

UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

DEBORA CARRILHO PENTEADO

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA
TECIDUAL DA MEMBRANA DE LÁTEX NATURAL
ASSOCIADA AO METRONIDAZOL IMPLANTADA EM
TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS**

BAURU
2014

DEBORA CARRILHO PENTEADO

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA
TECIDUAL DA MEMBRANA DE LÁTEX NATURAL
ASSOCIADA AO METRONIDAZOL IMPLANTADA EM
TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Centro de Ciências da
Saúde como parte dos requisitos para
obtenção do título de bacharel em
Odontologia, sob orientação do Prof. Ms.
Leandro de Andrade Holgado.

**BAURU
2014**

Penteado, Debora Carrilho.

P4191a

Avaliação da resposta inflamatória tecidual da membrana de látex natural associada ao metronidazol implantada em tecido subcutâneo de ratos / Debora Carrilho Penteado -- 2014.

34f. : il.

Orientador: Prof. Me. Leandro de Andrade Holgado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia)
– Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.

1. Regeneração tecidual guiada. 2. Metronidazol. 3. Látex natural. 4. Membrana oclusiva. I. Holgado, Leandro de Andrade. II. Título.

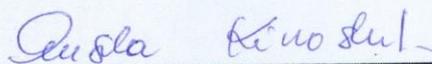
ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Ata de Defesa do Trabalho de Conclusão de Curso em Odontologia de Débora Carrilho Penteado.

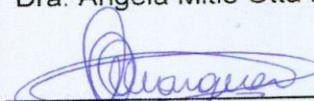
Ao dia dezenove de novembro de dois mil e quatorze, reuniu-se a banca examinadora do trabalho apresentado como Trabalho de Conclusão de Curso em Odontologia de DÉBORA CARRILHO PENTEADO, intitulado: **“Avaliação do comportamento da membrana de látex natural associada ao metronidazol implantada em tecido subcutâneo de ratos.”** Compuseram a banca examinadora os professores Ms. Leandro de Andrade Holgado (orientador), Dra. Angela Mitie Otta Kinoshita e Ms. Leonardo Marques. Após a exposição oral, a candidata foi arguida pelos componentes da banca que se reuniram, e decidiram, APROVADA, com a nota 90,0 a monografia. Para constar, fica redigida a presente Ata, que aprovada por todos os presentes, segue assinada pela Orientadora e pelos demais membros da banca.



Ms. Leandro de Andrade Holgado (Orientador)



Dra. Angela Mitie Otta Kinoshita (Avaliador 1)



Ms. Leonardo Marques (Avaliador 2)

Dedico este trabalho a Deus, autor da minha existência; aos meus pais, aos quais me espelho e a minha família por todo apoio ao longo desta jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente, a Deus, autor da minha existência e consumidor da minha fé. Me capacitou, e pela Tua graça e misericórdia me fez chegar até aqui.

Aos meus pais Heydenilso e Luciene, fica a minha eterna gratidão, pois confiaram em mim e me deram esta oportunidade de sonhar, concretizar e encerrar mais uma etapa da minha vida. Sei que eles não mediram esforços pra que este sonho se realizasse e sem a compreensão, ajuda e confiança deles, nada disso seria possível hoje. Aos meus avós, Mariano, Marli, Ismenia; fica também o meu muito obrigado, vocês são para mim exemplos de vida e sempre me ajudaram com muita sabedoria. Minha família, além da dedicatória desta conquista dedico a minha vida. Meu noivo, Vinícius, por toda paciência, compreensão, carinho ao longo dessa jornada; a você não só dedico este trabalho como também o meu amor.

Meus agradecimentos também ao Prof. Dr. Rodrigo Vivan por autorizar como representante legal do comitê de ética a iniciação desta pesquisa. Aos funcionários da Universidade Sagrado Coração; Profa. Dra. Ângela pela fabricação das membranas de látex utilizadas no experimento e colaboração com os resultados finais deste trabalho, também ao Ms. Leonardo Marques por completar e contribuir com muita experiência a banca examinadora. Fabi, Liginha, e Wilson por toda a atenção e ajuda durante o período laboratorial e todos que ajudaram indiretamente na conclusão de mais esta etapa.

Por fim, o meu muito obrigado e respeito ao meu orientador Prof. Ms. Leandro Holgado, pela confiança e exigir de mim muito mais do que eu supunha ser capaz de fazer. Agradeço por transmitir seus conhecimentos e por fazer de meu tcc uma experiência positiva, algo que levarei para sempre.

“Algumas pessoas marcam a nossa vida para sempre, umas porque nos vão ajudando na construção, outras porque nos apresentam projetos de sonho e outras ainda porque nos desafiam a construí-los”.

RESUMO

A ciência dos biomateriais já algum tempo tem contribuído para o desenvolvimento de membranas que atuam como barreiras oclusivas com objetivo de impedir a proliferação de células epiteliais e conjuntivas para o interior do defeito ósseo provendo um tempo adicional para as células osteogênicas, cuja migração é mais lenta, repovoarem a área do defeito e, por fim garantir com eficiência a neoformação óssea. Esses biomateriais para assim serem considerados devem apresentar biocompatibilidade, manutenção do espaço, oclusividade celular, boas propriedades de manuseio e capacidade de absorção. As biomembranas podem ser classificadas como: permeáveis (permitem a troca de massa entre dois ambientes); e impermeáveis, se subdividindo ainda em absorvíveis, de curta, média e longa duração e as não absorvíveis estas as quais após o tratamento precisam ser removidas por meio de intervenção cirúrgica. A utilização de membranas para potencializar a formação óssea, denominado regeneração óssea guiada (ROG) tem ganhado um valoroso espaço dentro da prática cirúrgica, e principalmente odontológica. Este trabalho consiste em avaliar a biocompatibilidade *in vivo* da biomembrana de látex natural associada ao metronidazol, em implantes subcutâneos de ratos, visto a importância das membranas oclusivas para tratamentos de defeitos ósseos, principalmente aqueles originados pela progressão da doença periodontal, sendo a associação da mesma com antimicrobianos como o metronidazol a ser usado de maneira local, simulando um sistema “*drug delivery*”. Para tanto foram utilizados 21 ratos machos, adultos da linhagem Wistar, onde foi implantado cirurgicamente no dorso do animal os biomateriais a serem testados, dividindo então os animais em três grupos sob períodos de observações de 7, 15 e 45 dias. Em cada animal foram feitas três incisões, aonde foram implantadas as seguintes membranas: membrana de látex associado ao metronidazol, membrana de látex apenas e membrana de politetrafluoretileno (PTFE). Após o tempo determinado de estudos, 7 animais foram eutanasiados em cada um dos períodos, e a amostra da região dorsal do animal coletada para a análise morfológica e descritiva, assim como o padrão inflamatório que foram comparados pelo teste não paramétrico Kruskal Wallis e Student Newman Keuls, e as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0.05$. Com os valores obtidos após 45 dias não houve diferenças entre os grupos sugerindo a biocompatibilidade da membrana de látex associada ao metronidazol.

Palavras-chave: Regeneração tecidual guiada. Membrana oclusiva. Látex natural. Metronidazol.

ABSTRACT

The science of biomaterials already some time has contributed to the development of occlusive membranes that act as barriers in order to prevent the proliferation of epithelial and connective cells into the bone defect by providing additional time for osteogenic cells whose migration is slower , repopulate the defective area , and finally to ensure efficient bone formation . These biomaterials should be considered so as to provide biocompatibility, maintenance space, Cell occlusive, good handling properties and absorption capacity. Biomembranes can be classified as : permeable (allows the mass exchange between two environments) ; and waterproof , is also subdivided into absorbable, short , medium and long term , and these non-absorbable after treatment which must be removed by surgical intervention. The use of membranes to enhance bone formation , called guided bone regeneration (GBR) has gained a valuable space within the surgical practice , and especially dental . This work is to assess the in vivo biocompatibility of natural latex membrane associated with metronidazole, subcutaneous implants in rats, since the importance of occlusive membranes for treatment of bone defects, especially those originated by the progression of periodontal disease, and the association of the same with antimicrobial agents such as metronidazole be used in a local way , simulating a " drug delivery " system. Therefore, we used 21 male mice, adult Wistar, which was surgically implanted in the animal's back biomaterials to be tested, then dividing the animals into three groups under observation periods of 7, 15 and 45 days. In each animal, three incisions were made, where the membranes were implanted following: latex membrane associated with metronidazole alone and latex membrane of polytetrafluoroethylene (PTFE) membrane . After the given time studies , 7 animals were euthanized on each of the periods , and the sample of the dorsal region of the animal collected for morphological and descriptive analysis , as well as the inflammatory pattern were compared by nonparametric Kruskal Wallis and Student Newman Keuls , and differences were considered statistically significant when $p < 0.05$. With the values obtained after 45 days there were no differences between the groups suggesting the biocompatibility of the latex membrane associated with metronidazole .

Keywords: guided tissue regeneration. Occlusive membrane. Natural latex. Metronidazole.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO/REVISÃO DE LITERATURA	8
2 OBJETIVOS	11
2.1 OBJETIVO GERAL	11
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	11
3 METODOLOGIA	12
3.1 LOCAL E GRUPOS DE ESTUDO	12
3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	12
3.3 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	13
3.4 PREPARO DAS PEÇAS E FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS .	16
3.4.1 Análise macroscópica	16
3.4.2 Análise morfológica	16
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	17
4 RESULTADOS	18
4.1. ANÁLISE MORFOLÓGICA	18
4.1.1. Período de 7 dias	18
4.1.2. Período de 15 dias	19
4.1.3. Período de 45 dias	20
4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA	21
5 DISCUSSÃO	26
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
ANEXO 1	33

1. INTRODUÇÃO/REVISÃO DE LITERATURA

A ciência dos biomateriais já algum tempo tem utilizado membranas como barreiras oclusivas com objetivo de impedir a proliferação de células epiteliais e conjuntivas para o interior do defeito ósseo provendo um tempo adicional para as células osteogênicas, cuja migração é mais lenta, repovoarem a área do defeito e, Carranza et al. (2004), as propriedades ideais que os biomateriais devem apresentar são: biocompatibilidade, manutenção do espaço, oclusividade celular, boas propriedades de manuseio e capacidade de absorção (MARTINS, R. et. al. 2010). As biomembranas podem ser classificadas como: permeáveis (permitem a troca de massa entre dois ambientes); e impermeáveis, se subdividindo ainda em absorvíveis, de curta, média e longa duração e as não absorvíveis estas as quais após o tratamento precisam ser removidas por meio de intervenção cirúrgica. Esses biomateriais têm ganhado um valoroso espaço dentro da prática cirúrgica, principalmente odontológica.

O procedimento de utilização de membranas para potencializar a formação óssea é denominado regeneração óssea guiada (ROG). É uma alternativa para contornar as dificuldades nos processos de reparo deste tecido em defeitos críticos (DAHLIN, 1994a; BOSCH, MELSEN E VARGERVIK, 1995; LUNDGREN E TAYLOR, 1998). A ROG baseia-se no princípio de seletividade celular, utilizando barreiras biológicas mecânicas para impedir a migração de células indesejadas e guiar a proliferação de células osteogênicas (SOUZA, 2010), possibilitando exclusão de células incompatíveis com a neoformação no repovoamento do leito, favorecendo a proliferação celular adequada e a cicatrização com o tecido compatível e desejável (DAHLIN ET AL.,1994b).

O látex natural, um dos materiais utilizados na fabricação dessas barreiras, teve sua eficiência comprovada a partir de estudos com o uso do filme de látex em forma de biomembrana (SADER, 2000; ALVES, 2003a; PINHO, 2003; BALABANIAN, 2006; ERENO, 2010a) que relataram as seguintes propriedades: biocompatibilidade, alta resistência mecânica além de apresentar elasticidade e baixo custo (MAZOCCO, 2002); e, segundo Alves et al. (2003b) pôde ser concluído que este, é capaz de acelerar a angiogênese. Outro biomaterial é a membrana de politetrafluoretileno (PTFE), que é uma substância praticamente inerte, apresentando

como características principais o baixo coeficiente de atrito, impermeabilidade, baixa aderência e ótima aceitabilidade pelo corpo humano. Garg (2004) relatou que algumas membranas de PTFE têm como vantagem, quando exposta à cavidade oral, não comprometer o processo de ROG.

Relacionando estes biomateriais com a odontologia, podemos citar a doença periodontal, que é causada pela infecção dos tecidos periodontais decorrente do acúmulo de placa bacteriana, que pode resultar na perda progressiva de tecido dentário, como: inserção conjuntiva e osso alveolar (AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 2000). Esse caráter destrutivo se dá pela presença de placa bacteriana supra e subgingival, que em resposta é gerado pelo hospedeiro um processo inflamatório, com produção de enzimas e mediadores químicos pró-inflamatório, tendo sua parcela na destruição tecidual (LINDHE, 1999).

A terapia mecânica com raspagem, polimento radicular e coronal, se torna um pré-requisito obrigatório para o restabelecimento contra a doença, contudo, pode haver uma recolonização de patógenos pós-tratamento (ADRIAENS, 1988). Para minimizar essa ocorrência, a utilização do metronidazol pela via sistêmica tem se demonstrado eficiente, atingindo periodontopatógenos residentes das bolsas periodontais (ROONEY, 2002).

A administração de antimicrobianos pela via sistêmica mostrou sua eficácia muito embora a concentração do mesmo se mantenha por um curto período de tempo no foco infeccioso após uma simples dose, e sendo a dose empregada passível de gerar alguns efeitos colaterais, tornando assim o tratamento sistêmico recomendado para a doença periodontal de progressão rápida ou refratária (MEDLICOTT et al., 1994). Consequentemente, a entrega de moléculas localmente e de forma controlada parece ser uma aplicação terapêutica vantajosa, no que diz respeito ao aumento do conforto, conveniência e aceitação pelos pacientes (PUTNEY & BURKE, 1998).

Conforme relatado por Valenza et al. (2009) uma variedade de agentes antimicrobianos tem sido utilizado com sucesso como terapia de suporte após o tratamento mecânico de remoção do biofilme em pacientes com doença periodontal, onde pode-se confirmar ação adjunta da amoxicilina e do metronidazol em pacientes que abrigavam *A. actinomycetemcomitans* e também *P. gingivalis*.

Segundo Reis et al. (2012), o uso de biomateriais antibacterianos tem se mostrado altamente importante no campo da ciência médica e odontológica, especialmente nos tratamentos odontológicos conservadores. O sistema de administração local de drogas em periodontia se mostrou efetivo, além de diminuir o risco de efeitos colaterais indesejáveis, quando comparado com a administração de altas doses sistêmicas, bem como a diminuição da resistência bacteriana.

A mucosa bucal apresenta muitas propriedades que a torna um atrativo local para a utilização de moléculas ou medicamentos de entrega local ou “*drug delivery*” quando comparada a pele, pela sua própria arquitetura tecidual, exibindo um extrato córneo reduzido, o que facilitaria a passagem de macromoléculas. Algumas das vantagens incluem evitar a primeira passagem pelo metabolismo e a anulação da eliminação pré-sistêmica no trato gastrointestinal (SHOJAEI et al., 2001).

Atualmente pesquisas são desenvolvidas com o intuito de incorporar certas substâncias a diversos produtos médicos e odontológicos, sendo a biomembrana de látex natural, que já se mostrou efetiva, *in vitro*, quando associada ao metronidazol, funcionando como um “*drug delivery*” (HERCULANO, 2010), termo que corresponde a uma forma de direcionar o medicamento ao seu local de ação específico, por meio de um carreador ou transportador, isto é, não são medicamentos comuns, estes são desenvolvidos para atuarem especificamente sobre o tecido alvo como no caso dos mais novos quimioterápicos sem prejudicar as células adjacentes (Vo, KASPER, & MIKOS, 2012).

Sendo assim, o presente trabalho se propõe a avaliar a biocompatibilidade *in vivo* da biomembrana de látex natural associada ao metronidazol, em implantes subcutâneos de ratos, visto a importância das membranas oclusivas para tratamentos de defeitos ósseos, principalmente aqueles originados pela progressão da doença periodontal, sendo a associação da mesma com antimicrobianos como o metronidazol a ser usado de maneira local, simulando um sistema tipo “*drug delivery*”. A avaliação da biocompatibilidade é uma das etapas que precede sua utilização em humanos, sendo esse o objetivo da presente pesquisa.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a biocompatibilidade da membrana de látex natural extraída da *Hevea brasiliensis* associada ao Metronidazol em implantes subcutâneos em ratos.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Análise do padrão da resposta inflamatória após o implante subcutâneo da membrana de látex associada ao metronidazol, através da experimentação animal e estudos morfológicos da região implantada.

3. METODOLOGIA

3.1 LOCAL E GRUPOS DE ESTUDO

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Sagrado Coração, segundo protocolo número CEP/USC 184/11, na data de 29 de setembro de 2011 (Anexo 1).

Para a realização do presente estudo foram utilizados 21 ratos adultos, machos (*Rattus norvegicus albinus*, variedade Wistar), obtidos do biotério central da Universidade Sagrado Coração (USC). Os animais estavam com aproximadamente três meses de idade e com peso médio de 300g. Durante todo o período experimental os mesmos foram mantidos em caixas plásticas, alimentados com ração sólida e água *ad libitum*, em ambiente com temperatura estável ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) e luz controlada com ciclos de 12 horas claro e 12 horas escuro. Os animais foram aleatoriamente distribuídos em três grupos, e em seguida submetidos aos procedimentos cirúrgicos para implantação subcutânea de membranas na região dorsal.

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Biotério da Universidade Sagrado Coração, na cidade de Bauru, São Paulo.

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Sob sedação geral, os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para implantação das membranas subcutânea na região dorsal. Utilizou-se três tipos de membranas, as quais foram distribuídas em 3 grupos com se segue (figura 1):

Grupo 1: Membrana de látex natural associada ao metronidazol;

Grupo 2: Membrana de látex natural

Grupo 3: Membrana de PTFE.

As membranas de látex natural agregada ao metronidazol foram preparadas em colaboração com Departamento de Física da FFCLRP-USP, sob coordenação de Profa. Dra. Angela Kinoshita e Prof. Dr. Oswaldo Baffa.

Após os períodos de observação de 7, 15 e 45 dias os animais foram eutanasiados com dose letal de anestésico geral. Foi coletada toda a área

subcutânea onde foram implantados os biomateriais para a realização da análise microscópica.

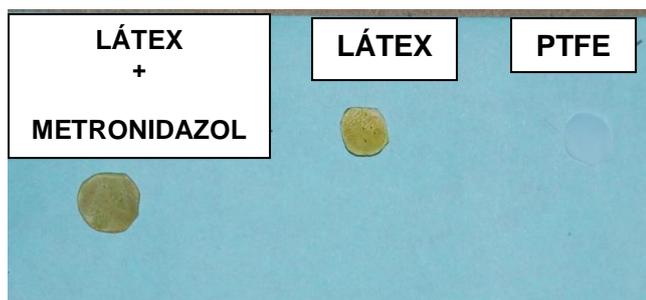


Figura 1: Membranas implantadas no dorso dos ratos.

3.3 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Para a realização do procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos à anestesia geral com administração pré-anestésica de relaxante muscular por via intramuscular (IM) de cloridrato de xilazina (Anasedan – Vetbrands, Jacareí - SP) 15 mg/kg de peso corpóreo, seguido pela administração intramuscular de anestésico geral de cloridrato de Ketamina (Dopalen – Vetbrands, Jacareí - SP) 90 mg/kg de peso corpóreo.

Após o início de ação da sedação foram realizados os procedimentos de tricotomia da região dorsal onde seriam implantadas as membranas (figura 2), posteriormente realizou-se a assepsia com gaze embebida em solução tópica de polivinilpíloridona-iodo (PVPI) a 1% (Povidine tópico, Johnson & Johnson, São Paulo, SP), montagem de campos cirúrgicos estéreis (figura 3). Em seguida realizou-se, no mesmo animal, três incisões na região dorsal de aproximadamente 8,0mm de comprimento, equidistantes entre si, duas dessas situadas mais ântero-superior, próximas da região cervical e a terceira situada abaixo da primeira ao lado direito do animal (figura 3 A, B e C).



Figura 2: Região dorsal a ser operada.

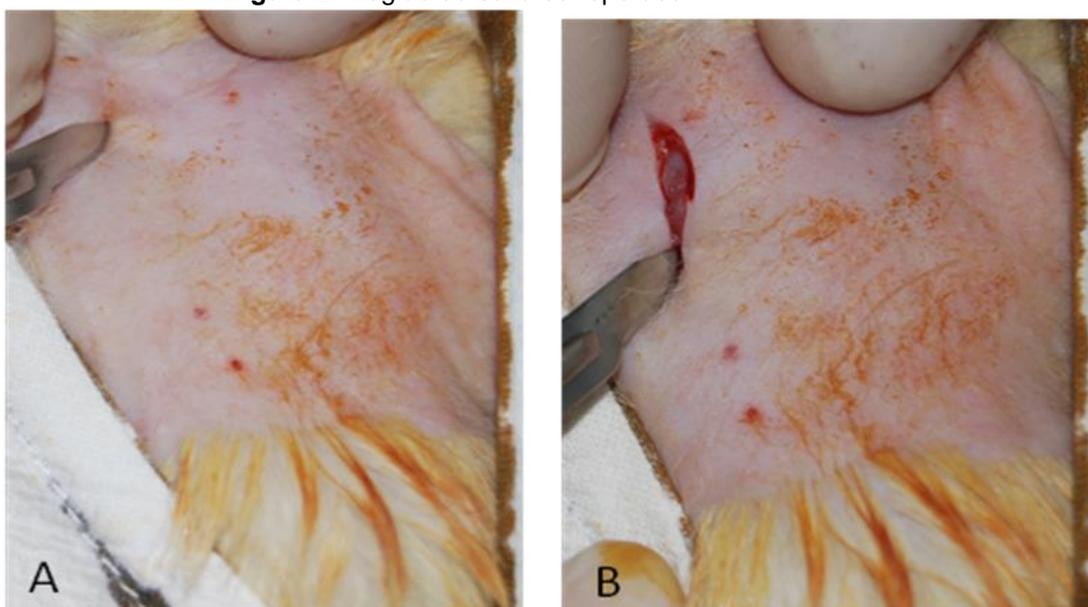


Figura 3: As imagens A e B mostram a incisão realizada para implantação das membranas. Em C os locais onde foram implantadas cada uma das membranas.

Logo após a incisão, procedeu-se a divulsão do tecido com tesoura romba para ter acesso ao plano subcutâneo do animal, onde realizou-se a implantação das membranas em questão, sendo que as membranas de látex associadas ao metronidazol foram implantadas na incisão superior esquerda do animal, a membrana de látex foi implantada na região superior direita do animal e finalmente a membrana de PTFE foi implantada na região inferior direita do animal (Figura 4 A e B), seguido finalmente da sutura da pele com fio de sutura de nylon 4-0 (Shalon, São Luis de Montes Belos, GO) (figura 5). Após os procedimentos cirúrgicos, como tratamento analgésico, foi administrado Dipirona sódica 500 mg (D-500 – Fort Dodge, Campinas – SP), 160mg/kg de peso corpóreo por via

Completados os períodos de estudo de 7, 15 e 45 dias os animais foram eutanasiados com dose letal de anestésico geral (Ketamina).

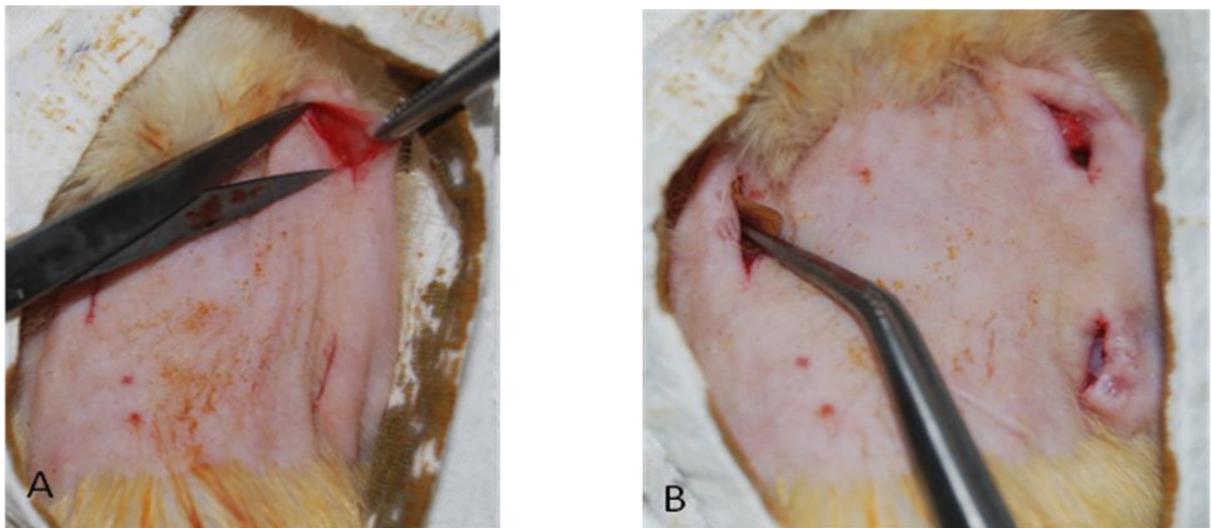


Figura 4: A) Divulsão do plano subcutâneo; B) Inserção das membranas no plano subcutâneo.



Figura 5: Sutura da pele.

3.4 PREPARO DAS PEÇAS E FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

3.4.1 Análise Macroscópica

Os espécimes foram coletados por dissecação do local operado (figura 6), com posterior fixação em solução de formalina tamponada a 10% (Merck, Darmstadt, Germany).



Figura 6: Imagem demonstrando pela área demarca a presença da membrana no plano subcutâneo.

3.4.2 Análise morfológica

Os espécimes identificados e acondicionados em frascos contendo solução de formalina tamponada a 10% por período de 48 horas. Posteriormente, os mesmos foram encaminhados para procedimento histotécnico de rotina.

Realizou-se cortes semi-seriados de 5 μ m de espessura de cada bloco, no sentido longitudinal utilizando-se micrótomo rotatório elétrico Leica RM.

Os métodos de coloração empregados foram o da hematoxilina-eosina de Harris (HE) seguindo-se os protocolos técnicos do Laboratório de Histologia da Universidade Sagrado Coração.

Analizou-se os cortes por microscopia de luz, e descritos em todas as suas peculiaridades. Foram selecionados e fotografados os dados mais relevantes no próprio microscópio.

Para a avaliação do padrão inflamatório, será adotado o procedimento recomendado por FDI (Federation Dentaire Internatiol), o mesmo utilizado por Gomes Filho et al., seguindo o score descrito na tabela 1.

Tabela 1: Scores da resposta inflamatória.

Resposta Inflamatória	Score
Ausente	0
Suave	1
Moderada	2
Severa	3

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os scores obtidos para a resposta tecidual dos dois grupos foram comparados pelo teste não paramétrico Kruskall Wallis e Student Newman Keuls, e as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1. ANÁLISE MORFOLÓGICA

A análise microscópica dos espécimes foi realizada considerando o tecido circundante ao espaço ocupado previamente pela membrana, em contato com a mesma.

4.1.1. Período de 7 dias

Com 7 dias a análise microscópica mostrou que a área previamente ocupada pela membrana de látex associado ao metronidazol encontrava-se circundada por uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso sustentado por uma camada mais espessa de tecido conjuntivo frouxo bem vascularizado. Notou-se a presença de um tecido de granulação infiltrado por leucócitos mononucleares. Esporadicamente pode-se observar a presença de células epitelióides e células gigantes do tipo corpo estranho. Já os espécimes que contavam com a presença da membrana de látex apenas, pode-se notar da mesma maneira que o grupo anterior a presença de uma capsula fibrosa que envolvia a biomembrana, permeada por tecido de granulação mononuclear cuja intensidade era moderada. Eventualmente observou-se a presença de células gigantes. Um tecido conjuntivo frouxo com a presença de muitos capilares sustentado a região de implante do biomaterial. Quando foi implantada a membrana de PTFE o espécime apresentou tecido de granulação circundando a área de implante da membrana e apoiado em um tecido conjuntivo de caráter frouxo de bem vascularizado (Figura 7).

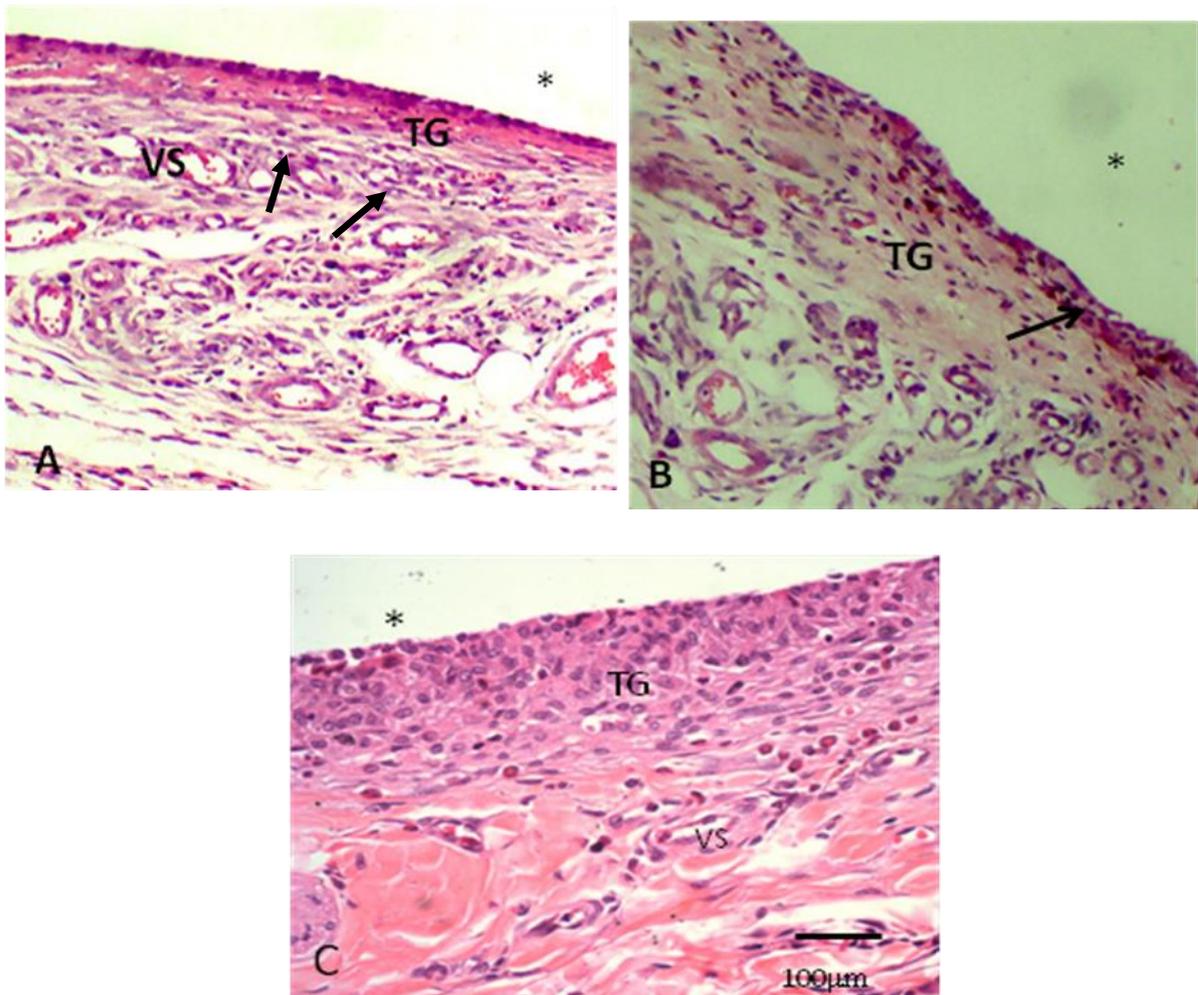


Figura 7 – A) Látex + Metronidazol - Tecido de granulação (TG) com moderado infiltrado inflamatório (setas) próximo à superfície do material (*); Objetiva: 100x B) Látex - Tecido de granulação (TG) permeando a membrana de látex (*) e tecido conjuntivo subjacente com muitos vasos sanguíneos (VS); Objetiva: 100x C) PTFE – I; Objetiva : 40x Coloração: Hematoxilina & Eosina (HE).

4.1.2. Período de 15 dias

Aos 15 dias do grupo tratado com a membrana de látex associada ao metronidazol, microscopicamente foi possível observar a área ocupada pela biomembrana encapsulada por um tecido conjuntivo denso e modelado, permeado por células inflamatórias mononucleares, onde observou-se a presença de macrófagos em contato com a região da membrana de látex, e circundando toda essa área um halo linfocítico estava presente associados a um conjuntivo frouxo bem vascularizado. Em alguns espécimes observou-se ainda a presença de células gigantes. O infiltrado inflamatório era de intensidade moderada. A cápsula que envolve a membrana de látex natural do grupo de mesmo nome mostrou-se com um infiltrado inflamatório que variava do discreto ao moderado. Era formada por um

tecido conjuntivo denso modelado, sobre um conjuntivo frouxo desorganizado e vascularizado, com presença de muitos fibroblastos. O infiltrado inflamatório era composto por células mononucleares e eventuais células gigantes (figura 8).

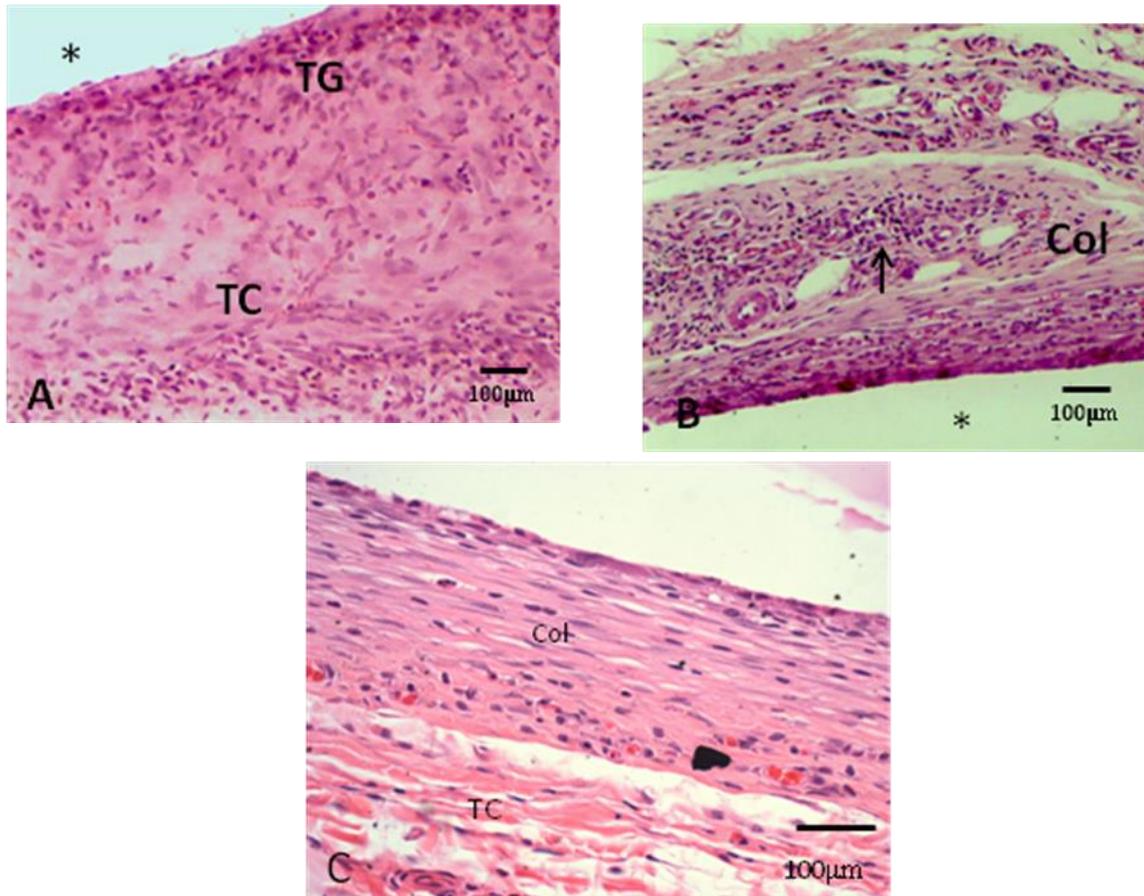


Figura 8 – A) Látex + Metronidazol - Tecido de granulação (TG) envolvendo a área ocupada pela membrana (*) e deposição da matriz colágena do tecido conjuntivo (TC); B) Látex – Formação de fibras colágenas permeando a membrana de látex (*), e persistência de infiltrado inflamatório mononuclear (seta); C) PTFE – I. Coloração: HE; Objetiva: 40x.

4.1.3. Período de 45 dias

Os espécimes de 45 dias do grupo látex associado ao metronidazol, apresentaram uma cápsula fibrosa envolvendo a membrana, cujo infiltrado inflamatório era de intensidade leve e de leve a moderado em alguns espécimes. O tecido conjuntivo circundante era denso, com a presença de fibroblastos em grande numero, e bem vascularizado. Neste mesmo período os espécimes pertencentes ao grupo de látex na cápsula fibrosa que envolvia o material, observou-se a persistência de infiltrado inflamatório mononuclear de intensidade moderada. Eventualmente

encontrou-se tecido degenerado em contato com o material. Matriz colágena em organização, com presença de fibroblastos em grande número. O grupo PTFE observou-se tecido conjuntivo frouxo em organização em contato com material birrefringente. Eventualmente notou-se a presenças de células gigantes multinucleadas. Ausência de tecido de granulação. Discreto infiltrado inflamatório mononuclear (figura 9).

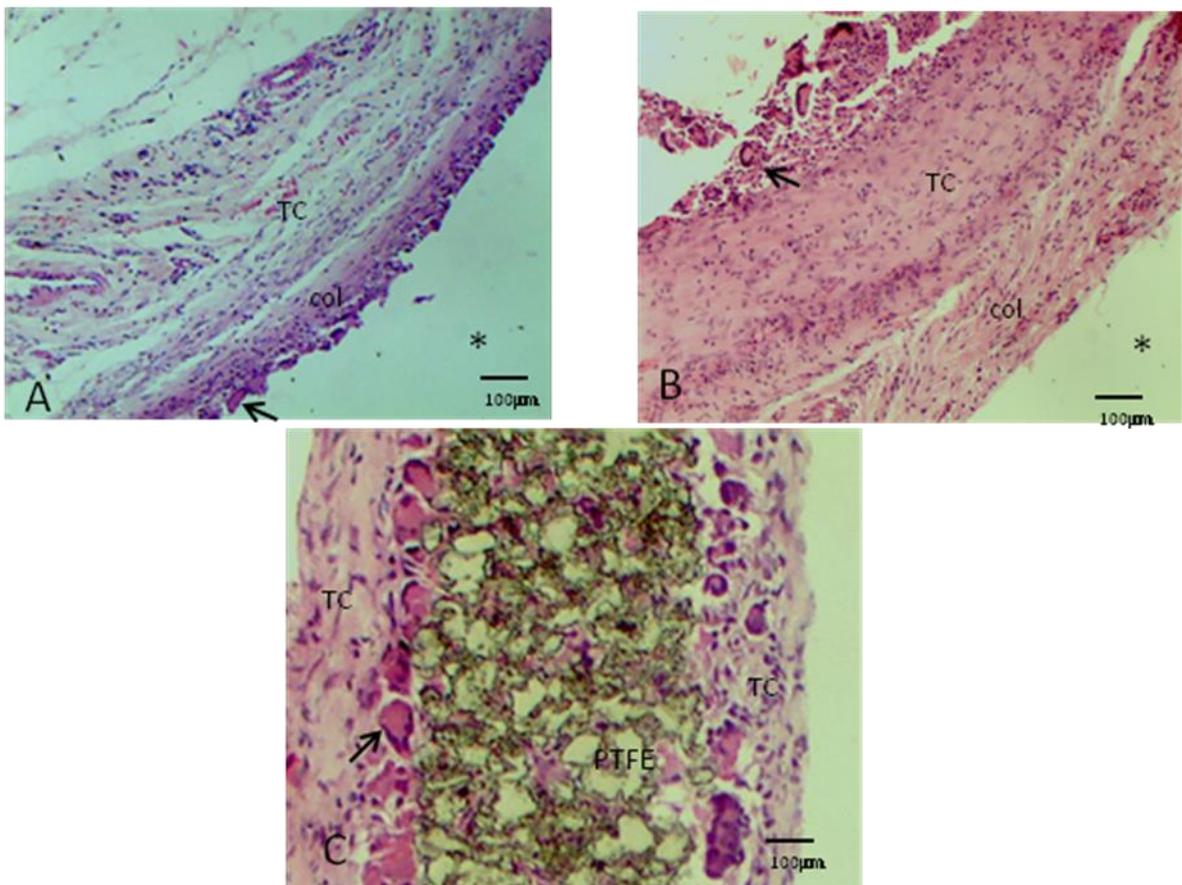


Figura 9 – A) Látex + Metronidazol – Área da membrana (*) circundada com tecido conjuntivo (TC) e uma capsula fibrosa com abundante fibras colágenas (Col) e presença de células gigantes tipo corpo estranho (seta B); Látex –fibras colágenas (Col) organizadas envolvendo a membrana de látex (*) e logo abaixo tecido conjuntivo (TC), nas setas, presença de células gigantes; Objetivas: 40x. C) PTFE – Membrana (PTFE) envolvida por cápsula fibrosa de tecido conjuntivo (TC) e em contato com células gigantes tipo corpo estranho (seta); objetiva: 100x. Coloração: HE.

4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As imagens foram analisadas quanto ao padrão de resposta inflamatória e classificadas em scores. Os resultados foram comparados com o teste Kruskal Wallis seguido de Student Newman Keuls e as diferenças foram consideradas

estatisticamente significantes quando $p < 0.05$. As tabelas 2, 3 e 4 mostram os resultados relativos aos períodos de 7, 15 e 45 dias. Para melhor visualização dos valores, a média dos scores está representada na figura 10.

Na comparação entre as respostas dos diferentes materiais, no período de 7 e 45 dias, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes nas respostas dos 3 materiais. No período de 15 dias, não há diferença entre os grupos Látex e Metronidazol e PTFE ($p < 0.05$)

Em relação à evolução temporal, há diferença estatisticamente significativa na resposta do Látex com Metronidazol em relação aos períodos de 7 e 45 dias, bem como nos períodos de 15 e 45 dias ($p < 0.05$).

Tabela 2: Classificação do infiltrado inflamatório de acordo com scores relativo ao período de 7 dias.

Amostra	Látex + Metronidazol	Látex	PTFE
1	3	2	2
2	2	2	2
3	2	2	2
4	2	2	2
5	1	2	2
6	2	2	2
7	2	2	2

0:ausente; 1:leve; 2:moderado; 3:intenso.

Tabela 3: Classificação do infiltrado inflamatório de acordo com scores relativo ao período de 15 dias.

Amostra	Látex + Metronidazol*	Látex	PTFE*
1	2	1	1
2	2	1	2
3	2	2	1
4	2	2	2
5	2	1	1
6	2	2	1
7	2	2	1

0:ausente; 1:leve; 2:moderado; 3:intenso

Tabela 4: Classificação do infiltrado inflamatório de acordo com scores relativo ao período de 45 dias

Amostra	Látex + Metronidazol	Látex	PTFE
1	1	1	1
2	1	1	1
3	1	2	0
4	0	2	2
5	1	1	1
6	1	1	1
7	1	1	1

0:ausente; 1:leve; 2:moderado; 3:intenso.

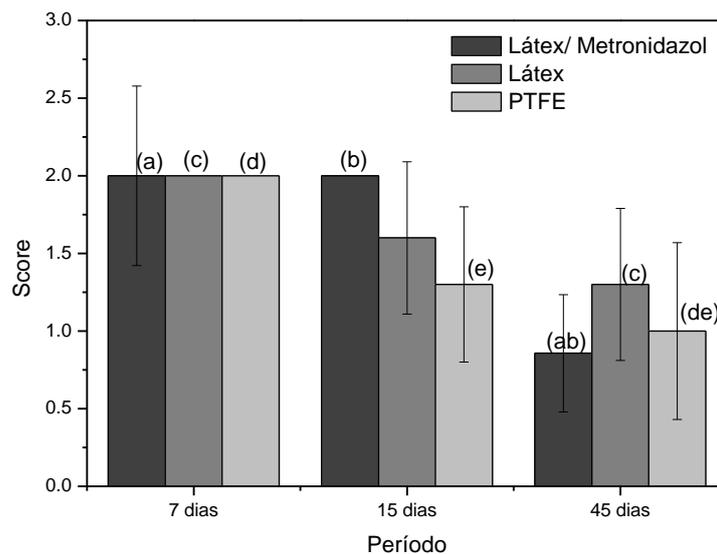


Figura 10: Média e desvio padrão dos scores atribuídos de acordo com o material e período de implante. Símbolos iguais representam diferenças estatisticamente significantes (a b c d e $p < 0.05$, Kruskal Wallis)

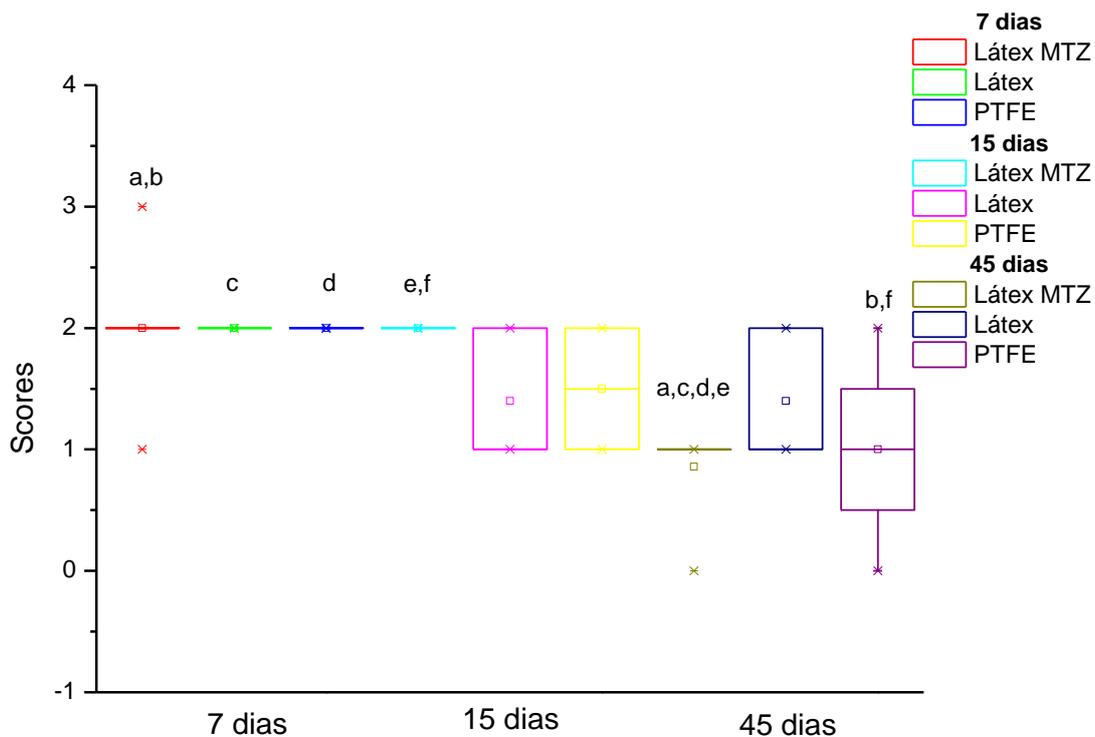


Figura 11: Diagrama boxplot dos scores atribuídos de acordo com o material e período de implante. Símbolos iguais representam diferenças estatisticamente significantes (a,b,c,d,e,f $p < 0.05$, Kruskal Wallis, Student-Newman-Keuls).

Interpretações:

- a: MTZ 45 dias < MTZ 7dias
- b: PTFE 45 dias < MTZ 7dias
- c: MTZ 45 dias < Látex 7 dias
- d: MTZ 45 dias < PTFE 7 dias
- e: MTZ 45 dias < MTZ 15 dias
- f: PTFE 45 dias < MTZ 15 dias

5. DISCUSSÃO

As técnicas de regeneração tecidual guiada nos dias presentes já se encontram bem elucidadas e consolidadas, visto seu alto benefício em promover a regeneração de determinado tecido sem a interferência de células indesejadas naquele meio. O processo de regeneração do tecido ósseo tornou-se cada vez mais beneficiado com essas técnicas, onde foi possível a promover a neoformação óssea pelo bloqueio à penetração de células epiteliais e do tecido conjuntivo e consequente povoamento do um defeito ósseo por células de caráter osteogênico.

O uso de membranas como guia para a regeneração óssea tem tomado um amplo espaço em práticas que envolvam procedimentos cirúrgicos e restauradores. Dentre eles podemos citar como exemplo, a colocação de implantes, ou regeneração periodontal; que visam um aumento na expectativa e qualidade de vida do paciente (BOTTINO et al., 2012).

No que diz respeito à tentativa de promover a neoformação de tecido ósseo de tecidos peridentais, é de grande importância e relevância a recuperar defeitos ósseos que normalmente são resultado principalmente pela reabsorção do periodonto de sustentação como consequência da doença periodontal, onde observa-se principalmente o aparecimento de bolsas periodontais, que é uma lesão que ocorre entre o dente e seu epitélio juncional, pela perda da aderência do mesmo junto ao órgão dentário, que decorre justamente em resultado a infecção de bactérias patogênicas localizadas abaixo da linha gengival (BROMBERG et al. 2001).

Uma crescente modalidade terapêutica que vem ganhando cada vez mais espaço dentro da área médica e odontológica é o sistema conhecido como “*drug delivery*” que consiste justamente na entrega focal de determinado agente, antimicrobiano por exemplo, que visa justamente reduzir e/ou eliminar efeitos indesejados e colaterais promovidos pela terapêutica medicamentosa (SCHWACH-ABDELLAOUI, 2000).

Dahlin et al. (1994c) em um modelo experimental, onde defeitos ósseos realizados no ângulo da mandíbula de ratos, que envolveram as duas faces no osso mandibular foi utilizado a membrana de e-PTFE para o recobrimento desses defeitos, sendo que ocorreu a completa regeneração óssea dos osso mandibular em

12 dos 13 animais envolvidos no estudo. Ereno et al. (2010) utilizou a membrana de látex natural (*Hevea brasiliensis*) como membrana oclusiva em defeitos criados em calota de coelho, concluindo que a mesma obteve sucesso quando usada como barreira oclusiva na regeneração óssea.

Em um estudo em humanos para a realização de uma neovaginoplastia, procedimento cirúrgico que visa corrigir a agenesia vaginal, Carvalho et al. (2007) utilizou um molde de látex natural como uma modificação à técnica de neovaginoplastia original que visa o revestimento da neovagina com enxerto de pele abdominal.

Um grande desafio dentro da pesquisa de novos materiais é a busca incessante por novos materiais que sejam reconhecidos como componentes das estruturas dos organismos e não como agentes agressores, ou seja, um material biocompatível. Para que esse evento ocorra, o biomaterial deve exibir características como: não desencadear respostas exacerbadas do sistema de defesa do hospedeiro, não causar reação inflamatória aos tecidos circunvizinhos, não hemolisar células sanguíneas e não liberar substâncias tóxicas (MASTRANTONIO, 2003).

Os resultados do presente trabalho evidenciaram durante o período de estudo de sete dias características muito semelhantes entre o grupo da membrana de látex e o grupo da membrana de látex associado ao metronidazol que foram o grupo teste, bem como o grupo PTFE (controle). Houve um processo inflamatório compatível como o período em questão com a presença de tecido de granulação envolvendo todo a área ocupada pelas membranas, com a presença de células inflamatórias mononucleares e eventuais células do tipo corpo estranho. Não se observou tecido em degeneração.

Aos 15 dias propostos como período de experimentação, os resultados deste trabalho foram semelhantes aos encontrado por Yamatogi et al. (2005) que utilizou membranas de origem bovina na região subcutânea de ratos, onde pode-se observar na superfície externa da membrana uma densa capsula fibrosa que envolvia todo o implante e presença, com o diferencial que o autor supracitado encontrou inúmeras células gigantes em seus achados. Ainda em nosso trabalho observou um menos infiltrado inflamatório nos implantes de PTFE, membrana de látex apenas e membrana de látex associado ao metronidazol, respectivamente.

Resultados interessantes foram observados no período final de experimentação (45 dias), em que foi possível constatar diferenças significativas entre os períodos de 7, 15 e 45 dias da membrana de látex associados ao metronidazol quando analisado o padrão inflamatório o que nos fornece dados importantes quanto ao comportamento da membrana de látex quando a mesma se encontrava associada ao metronidazol.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseado nos resultados do presente trabalho, de acordo com a metodologia empregada podemos concluir que a membrana de látex natural associado ao metronidazol teve um comportamento biológico bem aceito pelo tecido conjuntivo no dorso de ratos, com uma resposta do padrão inflamatório semelhante quando comparado à membrana de látex natural apenas e à membrana de PTFE.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIAENS, P. A. Bacterial invasion in root cementum and radicular dentin of periodontally diseased teeth in humans. **Journal Periodontology**, p. 222-230, 1988.

ALVES, M.C.O. **Teste da angiogênese estimulada por membrana de látex natural**. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras – USP, Ribeirão Preto, 2003.

AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. The role of controlled drug delivery for periodontitis. **Journal of Clinical Periodontol.**, Chicago, v. 71, p. 125-140, 2000.

BALABANIAN, C. A. C. A. et al. Biocompatibility of natural latex implanted into dental alveolus of rats. **Journal of Oral Science**, V. 48 (N. 4), p. 201-205, 2006.

BOSCH, C; MELSEN, B; VARGERVIK, K. Guided Bone Regeneration in Calvarial Bone Defects Using Polytetrafluoroethylene Membranes. **Cleft Palate Craniofac J. Denmark**, v. 32: p. 311-17, 1995.

BOTTINO, M. C. et al. Recent advances in the development of GTR/GBR membranes for periodontal regeneration - A materials perspective. **Dental Materials**, v. 28, p. 703-721, 2012.

BROMBER, L. E. et al. Novel periodontal drug delivery system for treatment of periodontitis. **Journal of Controlled Release**, v. 71, p. 251-59, 2001.

CARRANZA, A.F. et al. **Periodontia Clínica**. 9.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2004.

CARVALHO, B. R. et al. Molde de látex natural (*Hevea Brasiliensis*) para neovaginoplastia. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 30, n. 1, p. 31-35, 2007.

DAHLIN. Restauration of mandibular nonunion bone defects. An experimental study in rats using an osteopromotive membrane method. **Journal Oral Maxillofac Surg.**, v. 23, p. 237-242, 1994.

ERENO, C. et al. Latex use as an occlusive membrane for guided bone regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research A**, v. 95A, p. 932-939, 2010.

GARG, A.K. **Bone – Biology, Harvesting, Grafting for Dental Implants**, Illinois, Quintessence Publishing Co, Inc, 2004.

GOMES-FILHO, J. E. et al. Evaluation of alveolar socket response to Angelus MTA and experimental light-cure MTA. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 110, n. 5, p.e93-e9.

HERCULANO, R. et al. Metronidazole release using natural rubber latex as matrix. **Materials Research.**, p. 57-61, 2010.

LINDHE, J. Tratado de periodontia clínica e implantologia oral. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

LUNDGREN, A; LUNDGREN, D; TAYLOR, A. Influence of barrier occlusiveness on guided bone augmentation. An experimental study in the rat. **Clin Oral Implants Res.** v. 9, p. 251-260, 1998.

MARTINS, R. et al. Comparative study of bone response guided tissue regeneration technique - macroscopic evaluation. **Part 1. Dentistry in Science.** p. 224-30, 2010.

MASTRANTONIO, S. S.; RAMALHO, L. T. O. Resposta do tecido conjuntivo de camundongos ao poliuretano vegetal de óleo de mamona. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 32, n. 1, p. 31-37, 2003.

MAZOCCO, F. et al. Látex extraído da seringueira é utilizado com sucesso na medicina. **Tecnologia, Brasil**, p.58-61, 2002.

MEDLICOTT, N. J. et al. Delivery systems for the administration of drugs to the periodontal pockets. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 13, p. 181-203, 1994.

PINHO, E. et al. Uso experimental da biomembrana de látex na reconstrução conjuntival. **Arquivo Brasileiro Oftalmológico**, p. 27-32, 2004.

PUTNEY, S. D.; BURKE, P.A. Improving protein therapeutics with sustained-release formulations. **Nat. Biotechnol**, v. 16, p. 153–157, 1998.

ROONEY, J. et al. Adjunctive effects to non-surgical periodontal therapy of systemic metronidazole and amoxicillin alone and combined. A placebo controlled study. **Journal Clinic Periodontology**, p. 342-350, 2002.

SADER, S.L. et al. Substituição parcial do pericárdio de cães por membrana de látex natural. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, Brasil. 15: p. 338-44, 2000.

SCHWACH-ABDELLAOUI, K. et al. Local delivery of antimicrobial agents for the treatment of periodontal disease. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 83-99, 2000.

SHOJAEI, A. H. et al. Systemic drug delivery via the buccal mucosal route. **Pharm. Technol**, p. 70–81, 2001.

SOUZA, H.P. **Regeneração óssea guiada (ROG) com membranas absorvíveis e não absorvíveis**. Montes Claros, MG. INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE. Faculdades Unidas do Norte de Minas. SOEBRÁS GAPO-GRUPO DE APOIO À PESQUISA ODONTOLÓGICA, 2010.

VALENZA G, VEIHELMANN S, PEPLIES J, TICHY D, ROLDAN-PAREJA MDEL C, SCHLAGENHAUF U, VOGEL U. Microbial changes in periodontitis successfully treated by mechanical plaque removal and systemic amoxicillin and metronidazole. **Int J Med Microbiol**. 2009 Aug; 299(6):427-38.

VO, T. N., KASPER, F. K., & MIKOS, A. G. Strategies for controlled delivery of growth factors and cells for bone regeneration. **Advanced Drug Delivery Reviews.**, p. 1-18, 2012.

YAMATOOGI, R. S. et al. Histologia da associação de membranas biológicas de origem bovina implantadas no tecido subcutâneo de ratos. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 837-842, 2005.

ZHANG, JC; HUANG, C; XU, Q; MO, AC; LI JD; ZUO, Y. Biological properties of a biomimetic membrane for guided tissue regeneration: a study in rat calvarial defects. **Clin. Oral Impl. Res**. 2010; 21: 392–97.

ANEXO 1

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Protocolo n.º 184/11

Título do Projeto:

AVALIAÇÃO DA BIOCMPATIBILIDADE DA MEMBRANA DE LÁTEX NATURAL ASSOCIADA AO METRONIDAZOL IMPLANTADA EM TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS

Pesquisador (a) Responsável: LEANDRO ANDRADE HOLGADO

Comitê de Ética:

O CEP analisou, baseado em parecer competente, o presente projeto e o considerou aprovado.

Data: 29/9/2011

Assinatura do Presidente:

