup>, e uma elevada proliferação nos intervalos de 120 h e 168 h. Já Renno et al (2007) mostrou que as células dessa linhagem não apresentaram proliferação quando irradiadas com comprimento de onda de 670 nm e dose de 5 J/cm<sup>2</sup>. Esses dados não são suficientes para estimar o comprimento de onda e dose ideal para estimular a proliferação desse tipo de células. Todavia, mostram que comprimento de onda entre 633 nm e 670 nm e doses próximas de 3 e 4 J/cm<sup>2</sup> podem estimular a proliferação desse tipo celular. Neste sentido, se poderia afirmar que parâmetros próximos a estes seriam ideias para estimular a proliferação desta linhagem celular.

A dose de 1 J/cm<sup>2</sup> não demonstrou efeitos proliferativos nos intervalos estudados, o que pode evidenciar que doses muito baixas não ativam os mecanismos responsáveis pela proliferação dessa linhagem de células. Estes resultados corroboram os achados de Renno et al (2007) e Asai et al (2014), que não apresentaram proliferação em células MC3T3-E1 com doses próximas de 1 J/cm<sup>2</sup>.

Os resultados do ensaio Live-Dead confirmaram que a aplicação da irradiação com LBI mostrou-se favorável para o cultivo das células MC3T3-E1 nas superfícies de membranas de quitosana. As imagens em microscopia de fluorescência evidenciaram a presença de muitas células vivas e ausência de células mortas. Esses achados podem estar relacionados com as propriedades já conhecidas da quitosana, como biodegradabilidade, biocompatibilidade e atoxicidade (AHMED; IKRAM, 2016; PERIAYAH et al., 2016; SARANYA et al., 2017) e ações não danosas pelo laser em baixas doses (ALGHAMDI; KUMAR; MOUSSA, 2012; DEANA et al., 2018).

A avaliação de viabilidade realizada pela marcação da Anexina V/PI em citometria de fluxo mostrou que as células tratadas se apresentaram viáveis, confirmando os achados do Live/Dead por microscopia de fluorescência. Houve uma proporção menor de viabilidade nos grupos tratados quando comparados ao grupo P, porém o grupo L4 apresentou um leve aumento sobre os grupos L0 e L1. Esses dados também foram condizentes com os resultados da proliferação celular no ensaio do Alamar Blue realizado no intervalo de 72h.

A análise dos filmes por MEV, revelou que as células cultivadas sobre as membranas não irradiadas apresentaram forma arredondada e poucas projeções.

Isso pode estar relacionado à baixa rugosidade do filme de quitosana, que foi demonstrado nos ensaios de caracterização. Estudos com células MC3T-E1 cultivadas sobre membranas à base de quitosana mostraram que esse tipo de célula apresentou formas alongadas e formação de lamelipódios, o que para eles é a morfologia padrão destas células (GEORGOPOULOU et al., 2018a; JHALA; RATHER; VASITA, 2016). Contudo, essas membranas foram combinadas com policaprolactona que atuou melhorando as propriedades da superfície e consequentemente a adesão das células sobre os arca-bouços. Por outro lado, quando nossas células receberam as irradiações com doses de 1 e 4 J/cm<sup>2</sup> exibiram projeções mais evidentes e formaram grupamentos celulares. Como não há estudos que avaliem o comportamento de células MC3T3-E1 cultivadas sobre membranas de quitosanas e irradiadas com LBI, pouco se sabe sobre o comportamento celular nestes parâmetros. Porém o estudo de Hsu et al (2010) mostrou que células endoteliais cultivadas sobre superfícies poliuretano tiveram sua adesão melhorada quando foram irradiadas com LBI. Isso sugere que a fotobioestimulação nos parâmetros estudados supera o efeito da membrana e estimula a adesão e proliferação da linhagem de células estudadas.

Todos esses dados mostraram os efeitos positivos da fotoestimulação sobre células pré-osteoblásticas quando submetida a dose de 4 J/cm<sup>2</sup>, evidenciando o grande potencial desse parâmetro na modulação celular. As membranas de quitosana não interferiram na viabilidade das células. Entretanto, precisam ter suas propriedades mecânicas melhoradas para aumentar seu potencial em futuros estudos relacionados ao cultivo celular *in vitro*. A literatura aponta algumas substâncias que podem melhorar estas características, como hidroxiapatita (ZHOU et al., 2017), alginato (OPRENYESZK et al., 2015) e policaprolactona (GEORGOPOULOU et al., 2018a). Assim, esses resultados são muito importantes, pois ao nosso conhecimento, a literatura não apresenta ainda estudos com laserterapia em células MC3T3-E1 cultivadas sobre membrana de quitosana, ficando então demonstrado que os parâmetros utilizados neste trabalho podem contribuir para a engenharia de tecidos ósseos utilizando este modelo.

## 7 CONCLUSÕES

Conclui-se desse estudo que a laserterapia de baixa intensidade com uma dose de 4 J/cm<sup>2</sup> estimula a proliferação de células pré-osteoblásticas (MC3T3-E1) cultivadas sobre membranas de quitosana, mantendo a sua viabilidade e favorecendo a sua biointegração ao biomaterial. As membranas produzidas se apresentaram como superfícies com propriedades viáveis para o cultivo celular, apesar de não exercerem isoladamente um efeito proliferativo sobre a linhagem celular estudada. O modelo proposto revela potencial para estudos na área da engenharia tecidual óssea, entretanto, são necessários mais estudos para avaliar mais profundamente as respostas celulares, em especial a diferenciação osteogênica e produção de matriz óssea.

## REFERÊNCIAS

- ADDISON, W. N. et al. Extracellular matrix mineralization in murine MC3T3-E1 osteoblast cultures: An ultrastructural, compositional and comparative analysis with mouse bone. **Bone**, v. 71, p. 244–256, 2015.
- AHMED, S.; IKRAM, S. Chitosan Based Scaffolds and Their Applications in Wound Healing. **Achievements in the Life Sciences**, v. 10, n. 1, p. 27–37, 2016.
- ALGHAMDI, K. M.; KUMAR, A.; MOUSSA, N. A. Low-level laser therapy: A useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. **Lasers in Medical Science**, v. 27, n. 1, p. 237–249, 2012.
- ANTONINO, R. S. C. M. D. Q. et al. Preparation and characterization of chitosan obtained from shells of shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone). **Marine Drugs**, v. 15, n. 5, p. 1–12, 2017.
- ARAGÃO-NETO, A. C. et al. Combined therapy using low level laser and chitosan-policaju hydrogel for wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 268–272, 2017.
- ASAI, T. et al. The Long-term Effects of Red Light-emitting Diode Irradiation on the Proliferation and Differentiation of Osteoblast-like MC3T3-E1 Cells. **Kobe J. Med. Sci**, v. 60, n. 1, p. 12–18, 2014.
- AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2.3, n. 3, p. 27–34, 2007.
- BELLINI, M. Z. et al. Combining xanthan and chitosan membranes to multipotent mesenchymal stromal cells as bioactive dressings for dermo-epidermal wounds. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 29, n. 8, p. 1155–1166, 2015.
- BENSADOUN, R.-J.; NAIR, R. G. Low-Level Laser Therapy in the Management of Mucositis and Dermatitis Induced by Cancer Therapy. **Phomedicine and Laser Surgery**, v. 33, n. 10, p. 487–491, 2015.
- BOGGIONE, J. M. et al. Synthesis and characterization of chitosan membranes functionalized with amino acids and copper for adsorption of endoglucanase. **Powder Technology**, v. 315, p. 250–257, 2017.
- BORZABADI-FARAHANI, A. Effect of low-level laser irradiation on proliferation of human dental mesenchymal stem cells; a systemic review. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 162, p. 577–582, 2016.
- BRASSOLATTI, P. et al. Photobiomodulation on critical bone defects of rat calvaria : a

- systematic review. **Laser in Medical Science**, p. 1–8, 2018.
- BRITA, F. P. et al. Obtenção E Avaliação De Filmes De Quitosana/Gelatina Para Liberação De Midazolam. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 13, p. 42–48, 2018.
- BUCHIGNANI, V. C. et al. Effect of low-level laser therapy and zoledronic acid on bone repair process. **Lasers in Medical Science**, p. 1–8, 2019.
- BURST, S. A. et al. Cancer Phototherapy via Selective Photoinactivation of Respiratory Chain Oxidase to Trigger a Fatal. **ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING**, v. 20, n. 5, p. 733–746, 2014.
- CAI, S. et al. Control of cell proliferation by a porous chitosan scaffold with multiple releasing capabilities. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 6996, n. December, p. 1–10, 2017.
- CAMPOS, M. G. N.; MEI, L. H. I.; SANTOS JR, A. R. Sorbitol-Plasticized and Neutralized Chitosan Membranes as Skin Substitutes. **Materials Research**, v. 18, n. 4, p. 781–790, 2015.
- CATÃO, M. H. C. V. Os benefícios do laser de baixa intensidade na clínica odontológica na estomatologia. **Revista Brasileira de Patologia Oral**, v. 3, n. 1, p. 589–599, 2004.
- CHANG, H. H. et al. A novel chitosan- $\gamma$ PGA polyelectrolyte complex hydrogel promotes early new bone formation in the alveolar socket following tooth extraction. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1–11, 2014.
- CHEUNG, R. C. F. et al. Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications. **Marine Drugs**, v. 13, p. 5156–5186, 2015.
- CHUNG, T. et al. Growth of human endothelial cells on photochemically grafted Gly – Arg – Gly – Asp ( GRGD ) chitosans. **Biomaterials**, v. 23, p. 4803–4809, 2002.
- COMBLAIN, F. et al. Chitosan: A promising polymer for cartilage repair and viscosupplementation. **Bio-Medical Materials and Engineering**, v. 28, n. s1, p. S209–S215, 2017.
- CUI, L. et al. Preparation and characterization of chitosan membranes. **RSC Advances**, v. 8, n. 50, p. 28433–28439, 2018.
- DEANA, A. M. et al. The impact of photobiomodulation on osteoblast-like cell: a review. **Lasers in Medical Science**, v. 33, n. 5, p. 1147–1158, 2018.
- DEEV, R. V et al. Ordinary and Activated Bone Grafts : Applied Classification and the Main Features. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–19, 2015.
- DIVYA, K. et al. Investigating the usefulness of chitosan based proton exchange

- membranes tailored with exfoliated molybdenum disulfide nanosheets for clean energy applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 208, p. 504–512, 2019.
- DUTTA, J.; TRIPATHI, S.; DUTTA, P. K. **Progress in antimicrobial activities of chitin, chitosan and its oligosaccharides: A systematic study needs for food applications**. [s.l: s.n.]. v. 18
- EBRAHIMI, T. et al. The Influence of Low-Intensity Laser Therapy on Bone Healing. **Journal of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences**, v. 9, n. 4, p. 238–248, 2012.
- EISSA, M.; SALIH, W. H. M. The influence of low-intensity He-Ne laser on the wound healing in diabetic rats. **Lasers in Medical Science**, v. 32, n. 6, p. 1261–1267, 2017.
- ELIEH-ALI-KOMI, D.; HAMBLIN, M. R. Chitin and Chitosan: Production and Application of Versatile Biomedical Nanomaterials. **International journal of advanced research**, v. 4, n. 3, p. 411–427, mar. 2016.
- FARIVAR, S.; MALEKSHAHABI, T.; SHIARI, R. Biological effects of low level laser therapy. **Journal of Lasers in Medical Sciences**, v. 5, n. 2, p. 58–62, 2014.
- FERNANDEZ-YAGUE, M. A. et al. Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physicommechanical strategies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 84, p. 1–29, 2015.
- FILLINGHAM, Y.; JACOBS, J. Bone grafts and their substitutes. **Bone Joint J**, v. 98-B, p. 6–9, 2016.
- FREITAS, L. F. DE; HAMBLIN, M. R. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. **IEEE JOURNAL OF SELECTED TOPICS IN QUANTUM ELECTRONICS**, v. 22, n. 3, p. 17, 2016.
- GAJDOŠOVÁ, M. et al. Evaluation of mucoadhesive oral films containing nystatin. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 14, n. 4, p. 247–256, 2016.
- GATTO, M. et al. Study of chitosan with different degrees of acetylation as cardboard paper coating. **Carbohydrate Polymers**, v. 210, p. 56–63, 2019.
- GEORGOPOULOU, A. et al. Osteogenic potential of pre-osteoblastic cells on a chitosan-graft-polycaprolactone copolymer. **Materials**, v. 11, n. 4, p. 1–14, 2018a.
- GEORGOPOULOU, A. et al. Chitosan/gelatin scaffolds support bone regeneration. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 29, n. 5, 2018b.
- GINANI, F. et al. Effect of low-level laser therapy on mesenchymal stem cell proliferation : a systematic review. **Laser Med Sci**, v. 30, p. 2189–2194, 2015.
- GINANI, F. et al. Low-level laser irradiation induces in vitro proliferation of stem cells

- from human exfoliated deciduous teeth. **Lasers Med Sci**, v. 33, p. 95–102, 2018.
- GOSK, J.; MARTYNKIEWICZ, J.; STEPNIEWSKI, M. Chitosan and its composites : Properties for use in bone substitution. **Polymers in Medicine**, v. 47, p. 49–53, 2017.
- HAWKINS-EVANS, D.; ABRAHAMSE, H. Efficacy of three different laser wavelengths for in vitro wound healing. **Photodermatology, Photoimmunology e Photomedicine**, v. 24, n. 14, p. 199–210, 2008.
- HENRIQUES, Á. C. G.; CAZAL, C.; CASTRO, J. F. L. Ação da laserterapia no processo de proliferação e diferenciação celular: revisão da literatura. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 37, n. 4, p. 295–302, 2010.
- HSU, S. et al. The Effect of Laser Preexposure on Seeding Endothelial Cells to a Biomaterial Surface. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 28, n. S2, p. 37–42, 2010.
- HU, X. et al. Tissue and Cell A biomimetic cartilage gradient hybrid scaffold for functional tissue engineering of cartilage. **Tissue and Cell**, v. 58, n. May, p. 84–92, 2019.
- INOE, A.; ZAFANELLI, C.; ROSSATO, R. Avaliação morfológica do efeito do laser de baixa potência HeNe em feridas cutâneas de coelhos. **Arq. Ciên.Vet. Zool. Unipar**, v. 11, p. 27–30, 2008.
- ISLAM, M.; RAHMAN BHUIYAN, M. A.; ISLAM, M. N. Chitin and Chitosan : Structure , Properties and Applications in Biomedical Engineering. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 25, n. 3, p. 854–866, 2017.
- JHALA, D.; RATHER, H.; VASITA, R. Polycaprolactone-chitosan nanofibers influence cell morphology to induce early osteogenic differentiation. **Biomaterials Science**, v. 4, n. 11, p. 1584–1595, 2016.
- KARU, T. Molecular Mechanism of the Therapeutic Effect of Low-Intensity Laser Radiation. **Laser in the Sciences**, v. 2, p. 53–74, 1988.
- KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **J. Photobiol. B: Biol.**, v. 49, p. 1–17, 1999.
- KARU, T. I. Photobiological Fundamentals of Low-Power Laser Therapy. **Journal of Quatum Electronics**, v. 23, p. 1703–1720, 1987.
- KIM, I. Y. et al. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 1, p. 1–21, 2008.
- KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications q. **Reative E Functional Polymers**, v. 46, p. 1–27, 2000.
- KUMARI, S.; RATH, P. K. Extraction and Characterization of Chitin and Chitosan from

- (Labeo rohit) Fish Scales. **Procedia Materials Science**, v. 6, n. Icmopc, p. 482–489, 2014.
- LANGER, R.; VACANTI, J. Advances in Tissue Engineering. **J Pediatr Surg.**, v. 51, n. 1, p. 8–12, 2016.
- LIAQAT, F.; ELTEM, R. Chitooligosaccharides and their biological activities: A comprehensive review. **Carbohydrate Polymers**, v. 184, n. November 2017, p. 243–259, 2018.
- LIN, F. et al. Lasers , stem cells , and COPD. **Journal of Translational Medicine**, v. 8, n. 16, p. 1–10, 2010.
- LINS, R. D. A. U. et al. Biostimulation effects of low-power laser in the repair process. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 85, n. 6, p. 849–855, 2010.
- LU, H. et al. Biomaterials with antibacterial and osteoinductive properties to repair infected bone defects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 1–18, 2016.
- MAROT, D.; KNEZEVIC, M.; NOVAKOVIC, G. V. Bone tissue engineering with human stem cells. **Stem Cell research and therapy**, v. 1, n. 10, p. 1–10, 2010.
- MARQUES, N. C. T. et al. Effects of PBM in different energy densities and irradiance on maintaining cell viability and proliferation of pulp fibroblasts from human primary teeth. **Lasers in Medical Science**, v. 32, n. 7, p. 1621–1628, 2017.
- MARTINS, J. G. et al. Durable pectin/chitosan membranes with self-assembling, water resistance and enhanced mechanical properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 188, p. 136–142, 2018.
- MIGLIARIO, M. et al. Laser-induced osteoblast proliferation is mediated by ROS production. **Lasers in Medical Science**, v. 29, n. 4, p. 1463–1467, 2014.
- MOURA, J. M. et al. Preparation of Chitosan with Different Characteristics and Its Application for Biofilms Production. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 23, n. 4, p. 470–477, 2015.
- NAGARPITA, M. V. et al. Synthesis and swelling characteristics of chitosan and CMC grafted sodium acrylate-co-acrylamide using modified nanoclay and examining its efficacy for removal of dyes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 1226–1240, 2017.
- NASCIMENTO, E. G. et al. Tailoring drug release properties by gradual changes in the particle engineering of polysaccharide chitosan based powders. **Polymers**, v. 9, n. 7, p. 1–14, 2017.

- NETO, A. S.; FERREIRA, J. M. F. Synthetic and marine-derived porous scaffolds for bone tissue engineering. **Materials**, v. 11, n. 9, 2018.
- NOBA, C. et al. Laser for bone healing after oral surgery : systematic review. **Laser in Medical Science**, v. 0, p. 1–8, 2017.
- OPRENYESZK, F. et al. Chitosan enriched three-dimensional matrix reduces inflammatory and catabolic mediators production by human chondrocytes. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–17, 2015.
- ORYAN, A. et al. Bone regenerative medicine: Classic options, novel strategies, and future directions. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 9, n. 1, p. 1–27, 2014.
- PERCIVAL, S. L.; FRANCOLINI, I.; DONELLI, G. Low-level laser therapy as an antimicrobial and antibiofilm technology and its relevance to wound healing. **Future Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 255–272, 2015.
- PERIAYAH, M. H. et al. Chitosan : A Promising Marine Polysaccharide for Biomedical. **Pharmacogn. Rev.**, v. 10, p. 39–42, 2016.
- POLO-CORRALES, L.; LATORRE-ESTEVEZ, M.; RAMIREZ-VICK, J. E. Scaffold Design for Bone Regeneration. **J Nanosci Nanotechnol**, v. 14, n. 1, p. 15–56, 2014.
- PROCKT, A. P.; TAKAHASHI, A.; PAGNONCELLI, R. M. Uso de terapia com laser de baixa intensidadena cirurgia bucomaxilofacial. **Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentaria e Cirurgia Maxilofacial**, v. 49, n. 4, p. 247–255, 2008.
- QUARLES, L. D. et al. Distinct Proliferative and Differentiated Stages of Murine MC3T3-E1 Cells in Culture : An In Vitro Model of Osteoblast Development. **JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH**, v. 7, n. 6, p. 683–692, 1992.
- RAVI KUMAR, M. N. V. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, n. 1, p. 1–27, 2000.
- RENNO, A. C. M. et al. The Effects of Laser Irradiation on Osteoblast and Osteosarcoma Cell Proliferation and Differentiation in Vitro. **Phomedicine and Laser Surgery**, v. 25, n. 4, p. 275–280, 2007.
- ROCHA JÚNIOR, A. M. et al. Effects of low-level laser therapy on the progress of wound healing in humans : the contribution of in vitro and in vivo experimental studies. **J Vasc Bras**, v. 6, n. 3, p. 258–266, 2007.
- ROY, T. et al. Core-Shell Nanofibrous Scaffold Based on Polycaprolactone-Silk Fibroin Emulsion Electrospinning for Tissue Engineering Applications. **Bioengineering**, v. 5,

n. 3, p. 68, 2018.

SALDANHA, D. P. et al. Mechanical Properties and Release Studies of Chitosan Films Impregnated with Silver Sulfadiazine. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 102, p. 3462–3470, 2006.

SANTOS, Z. M. et al. Determination of deacetylation degree of chitosan: a comparison between conductometric titration and CHN elemental analysis. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 18, p. 2591–2595, 2009.

SARANYA, T. S. et al. Synthesis, characterisation and biomedical applications of curcumin conjugated chitosan microspheres. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 1, p. 1–7, 2017.

SENGUPTA, D.; WALDMAN, S. D.; LI, S. From in vitro to in situ tissue engineering. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 42, n. 7, p. 1537–1545, 2014.

SRINIVASAN, S.; AVADHANI, N. Cytochrome c Oxidase Dysfunction in Oxidative Stress. **Free Radic Biol Med**, v. 53(6), n. 3, p. 1252–1263, 2012.

TOLOUE, E. B. et al. Potential of an electrospun composite scaffold of poly (3-hydroxybutyrate)-chitosan/alumina nanowires in bone tissue engineering applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 99, p. 1075–1091, 2019.

TRAKOOLWANNACHAI, V.; KHEOLAMAI, P.; UMMARTYOTIN, S. Development of hydroxyapatite from eggshell waste and a chitosan-based composite: In vitro behavior of human osteoblast-like cell (Saos-2) cultures. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 1–28, 2019.

VAGASKÁ, B. et al. Osteogenic cells on bio-inspired materials for bone tissue engineering. **Physiological Research**, v. 59, n. 3, p. 309–322, 2010.

VEDAKUMARI, W. S. et al. Quercetin impregnated chitosan–fibrin composite scaffolds as potential wound dressing materials — Fabrication, characterization and in vivo analysis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, p. 106–112, 2017.

VUDDANDA, P. R. et al. Effect of surfactants and drug load on physico-mechanical and dissolution properties of nanocrystalline tadalafil-loaded oral films. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 109, p. 372–380, 2017.

WANG, F. et al. Evaluation of in vitro and in vivo osteogenic differentiation of nano-hydroxyapatite/chitosan/poly(lactide-co-glycolide) scaffolds with human umbilical cord mesenchymal stem cells. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 102, n. 3, p. 760–768, 2014.

WANG, X. et al. Preparation of pure chitosan film using ternary solvents and its super

absorbency. **Carbohydrate Polymers**, v. 153, p. 253–257, 2016.

YAN, X. et al. Identification and characterization of chitin deacetylase2 from the American white moth, *Hyphantria cunea* (Drury). **Gene**, v. 670, p. 98–105, 2018.

YANG, C. R.; DI CHEN, J. Preparation and biological evaluation of chitosan-collagen-icariin composite scaffolds for neuronal regeneration. **Neurological Sciences**, v. 34, n. 6, p. 941–947, 2013.

YANG, L. E. et al. Vascularization of repaired limb bone defects using chitosan-  $\beta$  -tricalcium phosphate composite as a tissue engineering bone scaffold. **Molecular Medicine Reports**, v. 12, p. 2343–2347, 2015.

YOUNES, I.; RINAUDO, M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. **Marine Drugs**, v. 13, n. 3, p. 1133–1174, 2015.

ZEIN, R.; SELTING, W.; BENEDICENTI, S. Effect of Low-Level Laser Therapy on Bone Regeneration During Osseointegration and Bone Graft 1 1. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. XX, n. Xx, p. 1–10, 2017.

ZHOU, D. et al. Comparative study of porous hydroxyapatite/chitosan and whitlockite/chitosan scaffolds for bone regeneration in calvarial defects. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 12, p. 2673–2687, 2017.