

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

KARLA VERONES MASSARI

**REAÇÃO TECIDUAL APÓS IMPLANTE SUBCUTÂNEO
DE UM BIOMATERIAL COMPOSTO POR CELULOSE
BACTERIANA INCORPORADO A HIDROXIAPATITA**

BAURU
2014

KARLA VERONES MASSARI

**REAÇÃO TECIDUAL APÓS IMPLANTE SUBCUTÂNEO
DE UM BIOMATERIAL COMPOSTO POR CELULOSE
BACTERIANA INCORPORADO A HIDROXIAPATITA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração como parte dos requisitos para obtenção do título de Cirurgião Dentista em Odontologia, sob orientação da Prof. Dra. Angela Mitie Otta Kinoshita.

BAURU
2014

Massari, Karla Verones.

M4149r

Reação tecidual após implante subcutâneo de um novo biomaterial composto de celulose bacteriana incorporada a hidroxiapatita / Karla Verones Massari -- 2014.

56f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Angela Mitie Otta Kinoshita.

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

1. Celulose Bacteriana. 2. Hidroxiapatita. 3. Bicompatibilidade.
4. Reação Tecidual. 5. Resposta Inflamatória. I. Kinoshita, Angela
Mitie Otta. II. Título.

KARLA VERONES MASSARI

**REAÇÃO TECIDUAL APÓS IMPLANTE SUBCUTÂNEO DE UM
BIOMATERIAL COMPOSTO POR CELULOSE BACTERIANA
INCORPORADO A HIDROXIAPATITA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração como parte dos requisitos para obtenção do título de Cirurgião Dentista em Odontologia, sob orientação da Profa. Dra. Angela Mitie Otta Kinoshita.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Angela Mitie Otta Kinoshita
Universidade do Sagrado Coração

Profa. Dra. Marcia Rodrigues de Moraes Chaves
Universidade do Sagrado Coração

Prof. Dr. Jordan Lima da Silva
Universidade do Sagrado Coração

Bauru, 17 de Novembro de 2014.

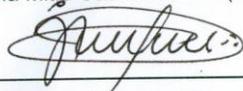
ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Ata de Defesa do Trabalho de Conclusão de Curso em Odontologia de Karla Verones Massari.

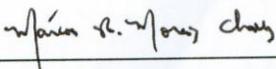
Ao dia dezessete de novembro de dois mil e quatorze, reuniu-se a banca examinadora do trabalho apresentado como Trabalho de Conclusão de Curso em Odontologia de KARLA VERONES MASSARI, intitulado: **“Reação tecidual após implante subcutâneo de um novo biomaterial composto por celulose bacteriana incorporado a hidroxiapatita.”** Compuseram a banca examinadora os professores Dra. Ângela Mitje Otta Kinoshita (orientadora), Dr. Jordan Lima da Silva e Dra. Marcia Rodrigues de Moraes Chaves. Após a exposição oral, a candidata foi arguida pelos componentes da banca que se reuniram, e decidiram, aprovar, com a nota 10,0 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.



Dra. Ângela Mitje Otta Kinoshita (Orientadora)



Dr. Jordan Lima da Silva (Avaliador 1)



Dra. Marcia Rodrigues de Moraes Chaves (Avaliador 2)

Dedico esse trabalho primeiramente à Deus, à minha família e em especial aos meus pais que fizeram de tudo para que esse sonho se tornasse realidade, e que estiveram do meu lado em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à Deus por ter chegado onde cheguei e ter me dado forças o suficiente para essa conquista.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Angela Mitie Otta Kinoshita, pela confiança em mim depositada, pela paciência e dedicação em todos os momentos.

Aos meus pais Luiz Carlos e Silvana, que são os meus grandes maiores exemplos de vida, de honestidade, de força e sem eles nada disso seria possível, Deus os proteja sempre.

Ao meu irmão Danilo, por sempre me apoiar, por ser tão presente em minha vida me ajudando nos momentos mais difíceis e estando ao meu lado sempre.

Patrícia, por ser uma grande amiga e também ter compartilhado dos meus momentos de felicidade em parte dessa caminhada.

Aos meus amigos Júlia, Flaviana, Juliana, Tathiana, Gabriela, Wilson, Tex por terem participado diretamente ou indiretamente na minha conquista, sempre estando presentes nos melhores momentos.

Ao Gilberto, por todo apoio nesse trabalho, por todo companheirismo durante essa jornada de pesquisa e na vida acadêmica também, desejo todo sucesso.

À minha grande amiga Mariana Marques, por todos os momentos que passamos juntas, que sempre esteve ao meu lado, obrigada por todo companheirismo, por todo o seu incentivo, sua incansável disposição, ajuda e paciência, à você serei eternamente grata, e levo comigo não só uma amizade, mas muito aprendizado envolvido, pois acredito que sozinhos não se vai muito longe, e você sempre esteve aqui mostrando que realmente isso faz sentido. Que Deus te guie, te ilumine sempre.

À Prof^a Dr^a Márcia Rodrigues de Moraes Chaves que disponibilizou o material para esse trabalho e foi uma grande colaboradora para que tudo desse certo.

Ao Wilson (Laboratório de Biologia Molecular) por toda paciência e ajuda nas imagens.

À Máira, que sempre esteve a disposição preparando as lâminas, e sem ela não seria possível obter os resultados.

Eliane, que sempre se disponibilizou para ajudar no que fosse preciso.

À Profa Dra. Dulce Constantino e Alexandre e Dayvid do biotério, que sempre estiveram disponíveis para o que fosse preciso e colaboraram bastante com esse projeto.

Ao Prof Dr. Jordan Lima da Silva, por ter nos disponibilizado um tempo, para ensinar toda parte cirúrgica desse trabalho, nos permitindo assim ficarmos mais confiantes na hora de realizá-la.

Ao Prof Alcides Leão da UNESP – Botucatu por disponibilizar a membrana para que essa pesquisa fosse possível.

À todos os professores que fizeram parte dessa etapa, dando toda base, suporte e confiança na vida acadêmica.

À FAPESP pela bolsa concedida.

“Cada pessoa que passa por nossas vidas é única, sempre deixa um pouco de si e leva um pouco de nós. Esta pessoa é a maior responsabilidade de nossas vidas e prova evidente de que as pessoas não se encontram por acaso.”

(Antonie de Saint Exupérie)

RESUMO

Um biomaterial que vem sendo estudado para compor substitutos ósseos é a celulose bacteriana (CB). A CB é obtida principalmente de culturas de bactérias Gram-negativas como *Acetobacter xylinum* (*Gluconacetobacter xylinus*). Apresenta alto módulo de elasticidade e de tensão, além da alta cristalinidade devido às nanofibras em rede tridimensional, presentes na sua estrutura. A grande quantidade de grupos hidroxila na superfície da CB permite a síntese de nanopartículas. Com isso, nanopartículas de hidroxiapatita (Hap) tem sido sintetizadas na matriz de CB, constituindo-se assim, um novo biomaterial CB/HAp que pode ser usado como substituto ósseo. Uma das primeiras etapas de testes de novos materiais para uso clínico são os testes de bicompatibilidade. Dentre esses, a resposta tecidual frente ao implante subcutâneo fornece importantes informações sobre a resposta geral do organismo através do padrão inflamatório observado. Dessa forma, o estudo da resposta tecidual desse novo biomaterial faz-se necessário e de grande valia para futuras aplicações como substitutos ósseos para procedimento de reconstrução óssea. Foram utilizados 18 ratos machos (*Rattus norvegicus*, *Wistar*) os quais sofreram, cirurgicamente, 3 incisões no dorso do animal para implante subcutâneo dos materiais a serem testados: CB, CB/Hap e PTFE (Politetrafluoretileno) material comercial, comprovadamente biocompatível. Após período de 7,15 e 60 dias, 6 animais foram submetidos a eutanásia, e a reação tecidual analisada microscopicamente, observando a presença de necrose, de cápsula fibrosa, células inflamatórias. Foram registradas 6 imagens de cada lâmina, nas quais foram contabilizadas a quantidade de células mononucleares, poliformonucleares e células gigantes, bem como a presença da cápsula fibrosa. Os dados quantitativos foram avaliados de acordo com um score pré-estabelecido e a comparação dos resultados foi realizado pelo teste não paramétrico Kruskal Wallis e foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0.05$. Não foram encontradas diferenças no padrão inflamatório dos materiais CB e CB/Hap em relação ao PTFE ($p > 0,05$) sugerindo que CB e CB/Hap podem ser utilizados como biomateriais.

Palavras-chave: Celulose Bacteriana. Hidroxiapatita. Bicompatibilidade. Reação tecidual. Resposta inflamatória.

ABSTRACT

A biomaterial that has been studied to compose bone substitutes is bacterial cellulose (BC). BC is mainly obtained from cultures of gram-negative bacteria such as *Acetobacter xylinum* (*Gluconacetobacter xylinus*). Has a high modulus of elasticity and tension, in addition to high crystallinity due to the three-dimensional nanofiber present in its network structure. A large amount of hydroxyl groups on the surface of BC allows the synthesis of nanoparticles. Thus, nanoparticles of hydroxyapatite (Hap) has been synthesized in the BC matrix, forming a new biomaterial BC/Hap that can be used as a bone substitute. One of the first steps for testing of new materials for the medical applications are biocompatibility tests. Among them, the tissue response to subcutaneous implantation provides important information about the general response of the body through the inflammatory pattern. Thus, the study of tissue response of this new biomaterial is necessary and valuable for future applications as bone substitutes for bone reconstruction procedures. Eighteen male rat (*Rattus norvegicus*, *Wistar*) were used, in which 3 incisions in the back were surgically made for subcutaneous implantation of materials to be tested: BC, BC/Hap and PTFE (polytetrafluoroethylene) a commercial biocompatible material. After 7, 15 and 60 days, 6 animals were submitted to euthanasia, and tissue reaction examined macroscopically and microscopically by observing the presence of necrosis, fibrous capsule and inflammatory cells. Six images of sample were examined, in which the amount of mononuclear, polymorphonuclear and giant cells were accounted as well as the presence of fibrous capsules. Quantitative data were evaluated according to a predetermined score and the comparison of the results was performed by the nonparametric Kruskal Wallis test and were considered statistically different when $p < 0.05$. No differences were found in the inflammatory pattern produced by BC and BC/Hap compared to PTFE ($p > 0.05$), suggesting that BC and BC/Hap can be used as biomaterials.

Keywords: Bacterial Cellulose. Hydroxyapatite. Biocompatibility. Tissue reaction. Inflammatory response.

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	14
3 METODOLOGIA.....	15
3.1 LOCAL E GRUPOS DE ESTUDO.....	15
3.2 MEMBRANAS DE CB E CB/HAP.....	16
4.1 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	25
4.1.1 Anestesia e Assepsia	25
4.1.2 Técnica cirúrgica	26
4.2 Remoção e preparo das peças.....	29
4.2.1 Análise Macroscópica	30
4.2.2 Análise Microscópica	30
5 RESULTADOS.....	33
5.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA.....	33
5.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA.....	34
5.3 MORFOMETRIA	37
5.3.1 Comparação entre os materiais em cada período.....	38
6 DISCUSSÃO	46
REFERÊNCIAS*	49
ANEXO I.....	51

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Membrana de Celulose Bacteriana sintetizada	17
Figura 2 - Estufa(MD1.3Medicate).....	18
Figura 3- Membrana na estufa em processo de secagem.	18
Figura 4- Membrana CB com massa inicial.....	19
Figura 5- Membrana CB com massa final depois da secagem.....	19
Figura 6 - Membranas recortadas em fragmentos.....	20
Figura 7- CB pronta para o processo de deposição de hidroxiapatita.....	21
Figura 8 - Solução de Cloreto de Calcio.....	22
Figura 9 - Shaker.....	22
Figura 10 - Membrana sendo pesada em uma balança analítica e recortada.....	23
Figura 11 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura.....	24
Figura 12 - Mapa da distribuição de Carbono, Cálcio e Fósforo.....	25
Figura 13 - Espectro EDS de CB.....	25
Figura 14 - Anestésico geral e relaxante muscular que foram utilizados na cirurgia.....	27
Figura 15 - Tricotomia realizada no dorso do rato.....	27
Figura 16 - Incisão,divulsão e implantação das membranas	28
Figura 17 - Biomateriais esterilizados por meio de radiação gama.....	28
Figura 18 - Cloridrato de Lidocaína e Tiopental.....	30
Figura 19 - Peça cortada no sentido transversal no local da membrana.....	31
Figura 20 - Áreas selecionadas para contagem de células.....	32
Figura 21 - Programa ImageJ.....	33
Figura 22 - Materiais sendo localizados na região subcutânea.....	34
Figura 23 - Membrana de CB, PTFE e CBHap após o implante	35
Figura 24 - Membranas de celulose bacteriana 7 dias após implantação.....	36

Figura 25 - Membranas de celulose bacteriana 15 dias após implantação.....	36
Figura 26 - Membranas de celulose bacteriana 60 dias após implanta.....	36
Figura 27 - Imagens ampliadas de CB, PTFE e CBHap.....	37
Figura 28 - Gráfico Box Plot do número de células inflamatórias 7 dias.....	39
Figura 29 - Gráfico Box Plot do número de células inflamatórias 15 dias.....	40
Figura 30 - Gráfico Box Plot do número de células inflamatórias 60 dias.....	41
Figura 31 - Gráfico Box Plot do número de células inflamatórias mononucleares encontradas.....	43
Figura 32 - Gráfico Box Plot do número de células inflamatórias polimorfonucleares encontradas.....	45

1 INTRODUÇÃO

Os defeitos ósseos podem decorrer de cirurgias oncológicas, infecções agudas ou crônicas, traumas ou malformações congênitas. Os defeitos de maior amplitude, também chamados de defeitos de dimensão crítica, representam um grande desafio na terapia regenerativa e reconstrutiva⁽¹⁾ e normalmente requerem o uso de substitutos ósseos e/ou outros tratamentos para sua reparação. Os enxertos tradicionais incluem os autógenos, quando transplantado de um local a outro no mesmo indivíduo, os alógenos, quando transplantados entre indivíduos da mesma espécie porém geneticamente diferentes e em xenógenos, quando obtidos de um doador de outra espécie^(2,3). Todos apresentam vantagens e desvantagens, sendo que os autógenos nem sempre estão disponíveis, causam dor pós cirúrgica adicional e os alógenos e xenógenos podem ser rejeitados. Sendo assim, diversas pesquisas tem sido conduzidas na última década na busca de materiais alternativos que mimetizam a osso. A engenharia tecidual óssea basea-se no uso de substitutos sintéticos que possam restaurar e manter a fisiologia óssea.⁽⁴⁾

O tecido ósseo é composto de uma matriz de colágeno reforçada por cristais de Hidroxiapatita (HAp). Diversos biomateriais como colágeno, celulose e quitosana são usados como 'molde' para controlar a distribuição dos cristais de apatita a fim de que adquiram a mesma estrutura da encontrada no osso. Nesse contexto, a celulose bacteriana (CB) tem atraído a atenção por ser um material renovável, já que é produzido pela fermentação de bactérias, como a *Gluconacetobacter xylinus*.⁽⁵⁾⁽⁶⁾ É formada por uma rede tridimensional de nanofibras de celulose e apresenta alto coeficiente de elasticidade e de tensão. A grande quantidade de grupos hidroxila na superfície da CB permite a síntese de nanopartículas. Com isso, diversas pesquisas tem sido conduzidas para sintetizar nanopartículas de HAp na rede tridimensional da CB para serem utilizados como substitutos ósseos.^(7,8)

Os biomateriais se destacam por ser, possivelmente, a alternativa mais versátil e passível de desenvolvimento entre todas as outras.⁽⁶⁾

O conceito de que todo e qualquer material que fosse totalmente inerte no organismo seria biocompatível, foi reconsiderado a partir do momento em que se percebeu que qualquer tipo de material sempre desencadeia uma resposta do tecido hospedeiro, representada pela formação de cápsula fibrosa ao redor do implante. Além disso, observou-se que, para certas aplicações, havia necessidade de alguma forma de interação entre o tecido hospedeiro e o material, que em determinadas situações seria mais importante para a satisfatória atuação do implante.

Os testes de toxicidade para avaliação dos efeitos biológicos dos biomateriais dentários são divididos em três grupos, correspondendo aos testes primário (nível I), secundário (nível II) e de uso pré-clínico (nível III) que compreendem respectivamente as análises de citotoxicidade e potencial irritante; de toxicidade; e de testes de uso pela observação das reações teciduais após a inserção do material em dentes humanos. Os testes de nível I podem ser feitos tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Nos testes *in vitro* avaliam-se as propriedades do material diretamente em cultura de células que reagem aos efeitos dos produtos analisados. Os testes *in vivo* baseiam-se principalmente na implantação subcutânea, intramuscular ou óssea dos materiais em animais (ratos, coelhos, etc). Após diferentes períodos pós-implante do material no tecido (que varia de semana a meses), o tecido adjacente é analisado macroscopicamente e microscopicamente. Nos primeiros períodos pós-implante, a resposta inflamatória é a principal característica a ser analisada, em longo prazo, a natureza e a quantidade de encapsulamento fibroso é avaliado. ⁽⁹⁾

A inflamação é uma reação dos tecidos a um agente agressor caracterizada morfológicamente pela saída de líquidos e de células do sangue para o interstício. Pode ser conceituada como um conjunto de fenômenos bioquímicos, morfológicos e fisiológicos, pelos quais se exterioriza a reação vascular e tissular dos tecidos vivos á qualquer agressão. Se não existisse o processo inflamatório os microrganismos estariam livres para penetrar nas mucosas e feridas, comprometer de tal forma o organismo hospedeiro que fatalmente o mataria e então não existiria cicatrização e reparação das lesões.⁽¹⁰⁾ O processo inflamatório visa eliminar a causa da agressão e induzir a reparação de células e tecidos mortos por células sadias.

O desenvolvimento e, resolução do processo inflamatório serão responsáveis pelo grau de sucesso do procedimento. O grau de sucesso na implantação de um biomaterial pode ser associado em alguns casos, por exemplo, à severidade do processo inflamatório desencadeado, ao nível de satisfação do paciente, ao tempo necessário para o estabelecimento das atividades básicas do paciente, ao tempo de permanência do implante no corpo, entre outros.⁽⁶⁾

O processo de cicatrização envolve uma complexa seqüência de eventos celulares e bioquímicos com o objetivo de restaurar a integridade tecidual após o trauma. Este processo caracteriza-se pela homeostase, inflamação, formação de tecido de granulação, reepitelização e remodelação da matriz extracelular.⁽¹⁰⁾ Durante a fase inflamatória, a migração de células como neutrófilos, linfócitos e macrófagos é fundamental para regular o processo de reparação, pois secretam citocinas, linfocinas e fatores de crescimento, que atuam como sinalizadores moleculares. Os neutrófilos são as primeiras células recrutadas, aparecendo aproximadamente 24 horas após a lesão, com funções de fagocitose e debridamento. Os macrófagos migram ao local da ferida em cerca de 48 a 96 horas, tornando-se a população celular predominante antes da migração e proliferação dos fibroblastos. Sua ação antimicrobiana ocorre devido à geração de radicais livres, como óxido nítrico e peróxido de hidrogênio. Uma importante contribuição dos macrófagos para o processo cicatricial é a secreção de citocinas e ativação de enzimas pró-inflamatórias, que ativam e recrutam outras células envolvidas no processo cicatricial como outros macrófagos e linfócitos, regulam a quimiotaxia e a proliferação de fibroblastos, promovem a síntese de colágeno, além de estimular a migração de células endoteliais, também envolvidas no processo de reparação tecidual.^(11,12) Depois ocorre a migração e proliferação dos fibroblastos que são células predominantes do tecido conjuntivo e tem como principal função a manutenção da integridade do tecido pela síntese dos elementos da matriz extracelular, compactação das fibras colágenas, produção de elastina, fibronectina, glicosaminoglicanas e proteases, responsáveis pelo debridamento e remodelamento fisiológico da célula.⁽¹³⁾

Diferente dos estudos in vitro, os implantes in vivo fornecem informações sobre a remoção de substâncias dos tecidos e sobre a resposta geral do organismo frente ao implante do novo material, através da resposta inflamatória. Portanto, esse tipo de

estudo é a alternativa mais próxima ao que ocorre no paciente, sendo essa utilizada com sucesso em pesquisas envolvendo novos materiais, em relação aos experimentos com culturas de células. ^(11,13,14)

Sendo assim, esse trabalho propõe o estudo da reação tecidual do novo biomaterial Celulose bacteriana obtida por *Gluconacetobacter xylinus* e Hidroxiapatita, CB/HAp, através de implante subcutâneo do mesmo no dorso de ratos, para que futuramente o mesmo seja utilizado como substituto ósseo.

2 OBJETIVOS

Conhecer para analisar a biocompatibilidade de novos biomateriais.

2.1 OBJETIVO GERAL

Conhecer a resposta tecidual do novo biomaterial composto de Celulose bacteriana produzida a partir de *Gluconacetobacter xylinus* e Hidroxiapatita através do implante subcutâneo do mesmo.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- a) conhecer o padrão inflamatório após o implante subcutâneo do novo biomaterial de CB;
- b) conhecer o padrão inflamatório após o implante subcutâneo do novo biomaterial de CB/Hap;
- c) conhecer o padrão inflamatório após implante subcutâneo de PTFE (politetrafluretileno), material comprovadamente biocompatível e considerado padrão ouro para ROG, através de análise microscópica;
- d) conhecer os padrões, através de teste estatístico (Kruskal Wallis), e assim analisar a biocompatibilidade do novo biomaterial.

3 METODOLOGIA

Foram utilizados 18 ratos machos adultos Wistar, obtidos do Biotério da Universidade Sagrado Coração (USC).

3.1 LOCAL E GRUPOS DE ESTUDO

Durante o período experimental, foram mantidos em caixas plásticas, alimentados com água e ração *ad libitum*, em ambiente com temperatura e luz controladas (ciclos de 12 horas). Os animais foram aleatoriamente distribuídos em 3 grupos e submetidos a cirurgia de implante subcutâneo do material a ser testado, membrana de CB bem como do PTFE (Politetrafluoretileno). Após 7 e 15 e 60 dias 6 animais de cada vez foram submetidos à eutanásia e a reação tecidual foi analisada microscopicamente.

3.2 MEMBRANAS DE CB E CB/HAP

As membranas de CB e CB/Hap foram gentilmente cedidas pelo Laboratório Residual FCA/UNESP preparadas pelo Prof. Alcides Lopes Leão em colaboração com Prof^a. Dr^a. Márcia R. Moraes Chaves da Universidade Sagrado Coração.

Resumidamente, a CB, sintetizada pela bactéria *Gluconacetobacter xylinus*, ocorreu em meio de cultura Alaban (comercial) a 30° C por um período de 6 dias, sob condições estáticas, em erlenmeyer de 200 mL, adicionado, para cada 100 mL do meio de cultura, 5% da cultura da bactéria. Após esse processo, as membranas foram lavadas e purificadas. Para tanto, após seis dias de inoculação, as membranas de CB foram retiradas dos respectivos frascos de Erlenmeyer e lavadas com uma solução de 5% (m/v) de hidróxido de sódio sob aquecimento, em uma temperatura de aproximadamente 80°C por 30 minutos. Este procedimento foi repetido de 8 vezes, até que se obteve uma celulose de coloração branca. Posteriormente lavagens adicionais com água da torneira foram realizadas, até neutralizar o pH, e com água destilada para remoção dos sais (figura 1)



Figura 1 - Membrana de Celulose Bacteriana sintetizada por *Gluconacetobacter xylinus* em processo de lavagem com água destilada para retirar sais.

Fonte: Elaborada pela autora

Após esses passos, a membrana foi seca em estufa (MD 1.3 Medicate) à 50°C (figura 2 e 3) por três dias.



Figura 2 – Estufa (MD 1.3 Medicate) utilizada para secagem da membrana.

Fonte: Elaborada pela autora



Figura 3. Membrana na estufa em processo de secagem

Fonte: Elaborada pela autora

A cada duas horas, a membrana era descolada do recipiente e pesada em balança analítica (Shimadzu)(figuras 4 e 5) para monitorar a massa e garantir a retirada de toda umidade.

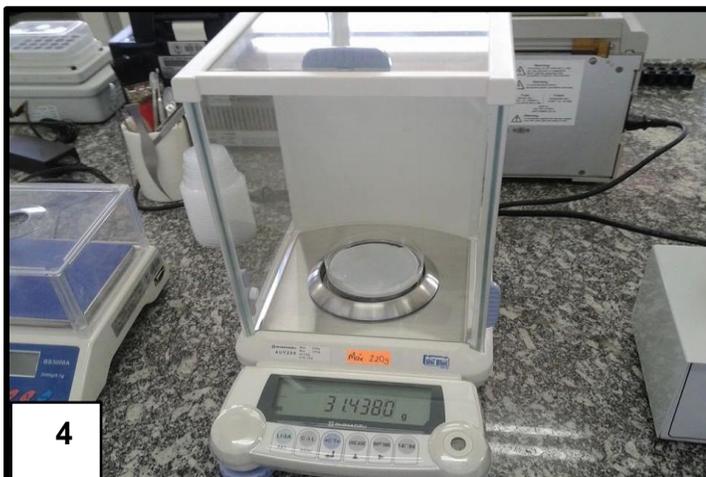


Figura 4 - Membrana CB com massa inicial de 31,4380g.
Fonte: Elaborada pela autora



Figura 5 - Membrana CB com massa final depois da secagem de 7,2578g.
Fonte: Elaborada pela autora

Inicialmente a membrana possuía massa de 31,43g e no final do processo apresentava a massa de 7,25g. A membrana foi marcada e cortada em quadrados de 0,5 cm X 0,5 cm e depois as pontas foram recortadas deixando em formato arredondado para diminuir agressões quando implantadas (figura 6). Os fragmentos foram acondicionados em placa de petri e lacradas para serem esterilizadas no IPEN, por meio da radiação gama com dose de 25kGy. O mesmo procedimento foi feito com o material de controle PTFE (Politetrafluoretileno).



Figura 6 - Membranas recortadas em fragmentos de 0,5cm de diâmetro para serem esterilizadas por radiação γ (25kGy)

Fonte: Elaborada pela autora

Outra membrana de Celulose Bacteriana (Figura 7) passou por processo de deposição para a incorporação da hidroxiapatita em sua composição. Para essa deposição, a membrana foi mantida por 15 dias em soluções de Fosfato Dissódico (Na_2HPO_4 60mM) - (Figura 8) e de Cloreto de Cálcio (CaCl_2 100mM) - (Figura 9). Esse processo foi dividido 6 ciclos, cada ciclo foi concluído quando a membrana era deixada 24 horas na solução de Na_2HPO_4 (200ml) e 24 horas na solução de CaCl_2 (200ml) - (figura 10), para que houvesse a troca de soluções a membrana sempre era lavada com água destilada para remoções de sais e resíduos da outra solução.

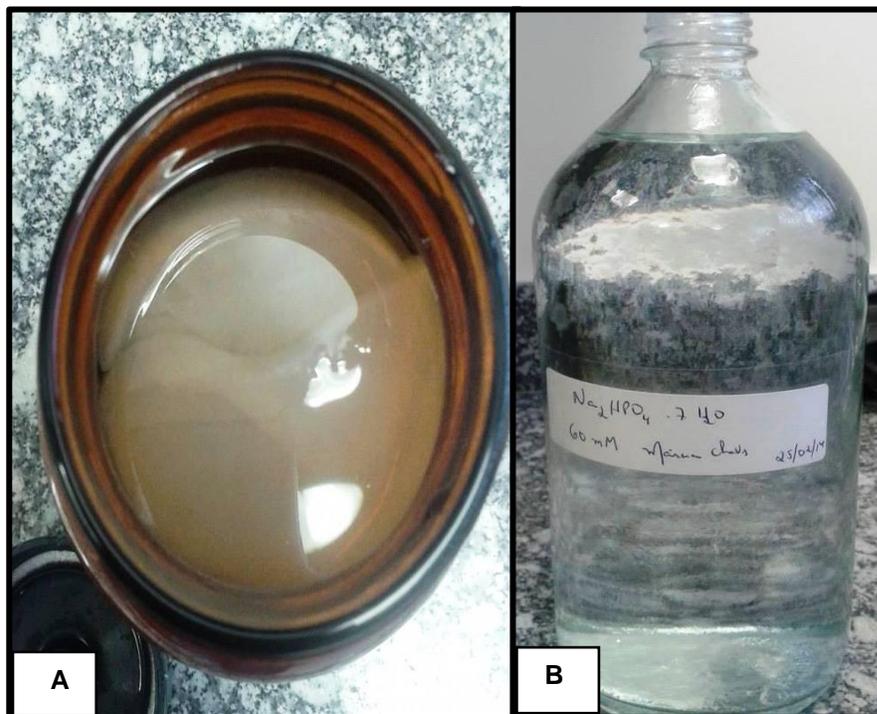


Figura 7 – membrana de CB pronta para começar o processo de deposição de hidroxiapatita.(A) e Solução de Fosfato Dissódico (B)
Fonte: Elaborada pela autora

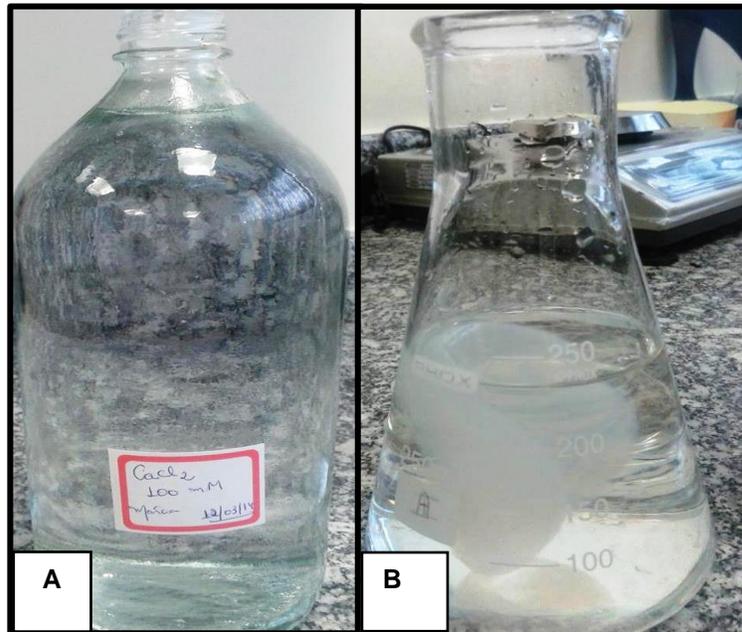
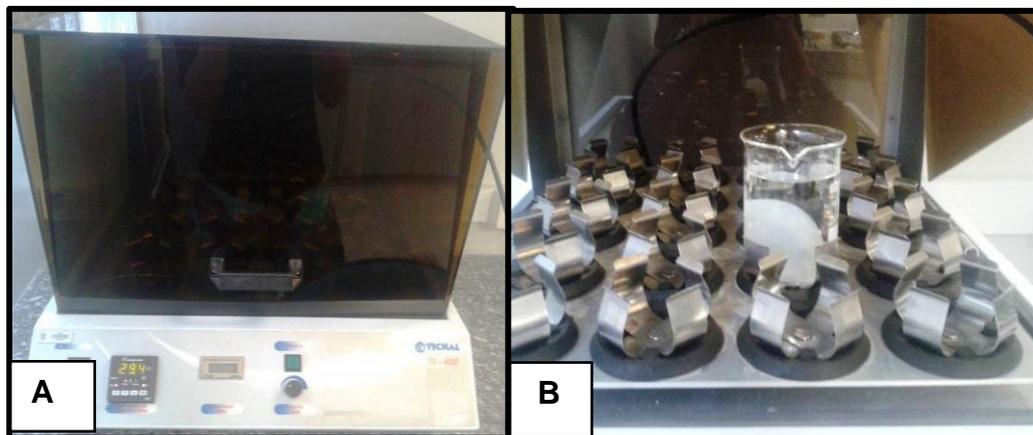


Figura 8- Solução de Cloreto de Calcio (A) e membrana quando deixada nas soluções nos períodos de 24 horas.(B)
Fonte: Elaborada pela autora

Durante todo o processo de deposição de Hidroxiapatita, a membrana foi deixada em um shaker em movimento rotacional de 360° na temperatura de 35°C, 24 horas (Figura 9).



Figuras 9 – Shaker (Tecnal) utilizado na deposição de Hidroxiapatita. A membrana foi imersa em soluções de Cloreto de Cálcio e Fosfato Dissódico em ciclos de 24 horas.(A e B)
Fonte: Elaborada pela autora

Após o processo de deposição, a membrana passou por uma fase de secagem em estufa a 50°C e depois foi recortada em quadrados de 0,5 X 0,5 como a membrana de CB. As pontas também foram recortadas para diminuir agressão na implantação e enviadas ao IPEN para serem esterilizadas com radiação γ 25kGy (Figura 10).

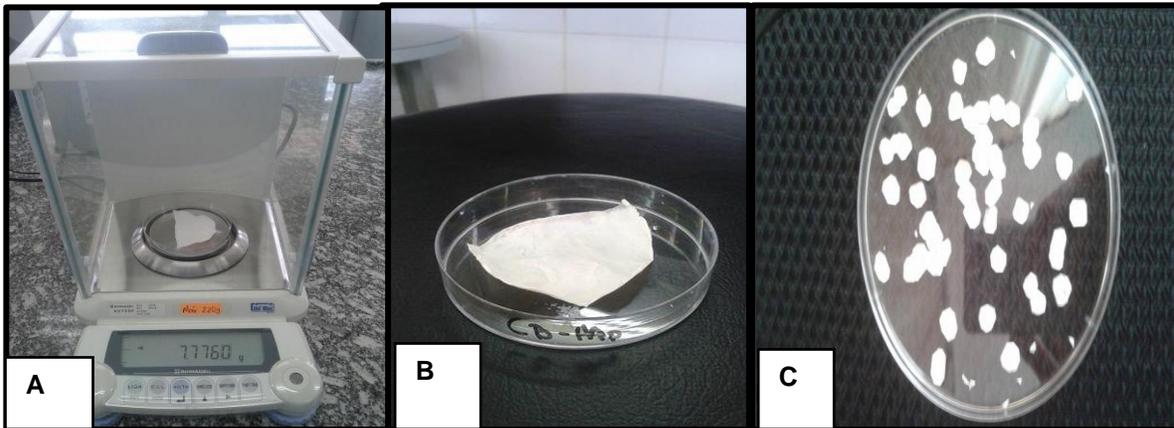


Figura 10- Membrana sendo pesada em uma balança analítica após o processo de secagem em estufa.(A),Membrana totalmente seca.(B) e Membranas recortadas em fragmentos de 0,5cm de diâmetro para serem esterilizadas por radiação γ (25kGy)

Fonte: Elaborada pela autora

Uma fração de cada material foi submetida a microscopia eletrônica de varredura MEV (Figura 11) e análise composicional (EDS) no microscópio Zeiss (Figura 12).

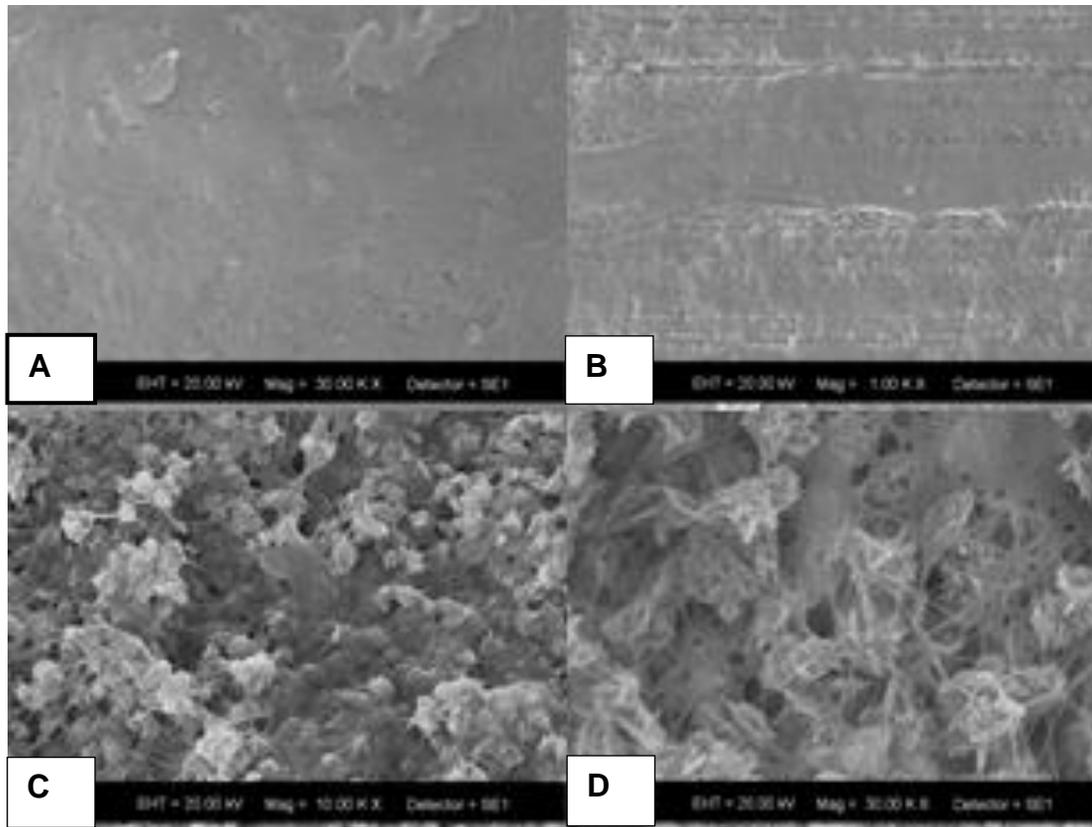


Figura 11 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (A) Membrana de Politetrafluoretileno (B) Membrana de Celulose Bacteriana (CB) (C e D) Membrana de Celulose bacteriana incorporada a hidroxiapatita (CBHap).

Fonte: Elaborada pela autora

Foi realizado também a microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva (MEV/EDS) para observar a quantidade de carbono, cálcio e fósforo que foram depositadas na membrana e os locais que ficaram depositadas e os gráficos mostrando os maiores picos de cada componente. (Figuras 12 e 13)

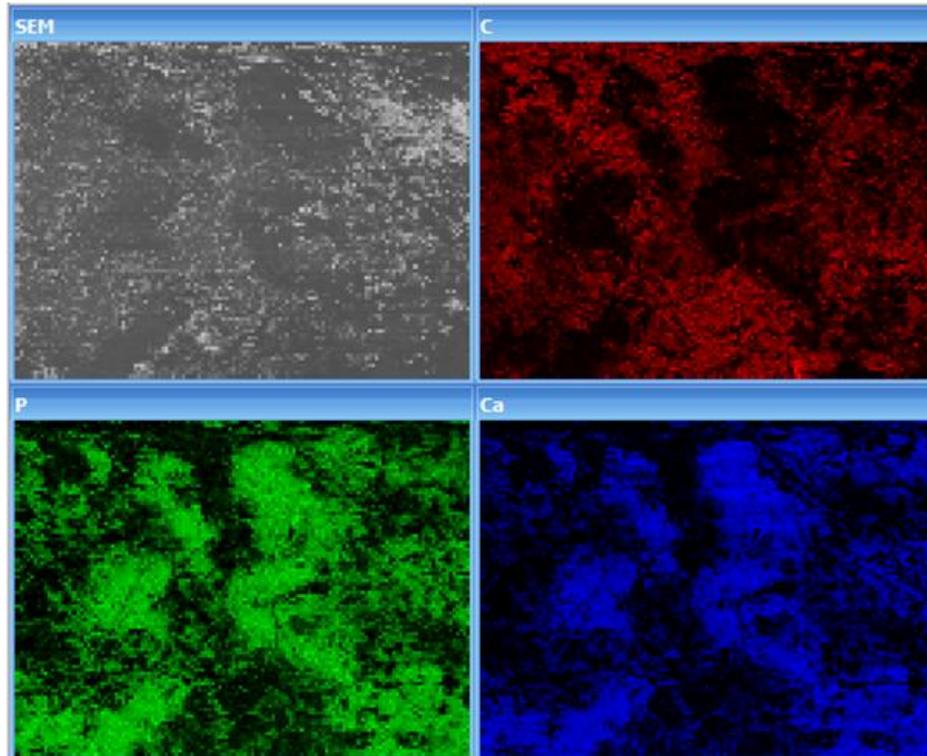


Figura 12 - Mapa da distribuição de Carbono (vermelho), Fósforo (verde) e Cálcio (azul) na membrana CB-HAp

Fonte: Elaborada pela autora

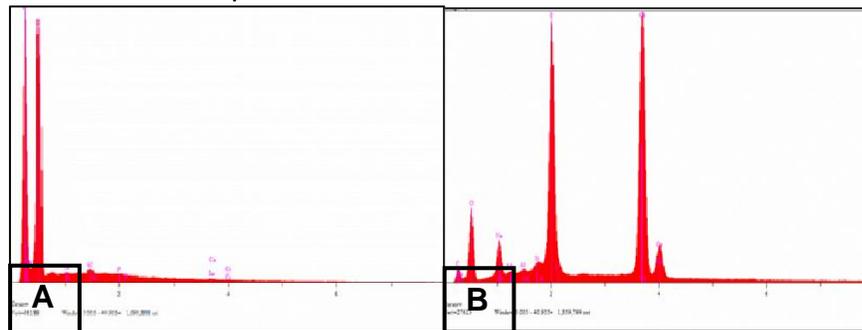


Figura 13 - Espectro EDS de CB, mostrando os componentes principais e ausência de Ca e P (A) e Espectro EDS de CBHap, mostrando os componentes principais e os picos de Ca e P (B)

Fonte: Elaborada pela autora

4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os 18 animais foram submetidos a procedimento cirúrgico, sob anestesia geral, para posterior implante dos biomateriais no dorso, de acordo com a tabela 1

Tabela 1: Distribuição dos grupos experimentais.

Grupos	Numero de animais	Período de Preservação
A	6	7 dias
B	6	15 dias
C	6	60 dias

Fonte: Elaborada pela autora.

Em cada animal foi implantado uma fração de cada biomaterial, sendo eles, membrana de CB, membranas de CBHap e membranas de PTFE, no qual o posicionamento foi alterado entre os animais do mesmo grupo, e assim descartar a possível influência da localização do implante nos resultados.

4.1 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Após os períodos de preservação de 7, 15 e 60 dias citados no quadro acima os animais sofreram eutanásia com dose letal de barbitúrico. A área contendo os materiais implantados foi coletada para realização de análise microscópica.

4.1.1 Anestesia e Assepsia

Para a realização do procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos à anestesia geral com administração pré-anestésica de relaxante muscular por via intraperitoneal de cloridrato de xilazina (Anasedan-Vetbrands) 13mg/kg de peso corpóreo, associado ao anestésico geral de cloridrato de Cetamina (Dopalen – Vetbrands) 87mg/kg de peso corpóreo, podendo ser visualizado nas figuras 14 e 15.

As doses foram calculadas de acordo com a massa média dos animais, medida antes dos procedimentos.



Figura 14 - Anestésico geral e relaxante muscular que foram utilizados na cirurgia (A) Aplicação por via intraperitoneal do anestésico geral e o relaxante muscular (B).

Fonte: Elaborada pela autora

4.1.2 Técnica cirúrgica

Após realização da anestesia, foi feita a tricotomia na região dorsal e antissepsia do local com clorexidina 2% em gel. (figura15)

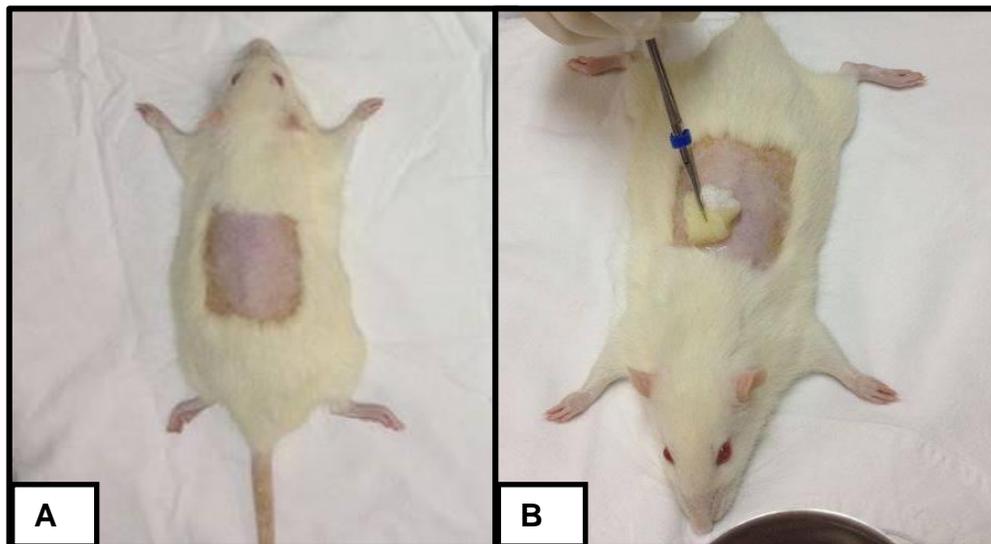


Figura 15 - Tricotomia realizada no dorso do rato para realizar os procedimentos antissepsia do local com clorexidina 2%(A e B).

Fonte: Elaborada pela autora.

Em seguida sobre campos estéreis, cada animal recebeu 3 incisões de aproximadamente 0,5cm com a lâmina nº 15, seguida de divulsão com tesoura cirúrgica de ponta romba, até chegar na área desejada para realizar o implante (Figura 16).



Figura 16 - Incisão com lâmina nº 15 dos 3 locais que receberam os biomateriais.(A e B) seguido da divulsão das incisões com tesoura cirúrgica de ponta romba para acesso ao subcutâneo dos ratos para a implantação das membranas (C).

Fonte: Elaborada pela autora

A figura 17 mostra os biomateriais a serem implantados. Os biomateriais foram implantados com a ajuda de uma pinça clínica no dorso do rato na região subcutânea.

A seguir foi realizada a sutura do tecido um ponto simples em cada incisão, com fio de sutura (Shalon Nylon 4-0). Após o procedimento cirúrgico foi aplicado antimicrobiano (Enrofloxacino 10mg/kg) e dipirona sódica 25mg/kg.

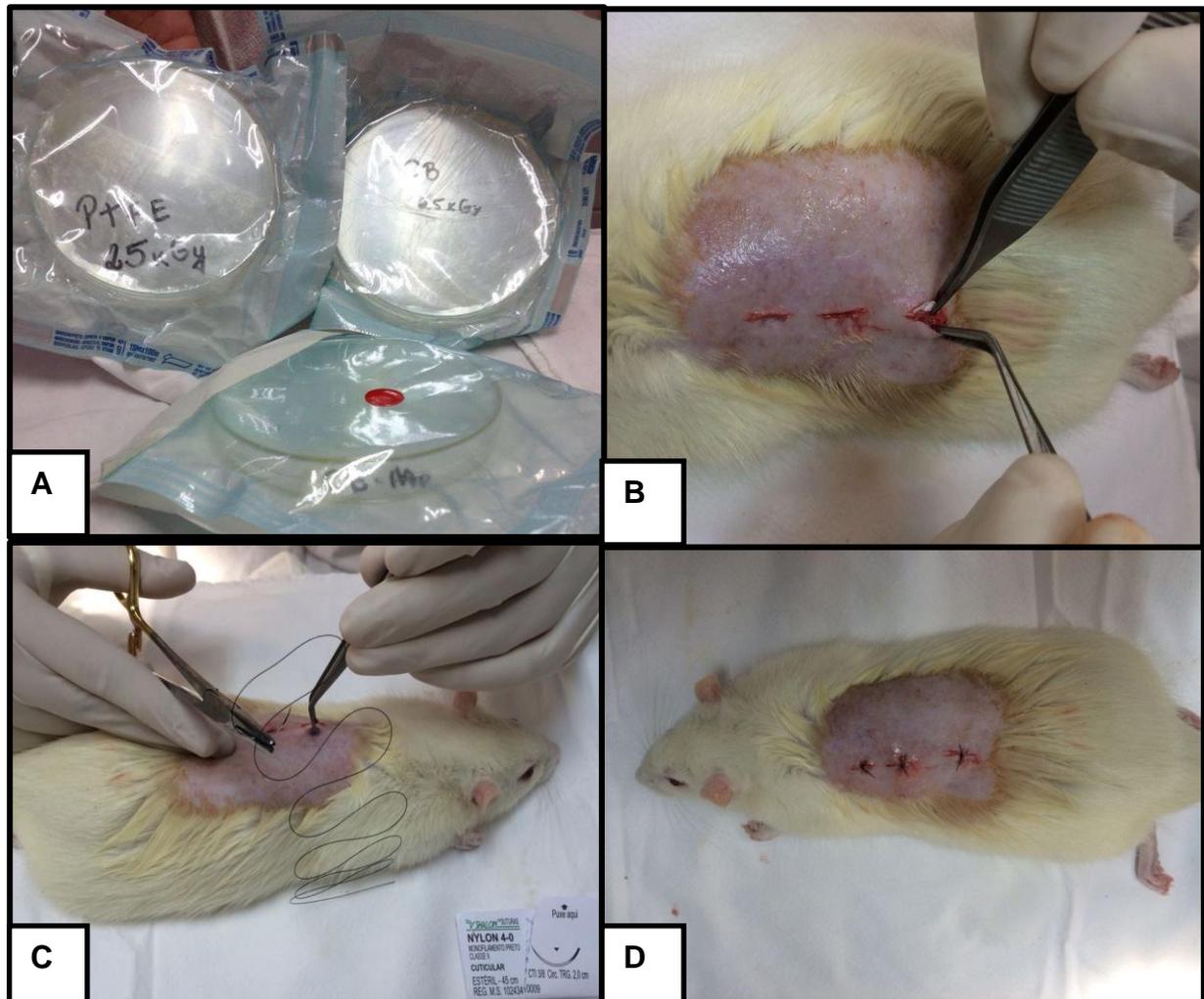


Figura 17 - Biomateriais esterilizados por meio de radiação gama com dose de 25kGy.(A) Implantação do material na incisão com ajuda de uma pinça clínica.(B) Processo de sutura das incisões com fio de nylon 4-0 (C e D).

Fonte: Elaborada pela autora

4.2 Remoção e preparo das peças

Decorridos os períodos de observação de 7, 15 e 60 dias os animais foram submetidos à eutanásia por sobredosagem de barbitúrico, que foi através da associação de lidocaína 10mg/kg e tiopental 150mg/kg (Figura 18).



Figura 18 - Cloridrato de Lidocaína e Tiopental (Thiopentax) usados em associação para a eutanásia (A). Aplicação do Tiopental (Thiopentax) e cloridrato de lidocaína IP para indução da eutanásia dos ratos (B).

Fonte: Elaborada pela autora

Para coleta das peças, primeiramente foi realizada a tricotomia da região dorsal e, em seguida, remoção da peça com tesoura cirúrgica reta. Subseqüentemente, as peças foram fixadas em formol a 10%, para que posteriormente fossem feitas as análises macroscópica e microscópica.

4.2.1 Análise Macroscópica

Os espécimes foram analisados macroscopicamente nas suas dimensões, coloração e fotografados em lente de aproximação.

Após realizada a eutanásia, foi realizada a tricotomia da região dorsal e uma incisão longitudinal, na direção da coluna vertebral para a retirada dos biomateriais implantados.

4.2.2 Análise Microscópica

Após fixação em formol a 10% por 48 horas, as peças foram recortadas no sentido transversal na direção do diâmetro do biomaterial, para posterior inclusão em parafina conforme mostra a figura 19.

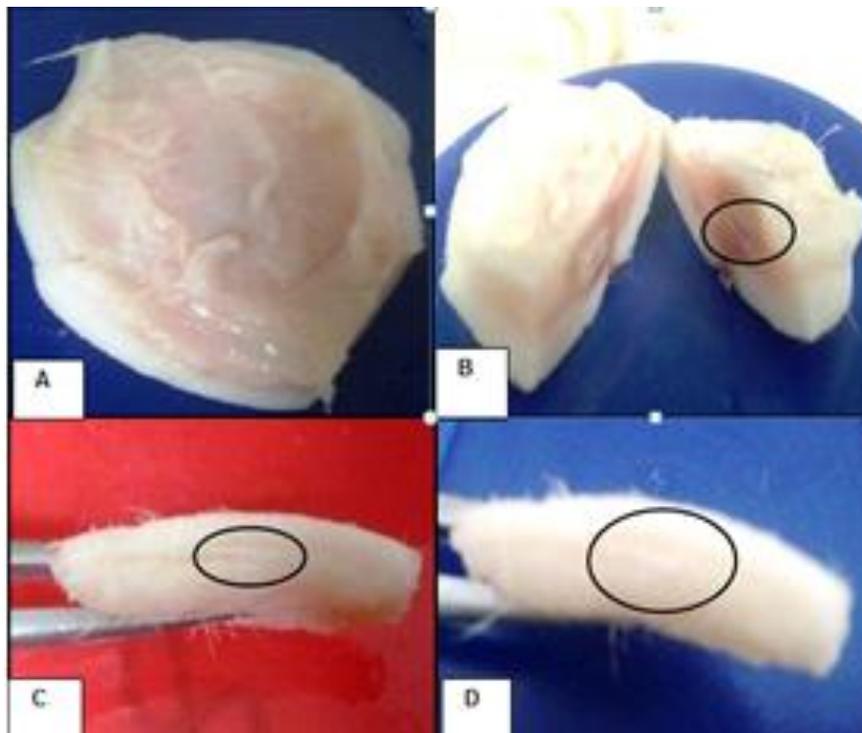


Figura 19 – Peça com a membrana de CBHap implantada por 7 dias, após fixação no formol 10% (A). Peça cortada no sentido transversal no local da membrana, podendo observar sua espessura, coloração e características macroscópicas (B). Membrana de CB também visualizada pelo corte transversal (C) e Membrana de PTFE também pelo corte transversal (D).

Fonte: Elaborada pela autora.

Os cortes microscópicos foram obtidos no sentido longitudinal com seis micrômetros de espessura e corados pelo método da hematoxilina/eosina. Para que fossem feitas as análises microscópicas, 6 áreas foram selecionadas em volta da membrana e com a ajuda do programa ImageJ as contagens das células inflamatórias foram realizadas. Foram analisados e descritos em todas as suas peculiaridades, selecionados e fotografados os dados mais relevantes, no próprio microscópio, para a competente comprovação.

Para a avaliação do padrão inflamatório, foi adotado o procedimento recomendado por Parirokh et al ⁽¹³⁾ o mesmo utilizado por Marques et al ⁽¹¹⁾, seguindo o score descrito na tabela 2.

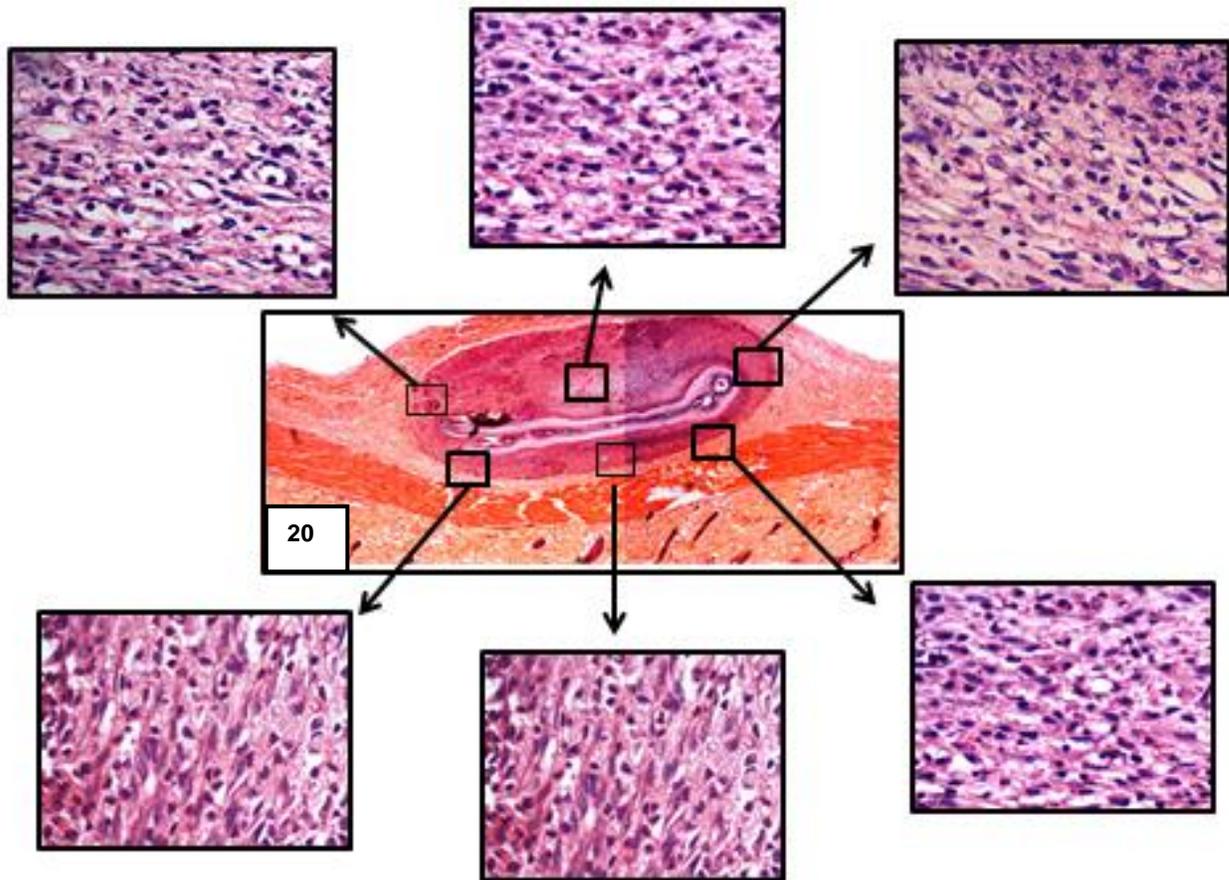


Figura 20 – Áreas em que as imagens foram selecionadas para contagem de células inflamatórias.

Fonte: Elaborada pela autora

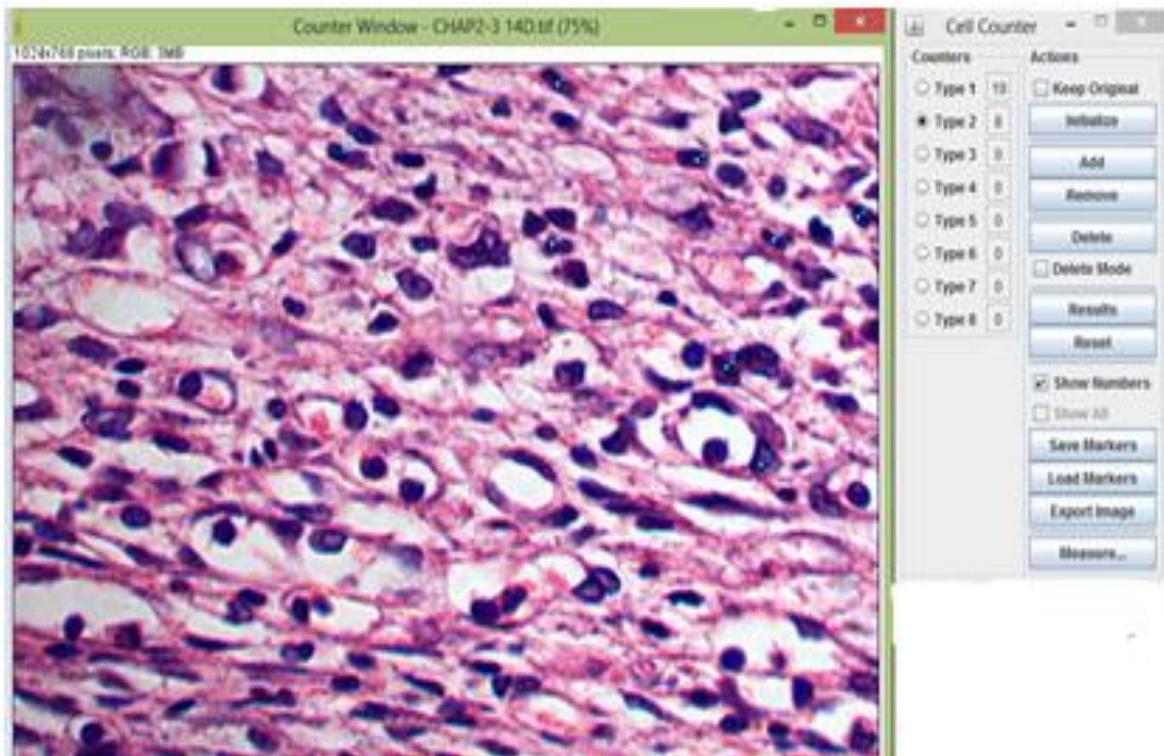


Figura 21 – Programa ImageJ utilizado para contagens de células inflamatórias mononucleares e polimorfonucleares.

Fonte: Elaborada pela autora

Tabela 2: Scores da resposta inflamatória

Resposta Inflamatória	Score
Ausente 0 células	0
Suave < 25 células	1
Moderada entre 25 e 125 células	2
Severa >125 células	3

Fonte: Elaborada pela autora

5 RESULTADOS

Durante todo o procedimento e após a cirurgia não houve perda de nenhum animal, e todos apresentaram uma ótima recuperação. Nenhum animal apresentou quadro de dor no pós-cirúrgico.

5.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA

Após realizada a eutanásia, foi realizada a tricotomia da região dorsal e uma incisão longitudinal, na direção da coluna vertebral (figura 22) para a retirada dos biomateriais implantados.

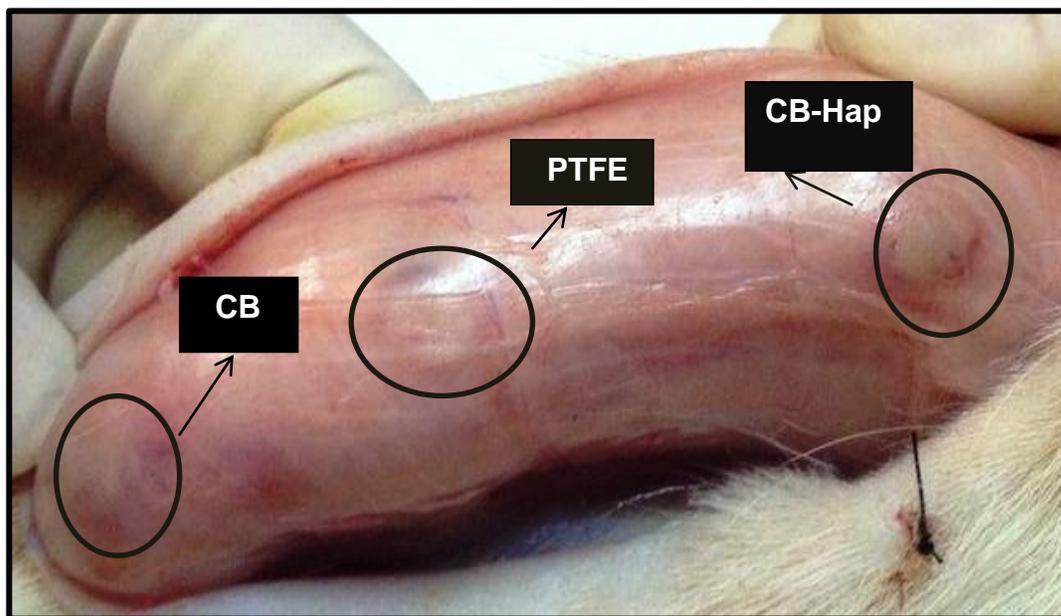


Figura 22 - Os materiais sendo localizados na região subcutânea para serem removidos.

Fonte: Elaborada pela autora

Após a localização dos biomateriais, o tecido foi recortado em forma circular com diâmetro de aproximadamente 3cm, ao redor de cada biomaterial (figura 23).

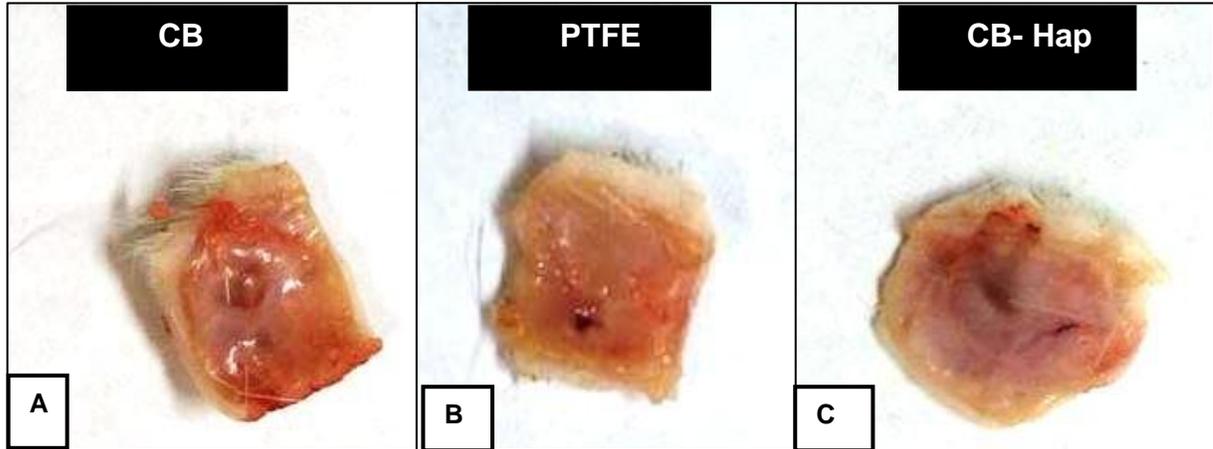


Figura 23 - Membrana de CB (Celulose Bacteriana) 7 dias após o implante (A). Membrana de PTFE (Politetrafluoretileno) 7 dias após o implante (B) e Membrana de CBHap (Celulose Bacteriana incorporada a Hidroxiapatita) 7 dias após o implante (C).
Fonte: Elaborada pela autora

5.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA

Os materiais foram preservados em formol 10% por 48 horas. As imagens panorâmicas foram tiradas separadamente por cada período de 7, 15 e 60 dias, onde através dela podemos observar toda a reação tecidual de uma forma geral, e no período de 60 dias podemos observar que houve a formação de uma cápsula fibrosa em volta de cada biomaterial, comprovando assim que foi biocompatível com os tecidos de acordo com a literatura.

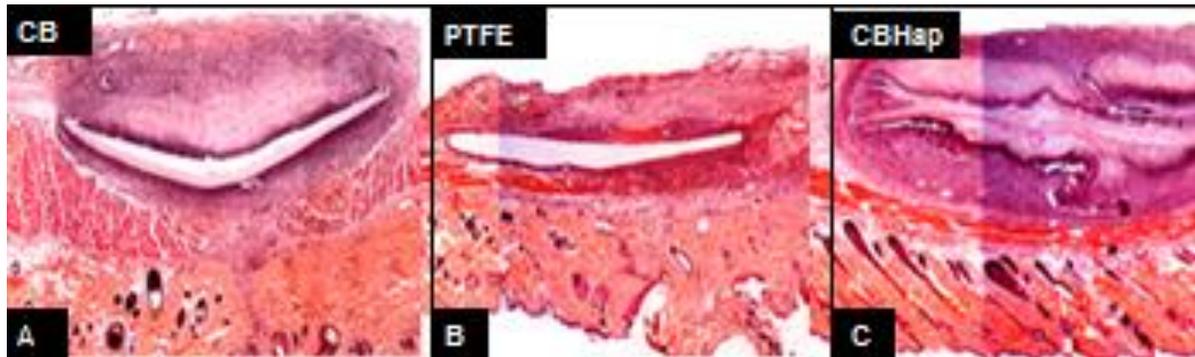


Figura 24 - Membranas de celulose bacteriana 7 dias após implantação (A) Membrana de PTFE 7 dias após implantação (B) e Membrana de CBHap 7 dias após implantação
Fonte: Elaborada pela autora

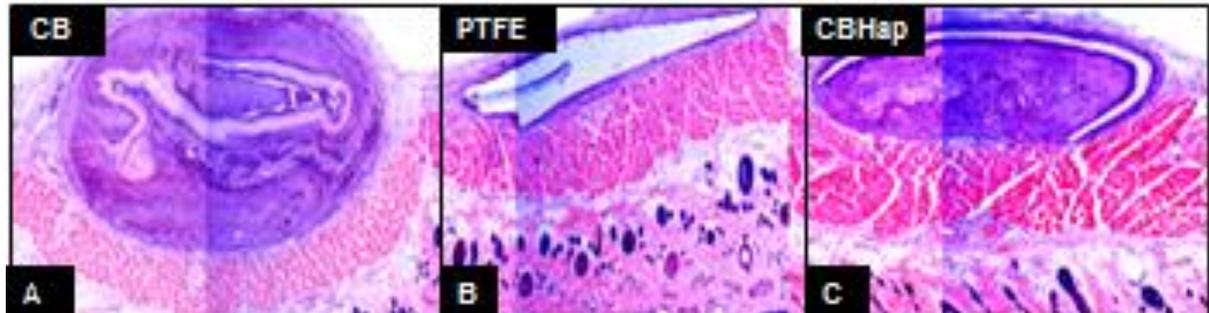


Figura 25 - Membranas de celulose bacteriana 15 dias após implantação (A) Membrana de PTFE 15 dias após implantação (B) e Membrana de CBHap 15 dias após implantação.(C)
Fonte: Elaborada pela autora.

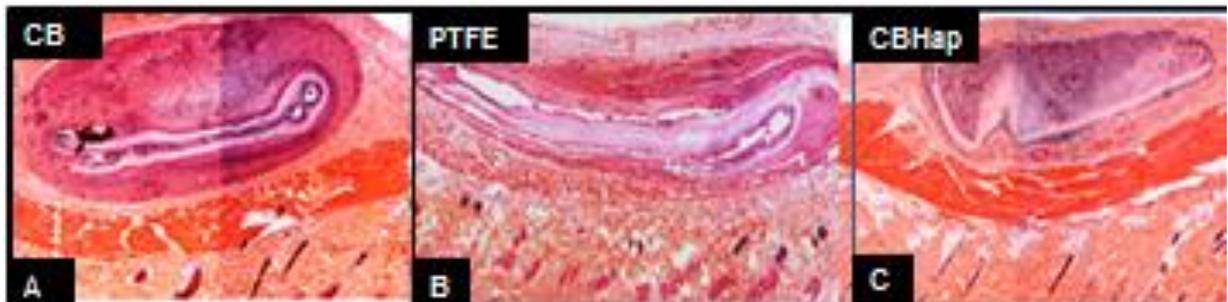


Figura 26 - Membranas de celulose bacteriana 60 dias após implantação (A) Membrana de PTFE 60 dias após implantação (B) e Membrana de CBHap 60 dias após implantação (C).
Fonte: Elaborada pela autora.

Para melhor controle as imagens foram fotografadas em maior aumento (40X), sendo possível realizar as contagens de células inflamatórias mononucleares e polimorfonucleares, que são as células inflamatórias presentes no processo inflamatório.

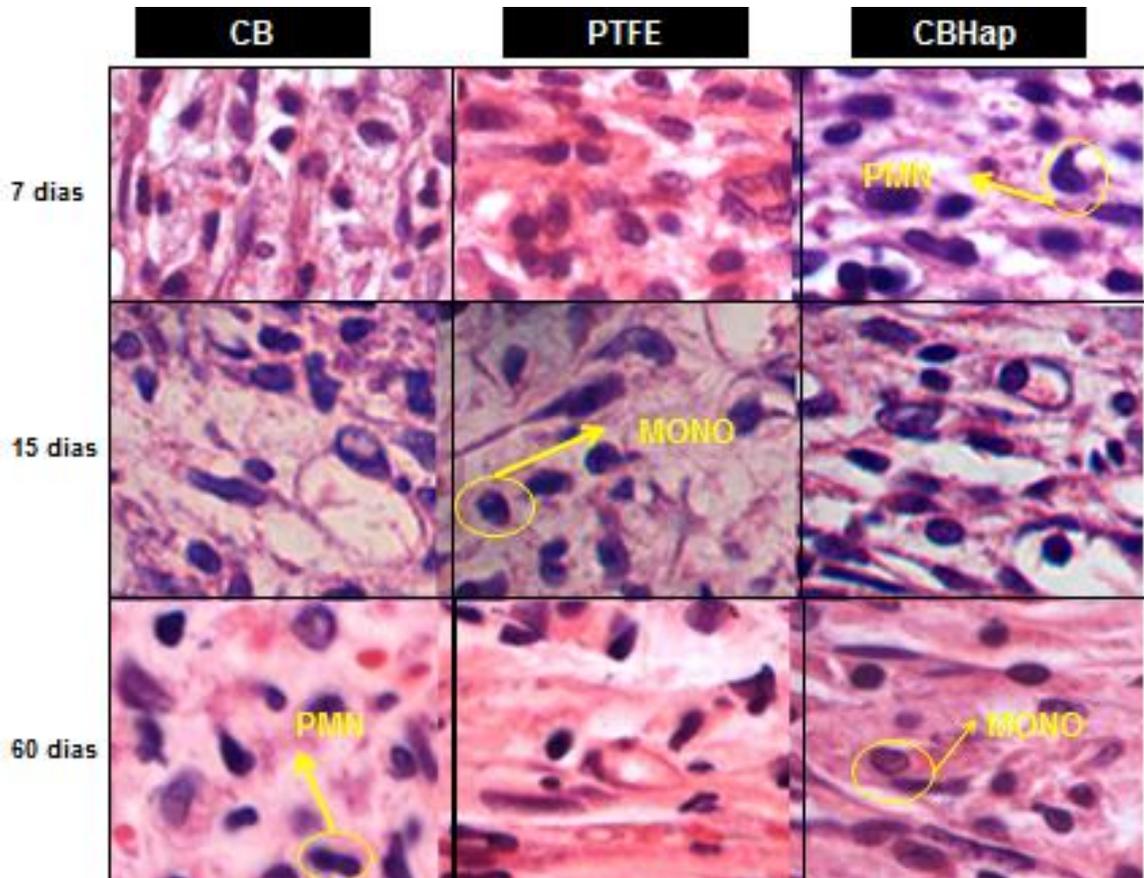


Figura 27 – Imagens ampliadas de CB, PTFE e CBHap nos períodos de 7, 15 e 60 dias para contagem de células inflamatórias Polimorfonucleares e Mononucleares.

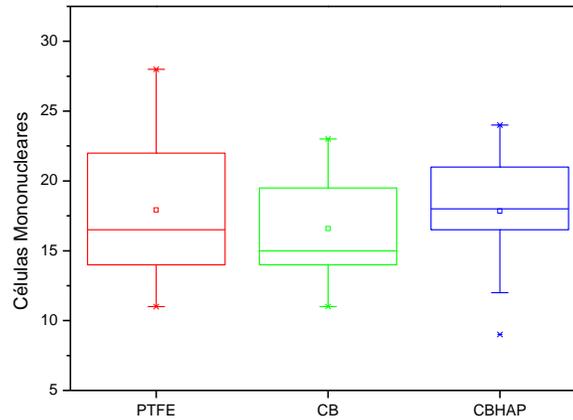
Fonte: Elaborada pela autora.

5.3 MORFOMETRIA

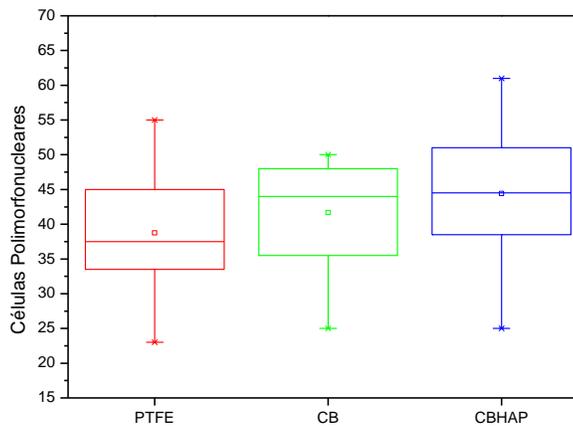
A fim de analisar quantitativamente o número de células inflamatórias originado do implante de cada material, realizou-se a comparação entre o número de células encontradas em cada período. O gráfico 2A representa o gráfico Box-Plot (mediana e quartis) do número de células inflamatórias mononucleares e o gráfico 2B o número de células polimorfonucleares no período de 7 dias para cada material estudado. Letras iguais em cada gráfico indicam os grupos os quais houve diferenças estatísticas significantes ($p < 0.05$) de acordo com o teste Kruskal Wallis, seguido de Student Newman Keuls. Da mesma forma, os gráficos 3 e 4 mostram essa representação para os períodos de 15 e 60 dias.

Os gráficos 5 e 6 mostram como variaram o número de células mononucleares e polimorfonucleares ao longo do tempo para cada tipo de material estudado.

5.3.1 Comparação entre os materiais em cada período



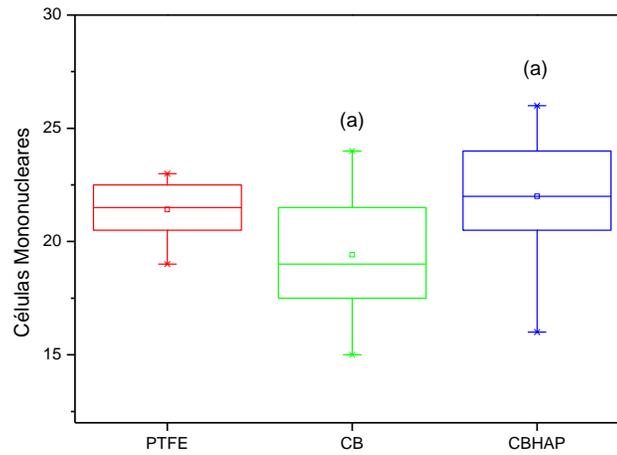
(A)



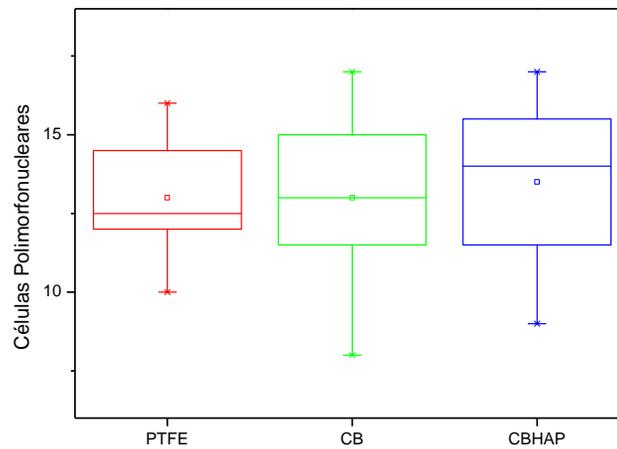
(B)

Figura 28 - Gráfico Box Plot (Mediana e Quartis) do número de células inflamatórias relativo ao período de 7 dias (A) Mononucleares e (B) Polimorfonucleares. Em cada gráfico, letras iguais indicam os resultados diferentes estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis, Student Newman Keuls)

Fonte: Elaborada pela autora



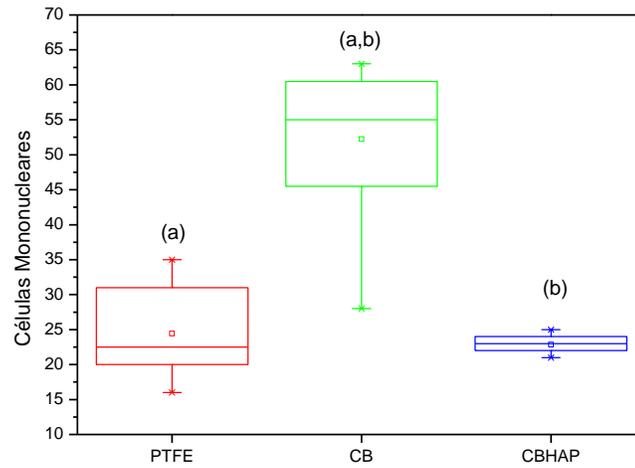
(A)



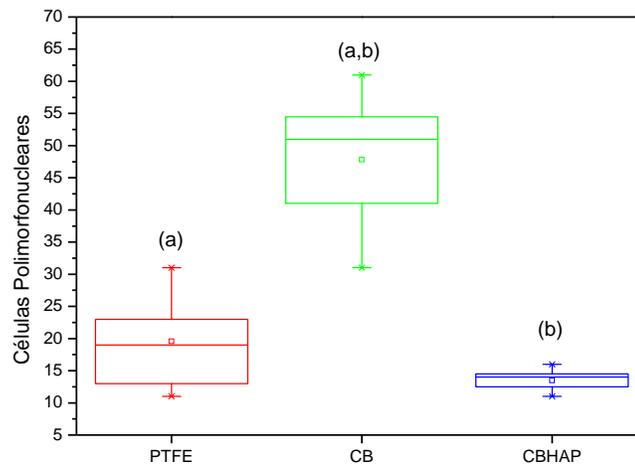
(B)

Figura 29 - Gráfico Box Plot (Mediana e Quartis) do número de células inflamatórias relativo ao período de 15 dias (A) Mononucleares e (B) Polimorfonucleares. Em cada gráfico, letras iguais indicam os resultados diferentes estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis, Student Newman Keuls)

Fonte: Elaborada pela autora



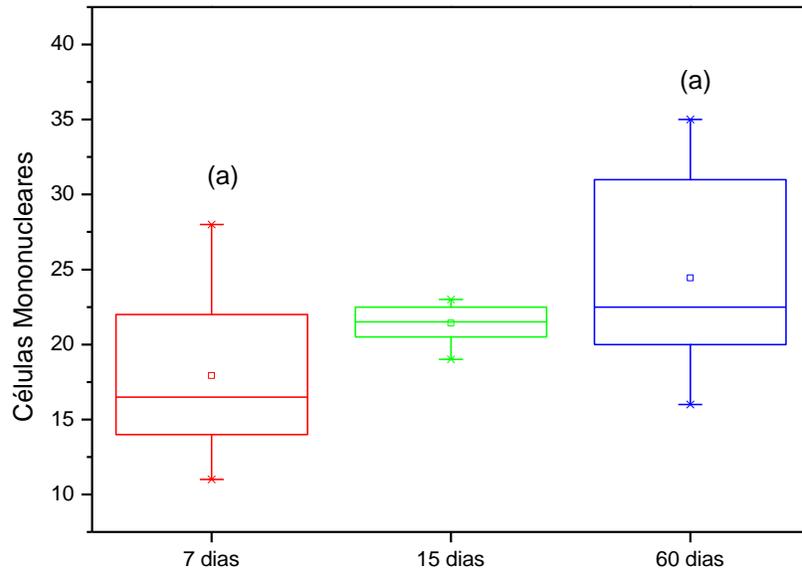
(A)



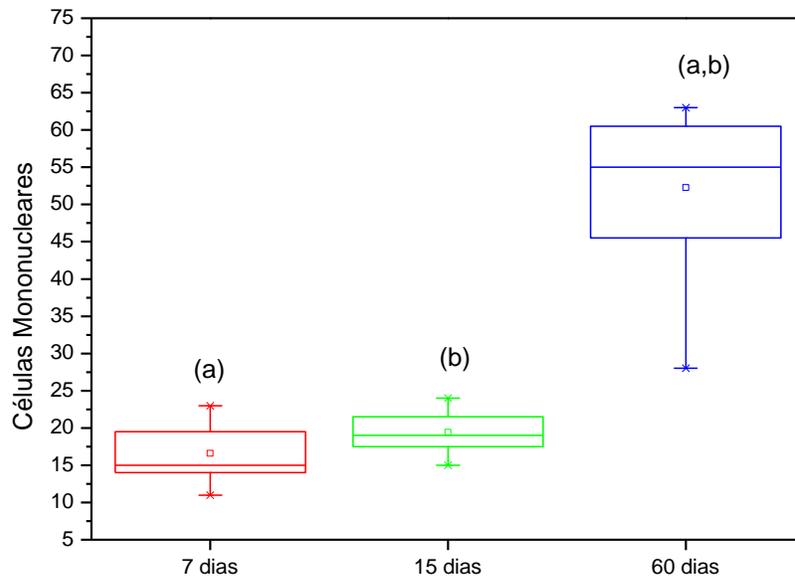
(B)

Figura 30 - Gráfico Box Plot (Mediana e Quartis) do número de células inflamatórias relativo ao período de 60 dias (A) Mononucleares e (B) Polimorfonucleares. Em cada gráfico, letras iguais indicam os resultados diferentes estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis, Student Newman Keuls)

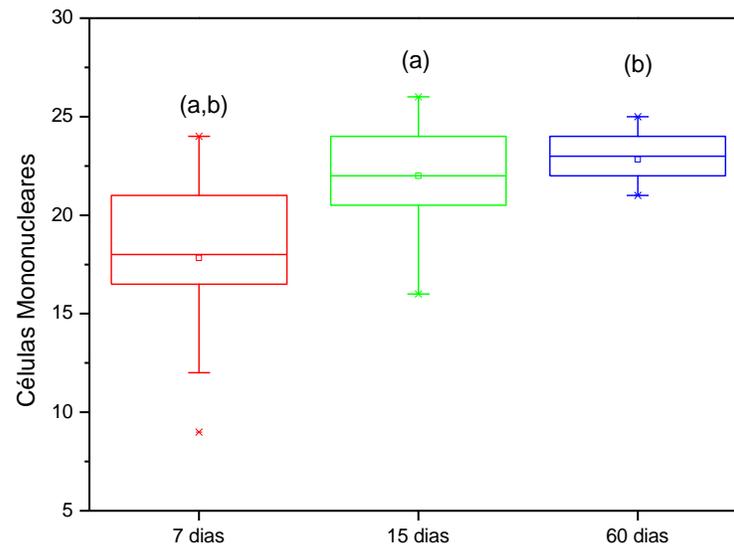
Fonte: Elaborada pela autora



(A)



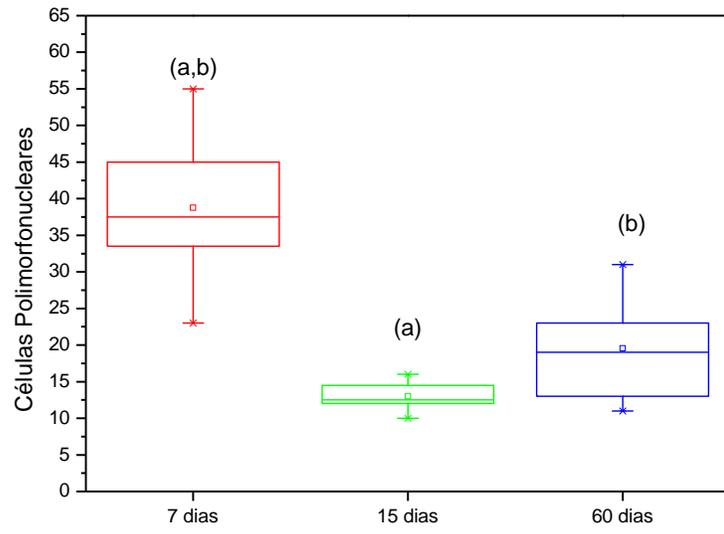
(B)



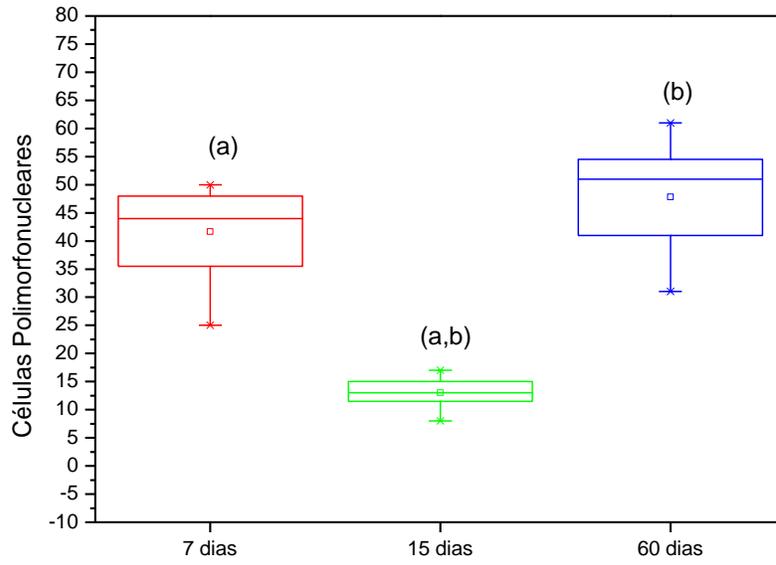
(C)

Figura 31 - Gráfico Box Plot (Mediana e Quartis) do número de células inflamatórias mononucleares encontradas ao longo do tempo devido ao implante dos materiais (A) PTFE (B) Celulose Bacteriana (CB) e (C) Celulose Bacteriana com Hidroxiapatita (CB-HaP) Em cada gráfico, letras iguais indicam os resultados diferentes estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis, Student Newman Keuls)

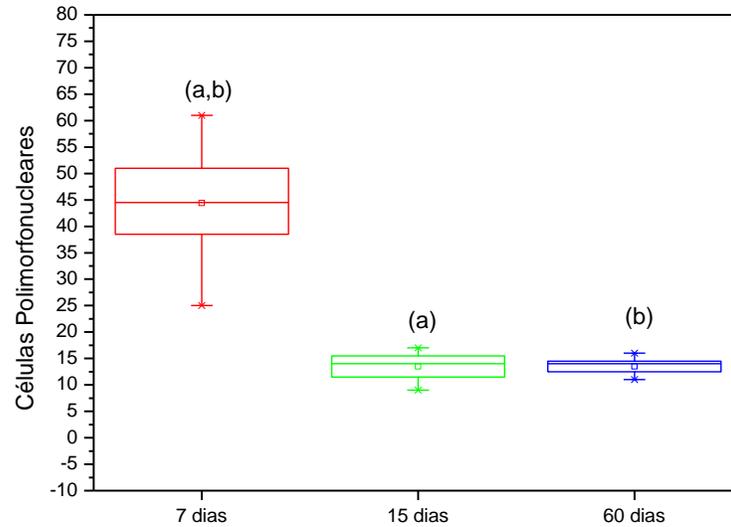
Fonte: Elaborada pela autora



(A)



(B)



(C)

Figura 32 - Gráfico Box Plot (Mediana e Quartis) do número de células inflamatórias polimorfonucleares encontradas ao longo do tempo devido ao implante dos materiais (A) PTFE (B) Celulose Bacteriana (CB) e (C) Celulose Bacteriana com Hidroxiapatita (CB-HaP) Em cada gráfico, letras iguais indicam os resultados diferentes estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis, Student Newman Keuls)

A fim de analisar qualitativamente o padrão inflamatório, o número de células mononucleares e polimorfonucleares contadas em cada imagem foram somadas e classificadas de acordo com os scores dados na tabela 1. O valor do score mais frequente foi atribuído como score da lâmina. A tabela 2 sumariza os resultados obtidos. Não foram encontradas diferenças estatísticas significantes ($p > 0.05$, Kruskal Wallis, Student Newman Keuls).

Fonte: Elaborada pela autora

Tabela 3 - Razão do número de lâminas no score (tabela 2) e total de lâminas analisadas de acordo com o período e materiais estudados.

	PTFE				Celulose Bacteriana (CB)				CB-HaP			
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
7 dias	0/6	3/6	3/6	0/6	0/6	2/6	4/6	0/6	0/6	0/6	6/6	0/6
15 dias	0/6	0/6	6/6	0/6	0/6	0/6	6/6	0/6	0/6	0/6	6/6	0/6
60 dias	0/6	0/6	6/6	0/6	0/6	0/6	6/6	0/6	0/6	0/6	6/6	0/6

Fonte: Elaborada pela autora

6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos a CB tem despertado grande interesse como biomaterial ⁽¹⁵⁾ para uma variedade de aplicações biomédicas como curativo de pele em casos de queimaduras⁽¹⁶⁾, produção de vasos sanguíneos ⁽¹⁷⁾ recuperação de nervos ⁽¹⁸⁾ arcabouços (scaffold) para engenharia de tecidos e reparação óssea^(7,8,19). Com o desenvolvimento metodológico aplicado a engenharia de tecidos, novos procedimentos passaram a ser utilizados na restauração óssea. Materiais poliméricos podem servir como suporte para o crescimento celular, permitindo a penetração de vasos sanguíneos e em alguns casos, até mesmo exercem atividade morfogenética. No caso de materiais biorreabsorvíveis, eles são muitas vezes enriquecidos com hidroxiapatita, fatores de crescimento, proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) além de outros elementos ósseos, tornando-os muito eficientes no estímulo à neoformação óssea em regiões lesadas⁽²⁰⁾.

Algo que é muito importante antes de introduzir no mercado e/ou utilizar um novo material odontológico, é que suas propriedades físico-químicas e antimicrobianas sejam estudadas. Do ponto de vista biológico, seu potencial irritativo deve ser avaliado, pois eventuais componentes tóxicos presentes nesse determinado material poderiam causar irritação, degeneração ou mesmo necrose dos tecidos adjacentes, dessa forma muitos estudos realizam seus testes tanto *in vivo* como *in vitro*, para testar os padrões inflamatórios e biocompatibilidade dos mesmos ^(13,21).

Com o propósito de avaliar a biocompatibilidade de um dado material através de estudos *in vivo* preliminares, um método comumente utilizado é a implantação do material a ser estudado em tecido subcutâneo de pequenos animais. Dentre esses animais, o rato é o mais freqüentemente utilizado. Além de ser um modelo experimental que representa satisfatoriamente o organismo de um mamífero, ele apresenta dimensões adequadas proporcionando um manejo mais fácil e seguro e apresenta um metabolismo mais acelerado quando comparado a outros animais, o que permite a obtenção de resultados relevantes em um curto período de tempo⁽²²⁾.

A literatura relata diversos métodos para análise da gravidade da reação por via subcutânea aos materiais dentários. Marques et. al.⁽¹¹⁾ Parirokh et al⁽¹³⁾ and Yaltirik et

al⁽²¹⁾ avaliaram a extensão da inflamação por método semelhante ao utilizado neste trabalho que foi pela quantificação do número de células inflamatórias, presença de cápsula fibrosa e necrose nos tecidos adjacentes aos materiais estudados após implantes subcutâneos no dorso dos animais. A evolução da inflamação bem como a avaliação da biocompatibilidade foi feita através da comparação da resposta tecidual em relação a materiais já reconhecidamente compatíveis.

O presente estudo demonstrou resultados favoráveis para CB e CB/Hap em termos de resposta tecidual. Macroscopicamente pode-se observar que não houve nenhum tipo de resposta anormal, nem necrose tecidual como podemos observar na Figura 21, dizendo-se assim que teve uma boa aceitação do biomaterial à princípio. Microscopicamente, todo processo inflamatório pode ser avaliado, quantificando células mononucleares, ou também chamada de macrófagos, e células polimorfonucleares conhecida como neutrófilos que são as células presentes em toda resposta inflamatória frente à uma agressão, com a finalidade de reparar os danos que foram causados ao tecido. A Figura 26 ilustra o processo utilizado. No período de 7 dias foi observado elevada quantidade de células polimorfonucleares e decorrido o período de 15 e 60 dias observou-se que houve uma redução destas e aumento do número das células mononucleares, caracterizando uma reação normal do organismo frente a uma agressão⁽¹⁰⁾. Pelas imagens microscópicas das Figuras 23, 24 e 25 pode-se observar a cápsula fibrosa ao redor dos materiais implantados, sendo que no período de 60 dias esta cápsula encontra-se bem organizada, comprovando que os materiais apresentam uma boa biocompatibilidade.

Embora em alguns períodos a análise quantitativa tenha demonstrado diferenças na quantidade de células inflamatórias nos tecidos adjacentes a CB e CB/Hap em relação a PTFE, quando analisados em grau de severidade (scores) da inflamação (tabela 2) os materiais não demonstraram nenhuma diferença significativa estatisticamente em comparação com o padrão PTFE, material comerciais reconhecidamente biocompatível. Portanto os resultados mostram-se satisfatórios em relação à resposta tecidual dos novos biomateriais estudados.

7 CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos podemos concluir que o padrão inflamatório tanto da CB e CBHap são semelhantes com o padrão inflamatório do PTFE, onde, pelas análises microscópicas observou-se a presença e quantidades próximas das células polimorfonucleares tanto como as mononucleares e a formação da cápsula fibrosa em torno do biomaterial. De acordo com o score de classificação adotado, a resposta inflamatória se manteve em “suave” pois a quantidade de células inflamatórias encontradas, de maneira geral, foram inferiores a 25. Sendo assim, os resultados foram satisfatórios, comprovando que os biomateriais estudados são biocompatíveis, e podem ser utilizados futuramente como substitutos ósseos.

REFERÊNCIAS*

1. Friedlaender GE. Bone grafts. The basic science rationale for clinical applications. *J Bone Jt Surg – Am Vol.* 1987;69(5):786–90.
2. Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Jt Surg - Am Vol.* 2002;84-A(3):454–64.
3. Lindhe JAN, Karring T, Lang N. Tratado de periodontia clínica e implantodologia oral; Treaty of clinical periodontology and oral implantodologia. Guanabara Koogan; 1999.
4. Yin N, Chen S, Ouyang Y, Tang L, Yang J, Wang H. Biomimetic mineralization synthesis of hydroxyapatite bacterial cellulose nanocomposites. *Prog Nat Sci Mater Int.* 2011;21(6):472–7.
5. Bäckdahl H, Esguerra M, Delbro D, Risberg B, Gatenholm P. Engineering microporosity in bacterial cellulose scaffolds. *J Tissue Eng Regen Med.* 2008; 2(6):320–30.
6. Oréface RL, de Magalhães Pereira M, Mansur HS. Biomateriais: fundamentos e aplicações. *Cultura Médica;* 2006.
7. Tazi N, Zhang Z, Messaddeq Y, Almeida-Lopes L, Zanardi L, Levinson D, et al. Hydroxyapatite bioactivated bacterial cellulose promotes osteoblast growth and the formation of bone nodules. *AMB Express* 2012;2(1):61.
8. Saska S, Barud HS, Gaspar AMM, Marchetto R, Ribeiro SJL, Messaddeq Y. Bacterial cellulose-hydroxyapatite nanocomposites for bone regeneration. *Int J Biomater.* 2011;2011.
9. Silveira VÁS, Pereira AC, Amadei SU, de Mello Rode S. Aspecto interdisciplinar na pesquisa da biocompatibilidade dos materiais dentários. *Rev Biociências.* 2008;10(4).
10. Brasileiro Filho G. *Bogliolo patologia geral.* Guanabara Koogan; 1998.
11. Marques L, Holgado LA, Simoes RD, Pereira JD, Floriano JF, Mota LS, et al. Subcutaneous tissue reaction and cytotoxicity of polyvinylidene fluoride and polyvinylidene fluoride-trifluoroethylene blends associated with natural polymers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2013;101(7):1284-1293.
12. Park JE, Barbul A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *Am J Surg.* 2004;187(5):S11–S16.

13. Parirokh M, Mirsoltani B, Raof M, Tabrizchi H, Haghdoost AA. Comparative study of subcutaneous tissue responses to a novel root-end filling material and white and grey mineral trioxide aggregate. *Int Endod J* 2011;44(4):283–9.
14. Viana Viola N, Maria Guerreiro-Tanomaru J, Ferreira da Silva G, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, Cerri PS. Biocompatibility of an experimental MTA sealer implanted in the rat subcutaneous: Quantitative and immunohistochemical evaluation. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater* 2012;100B(7):1773-1781.
15. Klemm D, Schumann D, Kramer F, Heßler N, Hornung M, Schmauder H-P, et al. Nanocelluloses as innovative polymers in research and application. *Polysaccharides II* 2006. p. 49–96.
16. Czaja WK, Young DJ, Kawecki M, Brown RM. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. *Biomacromolecules*. 2007;8(1):1–12.
17. Klemm D, Schumann D, Udhardt U, Marsch S. Bacterial synthesized cellulose—artificial blood vessels for microsurgery. *Prog Polym Sci*.2001;26(9):1561–603.
18. Mello LR, Feltrin Y, Selbach R, Macedo Jr G, Spautz C, Haas LJ. Uso da celulose liofilizada em lesões de nervos periféricos com perda de substância. *Arq Neuropsiquiatr*. 2001;59(2-B):372–9.
19. Saska S, Scarel-Caminaga RM, Teixeira LN, Franchi LP, dos Santos RA, Gaspar AMM, et al. Characterization and in vitro evaluation of bacterial cellulose membranes functionalized with osteogenic growth peptide for bone tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med*. 2012;23(9):2253–66.
20. Santos Jr AR, Wada MLF. Polímeros biorreabsorvíveis como substrato para cultura de células e engenharia tecidual . *Polímeros*. 2007; 308–17.
21. Yaltirik M, Ozbas H, Bilgic B, Issever H. Reactions of Connective Tissue to Mineral Trioxide Aggregate and Amalgam. *J Endod*. 2004;30(2):95–9.
22. An YH, Woolf SK, Friedman RJ. Pre-clinical in vivo evaluation of orthopaedic bioabsorbable devices. *Biomaterials* 2000; 21(24):2635–52.

*Baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver), de 2011.

ANEXO I**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CEUA - USC****CERTIFICADO**

PROTOCOLO Nº 17/13

A CEUA USC dentro de suas competências e seguindo normas vigentes no Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal – CONCEA analisou o projeto "REAÇÃO TECIDUAL APÓS IMPLANTE SUBCUTÂNEO DE UM NOVO BIOMATERIAL COMPOSTO POR CELULOSE BACTERIANA INCORPORADO A HIDROXIAPATITA", sob a responsabilidade da pesquisadora Prof.^a Dra. Ângela Mitie Otta Kinoshita e o considerou APROVADO, com as seguintes recomendações:

1. Dose de dipirona precisa ser ajustada no projeto consta 500mg/kg, dose correta é 25mg/kg
2. Sugerimos que a via de inoculação de antibiótico e dipirona seja subcutânea
3. Periodicidade do antibiótico: 1x/dia, por 7 dias
4. Periodicidade da dipirona: 2x/dia, por três dias

Bauru, 19 de novembro de 2013.