

UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

GILBERTO ORÉFICE MARINHO

**REAÇÃO TECIDUAL APÓS IMPLANTE SUBCUTÂNEO
DE UM NOVO BIOMATERIAL COMPOSTO POR
CELULOSE BACTERIANA (CB) PRODUZIDA POR
*Gluconacetobacer Xylinus***

BAURU
2014

GILBERTO ORÉFICE MARINHO

**REAÇÃO TECIDUAL APÓS IMPLANTE SUBCUTÂNEO
DE UM NOVO BIOMATERIAL COMPOSTO POR
CELULOSE BACTERIANA (CB) PRODUZIDA POR
*Gluconacetobacter Xylinus***

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do título de Cirurgião Dentista em Odontologia sob orientação da Profa. Dra. Angela Mitie Otta Kinoshita

BAURU
2014

Marinho, Gilberto Orefice.

M3389r

Reação tecidual após implante subcutâneo de um novo biomaterial composto por celulose bacteriana (CB) produzida por *Gluconacetobacter Xylinus* / Gilberto Orefice Marinho -- 2014.

43f. : 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. Bicompatibilidade. 3. Reação tecidual. 4. Resposta inflamatória. I. Gomes, Danilo Fernando de Oliveira. II. Título.

GILBERTO ORÉFICE MARINHO

**REAÇÃO TECIDUAL APÓS IMPLANTE SUBCUTÂNEO DE UM NOVO
BIOMATERIAL COMPOSTO POR CELULOSE BACTERIANA (CB)
PRODUZIDA POR *Gluconacetobacter Xylinus***

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

Banca examinadora:

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

Prof. Dra. Pamela Leticia dos Santos
Universidade do Sagrado Coração

Prof. Dra. Camila Lopes Cardoso
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 Gilberto Oréfice Marinho.

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 GILBERTO ORÉFICE MARINHO, intitulado: **“Reação tecidual após implante subcutâneo de um novo biomaterial composto por celulose bacteriana produzida por Gluconacetobacter.”** Compuseram a banca examinadora os professores Dra. Ângela Mitie Otta Kinoshita (orientadora), Dra. Pâmela Letícia dos Santos e Dra. Camila Lopes Cardoso. Após a exposição oral, o candidato foi arguido 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 Mitie Otta Kinoshita (Orientadora)



Dra. Pâmela Letícia dos Santos (Avaliador 1)



Dra. Camila Lopes Cardoso (Avaliador 2)

AGRADECIMENTOS

À Deus por ser essencial em minha vida, que através da fé é meu guia, autor do meu destino, socorro na hora da angustia, que me deu o poder da vida e com ela a capacidade de pensar e me possibilitar ser quem eu sou.

À minha mãe, Aracele Aparecida Oréfice Marinho, fonte de amor infinito, voz de experiência que sempre me fez trilhar no caminho do bem. Aquela que abdicou de grande parte de seu tempo, vontades e sonhos para que eu me pudesse estudar e me graduar no curso pelo qual sempre quis, sem nada exigir em troca. Exemplo na vida de pessoa guerreira, generosa e altruísta, um ser inigualável, sem a qual eu ficaria sem chão e eu nada conseguiria fazer. A você mãe, minha eterna gratidão é pouco por tudo que a senhora fez por mim. Te amo

Ao meu pai, Gilberto Alves Marinho, que sempre me deu muito carinho, que apesar das dificuldades manteve se pé, que me deu bronca quando precisava, aquele que me ajudou quando necessitava e agora tem a possibilidade de ver o filho único se formando. O senhor é muito importante pra mim. Te amo

À minha família que me apoiou e incentivou, é a vocês que devo tudo, por me fazerem ser quem sou hoje. Por todo amor, por me fazer entender que é com a família que sempre podemos contar, por estarem sempre me apoiando, me aconselhando e me ajudando. Amo todos vocês.

Ao Romualdo Reginaldo Filho, uma pessoa especial que sempre me deu conforto emocional, forças para continuar quando quis desisti, companheiro, que me fez crescer e entender a vida como ela é, que me trouxe um pouco de tranquilidade, sabedoria, carinho e alegrias.

Às minhas amigas de Faculdade, Alana Santos, Aline Camiloti, Flávia Limoni, Jessica Ricci, Luana Ribeiro, Maria Eduarda Massola, Mylena Morassi e Tatiane Oliveira, com as quais esses 4 anos não seriam os mesmo, apesar do pouco tempo de convívio, quero que saibam que criamos um vínculo forte. Vocês me agregaram em suas vida e me possibilitaram ser como uma segunda família quando a de sangue não pode estar presente. A cada uma quero agradecer de forma especial por me aturaram e permitirem que eu possa chamar vocês de minhas AMIGAS. Alana, que com seu jeito de menina moça, toda delicada, me cativou e me fez aprender o valor de certas coisas e o valor de uma amizade como a sua, não tem preço. Aline, que com seu jeito brincalhão, me fez entender que não podemos e não devemos levar tudo tão a sério, a vida é curta demais para darmos importância a bobagens. Flávia, sempre uma companheira, parceira que me

ajudou e me escutou quando precisava, que mesmo que com ironia demonstrava seu carinho, muito obrigado por tudo. Jessica, apesar de não estarmos no mesmo curso, acabamos nos conhecendo e me aceitou com todo carinho. Luana, sempre com seu jeito irreverente e único de ser, marcou minha vida com suas histórias e experiências da vida. Maria Eduarda, jeito de princesa, a primeira do grupo com quem tive contato, a amizade foi criada logo no primeiro ano e em tão pouco tempo já me acolheu como da família. Mylena Morassi, meiga e descontraída, me conquistou com a simplicidade e disposição em ajudar os outros, principalmente a mim. Tatiane, pessoa de bondade sem igual e inocência que cativa. Quero que todas vocês saibam que serão eternas no meu coração, quero que nossos caminhos se cruzem muitas vezes ainda nessa vida e se precisarem de algo não pensem duas vezes em me procurar que estarei ali de prontidão, sentirei saudades de vocês e se tem alguém nesse mundo que torce pelo sucesso de vocês, esse alguém sou eu. Além dos agradecimentos, fica aqui meu pedido de perdão por atormentar vocês e nem sempre ser um amigo tão bom quanto vocês mereciam e que poderia ser, sei que falhei em alguns aspectos com vocês, mas meu carinho e gratidão serão eternos a vocês, meninas, minhas eternas Divas da Odonto.

À minha orientadora, Dra. Angela Kinoshita que com toda paciência e dedicação que possibilitou a execução desse trabalho. Me ajudou a conseguir bolsa de incentivo a pesquisa, que correu atrás de muitas coisas e se disponibilizou, dando total apoio para que pudesse concluir esta monografia. Angela, meus sinceros agradecimentos por tudo, muito obrigado.

Às Professoras Dras. Pamela Leticia dos Santos e Camila Lopes Cardoso que aceitaram de prontidão e de forma carinhosa, fazerem parte da banca examinadora da minha conclusão de curso, além de serem excelentes profissionais, dedicadas e atenciosas que contagiam a todos.

Aos meus professores, ao coordenado e a ex coordenadora do curso que me foram fonte de conhecimento e ética. Mais que profissionais, se aproximaram de tal forma que foram grandes amigos, transmitiram o conhecimento e nos ajudava a desenvolver o amor pela profissão e o desejo de sermos pessoas melhores, nos incentivam e nos apoiavam, nos valorizam e nos corrigiam quando necessário fosse, pela disposição e pela sensibilidade que fazem de vocês profissionais diferenciados. Muito Obrigado a cada um de vocês.

Às minhas colegas, Karla Massari e Mariana Marques, por serem parceiras nesse projeto, ajudarem e colaborarem com o desenvolver desde o preparo das membranas, passando pela cirurgia nos animais e contabilização das células.

Ao Jordan Lima por auxiliar e ensinar as técnicas cirúrgicas realizadas. À Marcia Chaves pela confecção das membranas. Ao Wilson Orcini e Maira Couto pelo apoio técnico. À Dulce Constantino e aos demais funcionários do biotério pelos cuidados dos animais, antes, durante e depois das cirurgias e eutanásias.

À USC que ofereceu estruturas adequadas e os melhores profissionais para que concluísse minha graduação de forma a estar apto ao mercado de trabalho, incentivar sempre a busca por melhorias e me manter atualizado para me destacar como profissional.

À FAPESP que aprovou meu projeto de iniciação científica, me oferecendo uma bolsa de estudos com a qual pude dar continuidade a meus estudos, uma vez que foi conseguida em uma fase difícil economicamente para minha família, a partir da iniciação que pude desenvolver também meu trabalho de conclusão de curso. Obrigado por oferecerem essa chance e possibilitarem essa etapa de minha formação.

Considerando esta monografia como resultado de uma caminhada que não começou na USC, agradecer pode não ser tarefa fácil, nem justa. Para não correr o risco da injustiça, agradeço também a todos que de alguma forma passaram pela minha vida e contribuíram para a construção de quem sou hoje.

É claro, que não é possível parar. Estamos na grande jornada da vida e aprender fazendo e fazer aprendendo é nosso caminho natural. A cada dia, a cada hora. Por fim, quero dizer que é absolutamente extraordinário ver a vida fazendo sua obra, nos transformando a cada momento, nos fazendo melhores, mais solidários. E a vida pode ser uma pequena poesia se realizando no nosso dia a dia no agir de nossos corações e de nossas mentes. tocar o coração do outro é o sentido da vida e vocês podem ter certeza tocaram meu coração.

“Não sei se a vida é curta ou longa para nós, mas sei que nada do que vivemos tem sentido, se não tocarmos o coração das pessoas. Muitas vezes basta ser: colo que acolhe, braço que envolve, palavra que conforta, silêncio que respeita, alegria que contagia, lágrima que corre, olhar que acaricia, desejo que sacia, amor que promove. E isso não é coisa de outro mundo, é o que dá sentido à vida. É o que faz com que ela não seja nem curta, nem longa demais, mas que seja intensa, verdadeira, pura enquanto durar.”

(Cora Coralina)

RESUMO

A reconstrução dos tecidos ósseos perdidos como consequência de processos patológicos ou traumáticos é um problema freqüente na odontologia. Várias técnicas têm sido desenvolvidas e aprimoradas, entre elas, a Regeneração Óssea Guiada (ROG), na qual uma membrana oclusiva é utilizada para selar o espaço do defeito ósseo, evitando, assim, a invasão de células dos tecidos epitelial e conjuntivo. Um biomaterial que vem sendo estudado para ser utilizada como membranas oclusivas é a celulose bacteriana (CB). A CB é produzida a partir da *Gluconacetobacter xylinus* e se difere de seu par vegetal, principalmente devido ao seu caráter de fibras nanométricas, contra o caráter micrométrico da vegetal. BCs são extraídas através da parede celular da *G xylinus*, com isso sua estrutura macroscópica é mecanicamente e fisicamente mais resistente, característica importante de membranas oclusivas. Uma das primeiras etapas para testes de novos materiais para uso clínico são os testes de biocompatibilidade. 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 membrana oclusiva para procedimento de ROG. Foram utilizados 18 ratos machos (*Rattus norvegicus*, Wistar) os quais sofreram, cirurgicamente, 2 incisões no dorso para implante subcutâneo do material a ser testado, CB, bem como do PTFE (Politetrafluoretileno) material comercial comprovadamente biocompatível. Após 7, 15 e 60 dia, 6 animais foram eutanasiados, 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 espessura 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 $P < 0.05$. A membrana de CB reagiu como o esperado, de forma que o número de células mononucleares teve um aumento com o passar do tempo e as células polimorfonucleares que eram abundantes nos períodos iniciais tiveram seu numero reduzido ao longo do processo, fenômeno esse visto em uma reação de reparo normal. O resultado deste trabalho complementa estudos prévios a respeito da biocompatibilidade de CB, contribuindo para seu uso como biomaterial.

Palavras-chave: Celulose Bacteriana. Biocompatibilidade. Reação tecidual. Resposta inflamatória.

ABSTRACT

The reconstruction of bone tissue lost as a result of traumatic or pathological processes is a common problem in dentistry. Several techniques have been developed and improved, including the Guided Bone Regeneration(GBR), in which an occlusive membrane is used to seal the space of the bone defect, preventing invasion of epithelial cells and connective tissues. A biomaterial that has been studied for use as occlusive membranes is bacterial cellulose (BC). The BC is produced from *Gluconacetobacter xylinus* and differs from vegetable ones, mainly due to its character of nanoscale fibers, against micrometer character of the vegetation. BCs are extracted through the cell wall of *G xylinus* with a macroscopic structure that is mechanically and physically resistant that are important features of occlusive membranes. One of the first steps for new materials for the medical tests are biocompatibility tests. Among these, the tissue response to subcutaneous implantation provides important information about the general response of the body through the inflammatory pattern observed. Thus, the study of tissue response produced by this new biomaterial is necessary and valuable for future applications as occlusive membrane for GBR. Eighteen male rats (*Rattus norvegicus*, *Wistar*) were used in which two surgically incisions in the dorsal subcutaneous were made to implant the material to be tested, CB, and PTFE (polytetrafluoroethylene) a biocompatible commercial material. After 7, 15 and 60 days, 6 animals were euthanized, and tissue reaction examined microscopically by observing the presence of necrosis, fibrous capsule, inflammatory cells. Six images of each sample were used to account the amount of mononuclears and polymorphonuclears and giant cells, and also fibrous capsule presence. 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 $p < 0.05$. The CB membrane produced the same inflammatory pattern of PTFE. The number of mononuclear cells was increased with time and polymorphonuclear cells that were abundant in the initial stages were reducing in number during the process, a phenomenon seen in a reaction normal repair. The result of this work adds previous studies on the biocompatibility of CB, contributing to its use as a biomaterial.

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

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL.....	16
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	16
3	METODOLOGIA	17
3.1	PREPARO DA MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA.....	17
3.2	LOCAL E GRUPOS DE ESTUDO	19
3.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	19
3.4	PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	20
3.4.1	Análise Macroscópica	23
3.4.2	Análise Microscópica	23
4	RESULTADOS	24
4.1	ANÁLISE MACROSCÓPICA.....	25
4.2	ANÁLISE MICROSCÓPICA	25
4.3	ANÁLISE MORFOMÉTRICA	27
5	DISCUSSÃO	34
6	CONCLUSÃO	37
	REFERÊNCIAS	38
	ANEXOS A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	41

1 INTRODUÇÃO

A necessidade de desenvolvimento de novos materiais e da adaptação dos já existentes, para uso biotecnológico, levaram ao surgimento de uma nova área de pesquisa: os biomateriais. Uma das definições correntes diz que biomateriais são “materiais (sintéticos ou naturais; sólidos ou, às vezes, líquidos) utilizados em dispositivos médicos ou em contato com sistemas biológicos”(1). Outra definição encontrada na literatura é “parte de um sistema que trata, aumenta ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo”(2).

A ciência dos biomateriais vem experimentando grandes progressos nos últimos anos, particularmente nas áreas da ortopedia e odontologia. A primeira geração de biomateriais consistia de materiais originalmente manufaturados para fins industriais e que foram adaptados para aplicações médicas. Estes estão sendo progressivamente substituídos por novos materiais que foram e estão sendo desenvolvidos e aperfeiçoados especificamente para fins cirúrgicos.

A expansão das pesquisas tem acentuado a busca de novas classes de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis com bioatividade específica e controlável (3), para serem usados como suportes para culturas celulares (*scaffolds*) (4), na tentativa de reconstruir tecidos *in vitro*. Nos últimos anos, uma grande variedade de biomateriais vem sendo desenvolvida com diferentes propriedades físico-químicas e mecânicas, dependendo da aplicação biomédica prevista, incluindo regeneração tecidual, sistemas de liberação de medicamentos, novos enxertos vasculares, ou suportes para engenharia de tecidos *in vitro* e *in vivo* (5,6). Assim, para que um biomaterial possa ser vinculado ao corpo humano ele deve satisfazer a uma série de exigências. Além de biocompatível e biofuncional, deve ser atóxico, fácil de esterilizar e apresentar propriedades mecânicas adequadas, dependendo do propósito da aplicação (7). De um modo geral um material biocompatível não deve provocar reação inflamatória crônica ou aguda do tecido e não deve apresentar diferenças significativas entre o material implantado e o material circunvizinho. O biomaterial deve garantir não só a restauração do tecido, mas também deve garantir que não exerça, a longo ou médio prazo, qualquer distúrbio ao corpo do paciente. Portanto, a escolha do material é crítica. Obter a biocompatibilidade representa uma tarefa interdisciplinar, que envolve pesquisadores de varias áreas. Dessa maneira, a interação das células com as superfícies dos materiais é de extrema importância na efetividade de implantes médicos (8), podendo definir o seu grau de rejeição. O conhecimento dos mecanismos básicos de interação célula-material e um melhor entendimento dos processos em nível celular durante a

adesão podem colaborar para o desenvolvimento de novos biomateriais e para o desenvolvimento de novos produtos biomédicos (9).

Através do processo inflamatório que os tecidos vivos reagem contra todas as agressões, incluindo o ato cirúrgico e a interação entre tecidos e “corpo estranho”, no caso o biomaterial. A reação inflamatória apresenta respostas benéficas e maléficas ao organismo (10).

Se não houvesse processo inflamatório, microrganismos estariam livres para penetrar nas mucosas e feridas, proliferar, disseminar e comprometer o hospedeiro. A inflamação é fundamental para cicatrização e reparo de feridas (10).

Existem ocasiões onde o processo inflamatório pode interferir na função do órgão acometido, podendo até mesmo levar a uma condição mais ameaçadora que a agressão inicial, assumindo a inflamação um papel destrutivo (10).

A cirurgia de implantação de biomaterial representa um trauma, capaz por si só de induzir uma resposta inflamatória. Além disso dependendo da natureza e características do biomaterial empregado, o organismo pode identificar componentes estranhos e reagir imunológica e inflamatoriamente a sua presença (10).

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. 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 em relação aos experimentos com cultura de células (7). Tem sido utilizado com sucesso em pesquisas envolvendo novos materiais (11-14).

Embora seja considerada uma reação local, a inflamação causa reações gerais em consequência da ação direta de componentes do agente inflamatório, liberação de substâncias de ação geral por células que participam do processo inflamatório, fagocitose, lise até a coagulação do sangue (10).

As propriedades físico químicas dos compósitos do biomaterial, assim como a topografia e forma do material na interface com os tecidos ajudarão a definir o tipo, a intensidade e a duração da resposta inflamatória. O tecido de granulação (macrófagos, fibroblastos e angiogênese) e células grandes (tipo corpo estranho) poderão compor a reação quando o organismo reconhece no implante um corpo estranho. Por outro lado, se o implante for de material mais inerte e interagir adequadamente com os tecidos conjuntivos, a resposta inflamatória poderá ser mínima, com rápida reabsorção por apoptose das células inflamatórias, podendo gerar apenas uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso de espessura variável.(10)

Um biomaterial que vem sendo estudado para procedimentos de reparo ósseo é a Celulose bacteriana(15). A celulose produzida por bactérias possui a mesma estrutura química da celulose produzida por plantas, porém é morfologicamente diferente. Enquanto a celulose sintetizada por plantas necessita de processos de purificação complexos, dispendiosos e altamente poluentes para a extração da lignina e da hemicelulose, o processo de obtenção e de purificação de celulose bacteriana (CB) é bastante simples (16). A CB é produzida a partir da *Gluconacetobacter xylinus* e se difere de seu par vegetal, principalmente devido ao seu caráter de fibras nanométricas, contra o caráter micrométrico da vegetal. CBs são extraídas através da parede celular da *G xylinus*, com isso sua estrutura macroscópica é mecanicamente e fisicamente mais resistente, característica importante de membranas oclusivas. A membrana de CB é altamente hidratada, apresenta alta elasticidade, resistência mecânica e é facilmente moldável. A membrana possui uma estrutura 3D composta de uma rede ultrafina de “nanoceluloses”, o que resulta em uma grande superfície contendo nanoporos. Já vem sendo utilizada em algumas aplicações como substitutos de pele e curativos (17). Outras características importantes apresentadas pelas CBs de modo geral são a biocompatibilidade, bioinerticidade, biodegradabilidade e permeabilidade.

Inicialmente, a produção de celulose por bactérias do gênero *Gluconacetobacter* foi vista como uma forma de estudar as vias metabólicas de biossíntese deste biopolímero e extrapolá-las

para o processo em plantas. Contudo, o desenvolvimento de processos de produção de CB tomou novos caminhos. A CB obtida por essas bactérias tem sido produzida industrialmente e utilizada em diversas aplicações, desde membranas para aparelhos de áudio de alta qualidade até materiais para a área biomédica, como adjuvante em tratamento de lesões da pele como curativos no tratamento de lesões, queimaduras e úlceras; visto que auxilia no alívio das dores causadas pelas feridas, protege contra infecções e acelera o processo de cicatrização(18) (19) Estudos recentes têm explorado novas aplicações como, por exemplo, a produção de pequenos vasos sanguíneos(20) e arcabouços (scaffolds) para engenharia de tecidos (21).

A CB pode ser produzida 365 dias por ano, independente das condições climáticas ou ambientais, sua produção através do cultivo de *G. xylinus* em ambiente laboratorial ou controlado, permite essa capacidade. Apesar de todas essas qualidades, ainda não existe uma planta de produção de CB em grande escala, devido à falta de otimização do cultivo, ocasionando baixos rendimentos, incompatíveis com a demanda por celulose. Existe atualmente, um grande interesse com relação ao aumento substancial da produtividade da CB, diversos autores têm trabalhado sobre este enfoque, utilizando diferentes formas de cultivo como em biorreatores e cultivos agitados, em contraste com o cultivo tradicional de meio de cultivo estático, além de variações nas condições de suplementação (22).

A CB é biocompatível, porém possui lenta degradação no corpo humano, devido à ausência de enzimas capazes de romper as ligações químicas entre as moléculas de glicose(23). É de interesse científico e tecnológico a busca de propriedades que direcionem a formação de novos tecidos, por exemplo, tecido ósseo e/ou cartilaginoso, em materiais de degradação lenta e/ou controlada. Trabalhos reportando o desenvolvimento de biomateriais compósitos de CB com essas propriedades, tais como celulose bacteriana-glucomanana(24)(25) têm tido crescente interesse na literatura.

Sendo assim, esse projeto propõe o estudo da reação tecidual do novo biomaterial, Celulose bacteriana obtida por *Gluconacetobacter xylinus* através de implante subcutâneo do mesmo no dorso de ratos, para que futuramente o mesmo seja utilizado como membrana oclusiva na odontologia.

Na literatura observamos que, para a avaliação da biocompatibilidade do enxerto em relação ao tecido hospedeiro, existem vários métodos. Têm-se: cultura de células e tecidos, análise histoquímica (26), estudos bioquímicos (27), estudos histológicos e estudos de perfusão

de todo um órgão. Existem também medidas de peso, rigidez, elasticidade, alongamento, quebras na mecânica e alterações na superfície que podem ser revelados na microscopia eletrônica (28). Porém, o método mais utilizado em estudos experimentais é a análise histológica. Neste trabalho optamos pela análise histológica por ser um método simples e por fornecer informações gerais da resposta tecidual ao material implantado.

Uma ferida é representada pela interrupção da continuidade de um tecido corpóreo, em maior ou menor extensão, causada por qualquer tipo de trauma físico, químico, mecânico ou desencadeado por uma enfermidade clínica que aciona de imediato as frentes de defesa orgânicas para reparo. O manejo tradicional de um ferimento envolve a desinfecção, debridamento e previsão de um ambiente úmido que estimule o estabelecimento do melhor ambiente para que ocorra o processo natural de cura (29). O processo de reparação tecidual compreende dois mecanismos de restauração: regeneração e cicatrização. A regeneração ocorre com a reposição tecidual original. O trauma inicial gera uma resposta inflamatória aguda que se manifesta através de edema, formação de exudato seroso, rico em leucócitos em torno de 72 horas. As células epidérmicas das margens da ferida começam a proliferar e migrar sobre o leito da ferida, ocluindo sua superfície, promovendo a cicatrização(30). Assim, a cicatrização é dividida em três fases fundamentais: inflamatória, proliferativa e maturação.

Na fase inflamatória, ocorre fenômenos vasculares e químicos, destacando-se o aumento da permeabilidade vascular, causada pela liberação de histamina e serotonina. Segue-se a formação de bradicinina e prostaglandina, a partir de globulinas plasmáticas, que levam a prorrogação do processo e permite a chegada de granulócitos e monócitos. Os primeiros desempenham importante papel na remoção de resíduos celulares no local da lesão. Essa fase também consiste no recrutamento de leucócitos para o local da lesão. Os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias a aparecer, mas na ausência de infecção e restos celulares, diminuem rapidamente em número(31).

Na fase proliferativa, a lesão é recoberta por tecido epitelial. É nesta fase que aparecem os fibroblastos, de origem discutida e que apresentam intensa capacidade de síntese proteica e multiplicação celular, produzindo uma substância fundamental (mucopolissacarídeos, glicosaminoglicanos e mucoproteínas) e o colágeno. Ocorre proliferação de capilares a partir de resíduos venulares. As células endoteliais, a medida que se multiplicam, atraem-se tendendo a formar vasos. Nessa fase há proliferação celular de fibroblastos, macrófagos e vasos sanguíneos, além da proliferação e

migração de queratocitos, células endoteliais e reepitelização, formando tecido de granulação com grande quantidade de colágeno tipo III (32).

Na última fase, a maturação, a maioria das fibras colágeno tipo III é substituída por fibras tipo I, e o excesso de colágeno é degradado por enzimas proteolíticas que promove a remodelação do tecido.(33) Nessa mesma fase, na medida que o colágeno vai sendo produzido, ocorre a oclusão da ferida, os capilares se organizam, os fibroblastos diminuem em número e observa-se a queda da produção de substância fundamental. As fases da cicatrização não são processos isolados, apresentam dinamismo visível, que, com frequência, sobrepõe se uns aos outros. Numa mesma fase, podemos encontrar os elementos da fase subsequente. (34)

2 OBJETIVOS

Apresentam-se nas seções abaixo o objetivo geral e os objetivos específicos da pesquisa.

2.1 OBJETIVO GERAL

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

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

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

3 METODOLOGIA

Apresentam-se abaixo a metodologia utilizada na pesquisa.

3.1 PREPARO DA MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA

A membrana de celulose bacteriana (CB) foi produzida com a colaboração de Prof. Dra. 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 (Figura1). Posteriormente, lavagens adicionais com água corrente foram realizadas, até neutralizar o pH, e com água destilada para remoção dos sais (Figura 2).



Figura1: Membrana de CB em
Água ultra pura

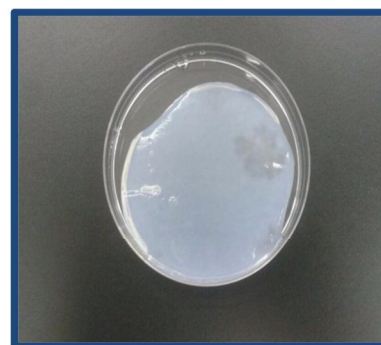


Figura2: Membrana de CB em
Placa Petri

Após esses passos, a membrana foi seca em estufa a 50°C (Medicate), por três dias, sendo que a cada duas horas, a membrana era descolada do recipiente e pesada em balança analítica para controlar a secagem e garantir que toda umidade fosse extraída (Figuras 3 e 4).

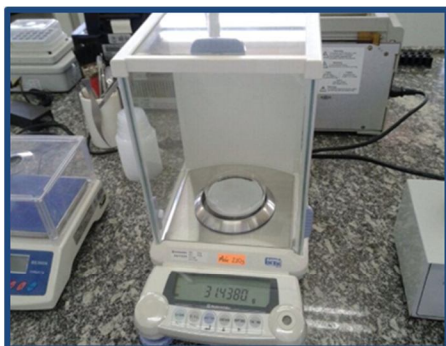


Figura 3: membrana pesada em balança analítica pré secagem. A massa é de ~31,4g



Figura 4: membrana pesada em balança analítica pós secagem. A massa é ~7,3g

A membrana foi marcada e cortada em quadrados de 0,5 cm X 0,5 cm. Para diminuir a agressão tecidual, as pontas dos quadrados de membrana foram retiradas, deixando os com extremidades levemente arredondadas. Após essa etapa, os fragmentos foram acondicionados em placas de Petri, seladas e esterilizadas no IPEN, por meio da radiação gama com dose de 25kGy. O mesmo procedimento de preparo (corte e esterilização) foi realizado com o material de controle PTFE (Politetrafluoretileno) (figura 5). A figura 6 mostram os biomateriais lacrados, antes do procedimento cirúrgico.

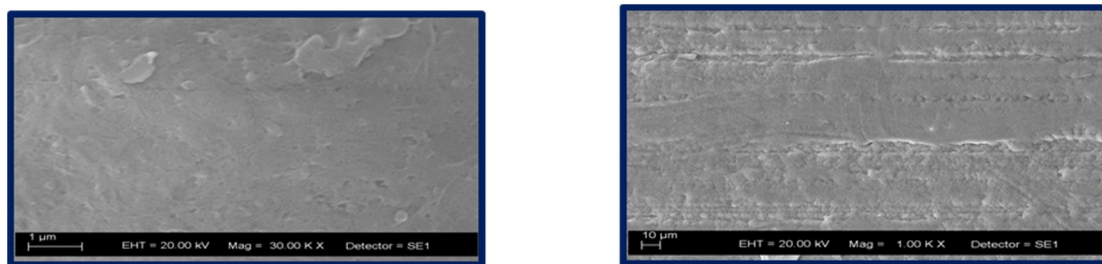


Figura 5: Material PTFE que foi usado como controle, já recortado e pronto para envio para esterilização por radiação gama



Figura 6: Material esterilizado por radiação gama no IPEN, pronto para o uso.

Uma fração do material foi submetido ao registro de imagens por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), equipamento Zeiss, e a figura 7 mostra a imagem obtida.



Celulose Bacteriana

PTFE

Figura 7: Imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura das superfícies dos materiais antes do implante subcutâneo no dorso dos animais.

3.2 LOCAL E GRUPOS DE ESTUDO

Foram utilizados 18 ratos machos adultos (*rattus novergicus*) linhagem *Wistar*, obtidos do Biotério da Universidade Sagrado Coração (USC). 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 foram submetidos a cirurgia de implante subcutâneo do material a ser testado, membrana de CB bem como do PTFE (Politetrafluoretileno). Após 7, 15 e 60 dias, 6 animais foram submetidos à eutanásia e a reação tecidual analisada microscopicamente.

3.3 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 a seguir:

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 pelo autor.

Em cada animal foi implantado uma fração de cada biomaterial, sendo eles, membrana de CB e membranas de PTFE, ao qual tomamos o cuidado de não repetir a localização dentro do mesmo grupo, e assim descartarmos a possível influência da localização do implante nos resultados.

Após os períodos de preservação citados no quadro acima os animais foram submetidos a eutanásia por uso de dose letal de barbitúricos. As áreas contendo os materiais implantados foram coletadas para realização das análises.

3.4 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Foi medida a massa dos ratos e feito uma média dos valores para determinar a dose dos anestésicos (figura 7). Administrou-se um relaxante muscular de cloridrato de xilazina (Rompum-Bayer, São Paulo, Brazil) 13mg/kg de peso corpóreo, somado a um anestésico geral de cloridrato de Ketamina (Dopalen – Vetbrands) 87mg/kg de peso corpóreo pela técnica da aplicação intraperitoneal. (figura 8).

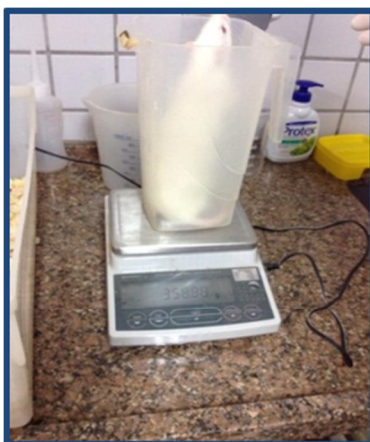


Figura 7: Pesagem dos animais.



Figura 8: Aplicação de relaxante muscular associado ao anestésico geral via IP

Após a anestesia foi feita a remoção dos pêlos do dorso dos ratos (figura 9) onde o material seria implantado, antissepsia com gaze embebida em clorexidina 2% com auxílio de porta agulha. (Figura10).

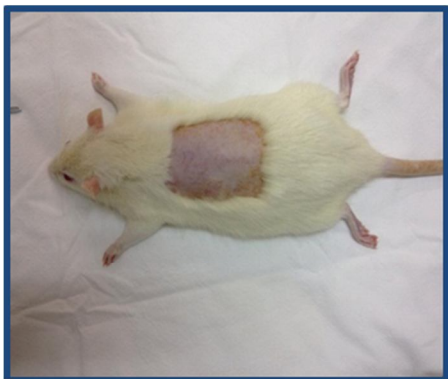


Figura 9: Rato após a anestesia e tricotomia.

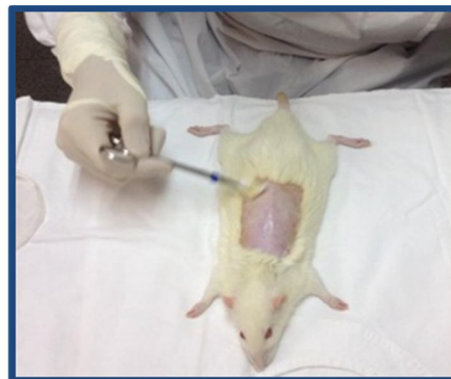


Figura 10: Assepsia do dorso do animal com Clorexidina 2%

Então sobre a montagem dos campos estéreis (Figura 11), confeccionou-se duas incisões de aproximadamente 0,5cm com lâmina de bisturi nº 15 no dorso dos animais, sendo que uma das incisões corresponde ao leito responsável pelo implante da membrana de PTFE e a segunda incisão, o local de escolha para colocação da membrana de celulose bacteriana (figura 12).



Figura 11: mesa cirúrgica montada.

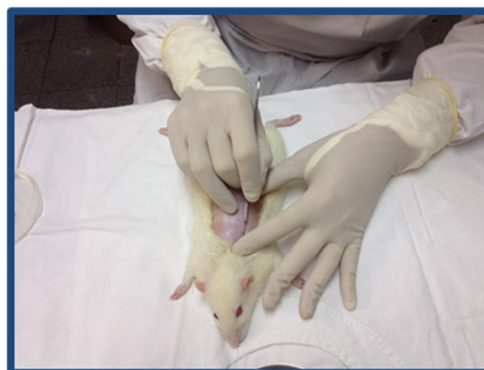


Figura 12: incisão com lamina de bisturi no dorso dos ratos.

A seguir, foi realizada a divulsão dos tecidos com tesoura de ponta romba (figura13) para adaptação dos biomateriais no subcutâneo e manter a membrana afastada da região do ponto da sutura, para que não houvesse interferências na resposta inflamatória. A figura 14 mostra a acomodação das membranas nas incisões (figura 14). No corte superior foi inserida a membrana

de celulose bacteriana, na incisão inferior, foi colocada a membrana de PTFE. O posicionamento foi feito com auxílio de pinças.

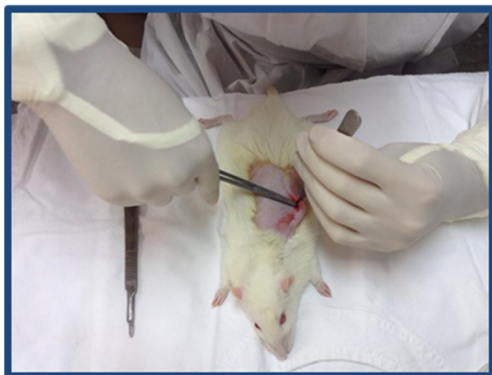


Figura13: divulsão dos tecidos incisionados.



Figura14: posicionamento das membranas no leito cirúrgico

A sutura das incisões foi realizada com fio de nylon 4-0 (figura15), com auxílio de porta agulha e pinça. Um ponto simples foi o suficiente para coaptar as bordas do tecido. Aplicou-se antimicrobiano (Enrofloxacino 10mg/kg, subcutâneo 1x ao dia por 7 dias) e dipirona sódica (25mg/kg, subcutâneo, 2x ao dia por 3 dias). As eutanásias foram programadas para os períodos de 7, 15 e 60 dias.



Figura15: sutura das incisões com fio de nylon

A eutanásia foi induzida por meio de sobredosagem de barbitúricos, associação de Tiopental (150mg/kg) e Cloridrato de Lidocaina (10mg/kg). A aplicação foi feita por via intraperitoneal, com seringas descartáveis para aplicação de insulinas em pacientes diabéticos.

Após a ação da solução eutanasiante, incisionou-se novamente o centro dorso com lâmina de bisturi numero 21. Foi realizada uma incisão única e estendida para localização dos biomateriais implantados no subcutâneo. Recortou-se, então, individualmente, os tecidos ao redor de cada biomaterial de forma circular com uma tesoura cirúrgica reta. As peças coletadas foram fixadas em formol 10% para processamento histológico.

3.4.1 Análise Macroscópica

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

3.4.2 Análise Microscópica

As peças foram fixadas em formol a 10% por 48 horas para inclusão em parafina. Após o período de manutenção no formol, foram cortadas ao meio, na região central do biomaterial, com o uso de lâmina de aço (figura 16 e figura 17) a fim de se obter cortes histológicos com a maior extensão do biomaterial e tecido adjacente. Posteriormente as peças foram inclusas em parafina para confecção dos cortes histológicos.



Figura 16: peça recortada no envolvendo o centro da membrana com lâmina de aço

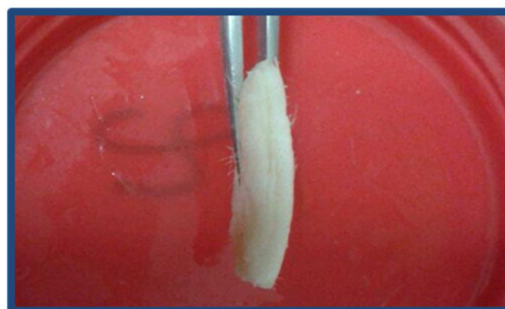


Figura 17: Fragmento de tecido subcutâneo contendo a membrana.

s cortes microscópicos foram obtidos no sentido longitudinal com seis micrômetros de espessura e corados pelo método da hematoxilina/eosina. Foram analisados e descritos em todas as suas

peculiaridades, selecionados e fotografados os dados mais relevantes, no próprio microscópio, para a competente comprovação.

A seleção das regiões para análise foi feita de forma padronizada. Em torno da membrana foram escolhidas seis áreas, sendo uma em cada ponta da membrana, duas mais ao centro superior e duas ao centro inferior, em lente de aumento 40x (Figura18)

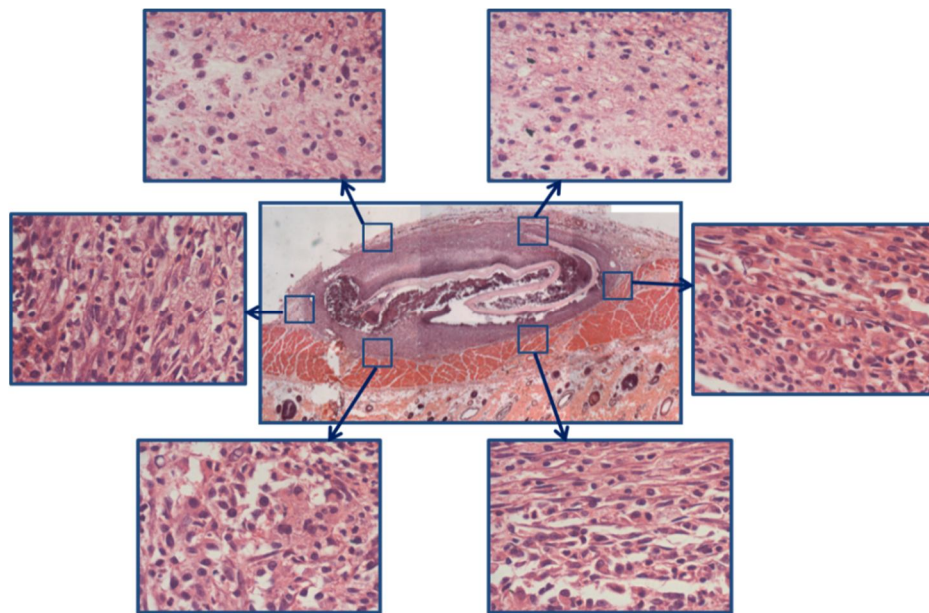


Figura18: Padrão de seleção das áreas analisadas

Para a avaliação do padrão inflamatório, foi adotado o procedimento de Yaltric (35) o mesmo utilizado por Marques et al (12) , seguindo o score descrito na tabela 2.

Tabela 2 - Scores da resposta inflamatória

Resposta Inflamatória	Score
Ausente: nenhuma célula	1
Discreta: < 25 células	2
Moderada: entre 25 e 125 células	3
Severa: > 125	4

Fonte: Yaltric (2004).

4 RESULTADOS

TEXTO...

4.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA

Durante o período experimental, não houve perda de animais e nenhum dos animais apresentou sinais de quadro de dor. Após a eutanásia ser realizada os animais foram incisionados no dorso com lâmina de bisturi 21 para remoção dos implantes subcutâneos. A figura 19 mostra o aspecto dos biomateriais após 7 dias de preservação, que mostra que não há sinais de necrose. Apresenta sinais de inflamação como área sutilmente edemaciada, área com hematoma devido ao trauma da incisão, a resposta tecidual não foi severa. A membrana de PTFE foi ligeiramente mais difícil de ser encontrada

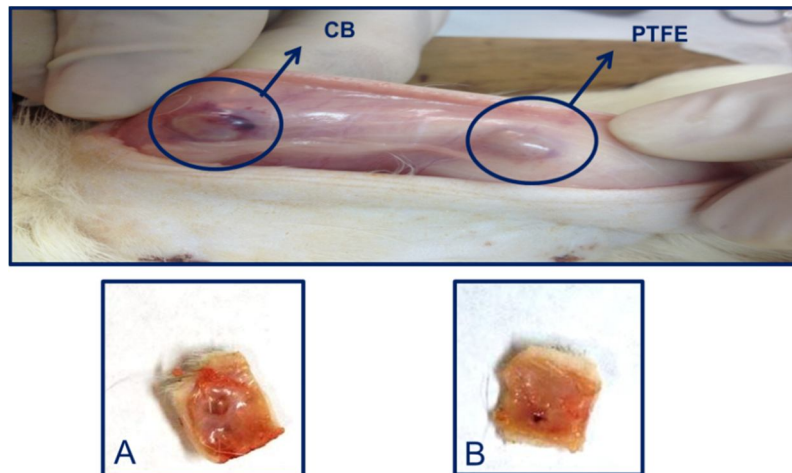


Figura 19: Materiais região subcutânea e após a remoção.

A- CB

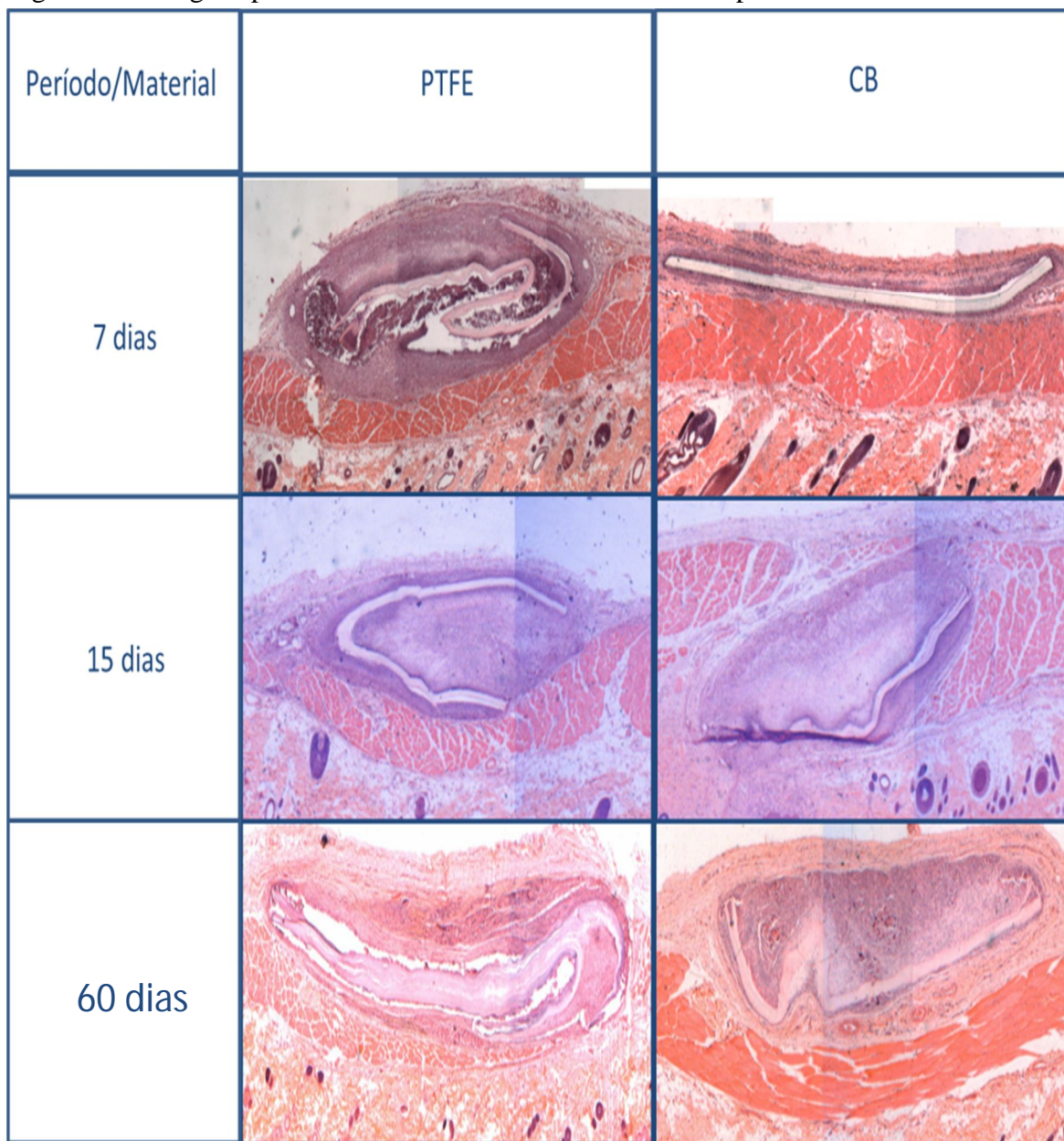
B- PTFE

4.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA

A análise foi feita em microscópio óptico a partir de tomadas fotográficas das lâminas, sendo primeiramente realizada a panorâmica da membrana em lente de menor aumento 4x (Figura 20). Com o aumento da lente para 40x, segundo já descrito, foram analisadas 6 áreas de cada lâmina como exemplifica a Figura 21 foi realizada a contagem de células inflamatórias

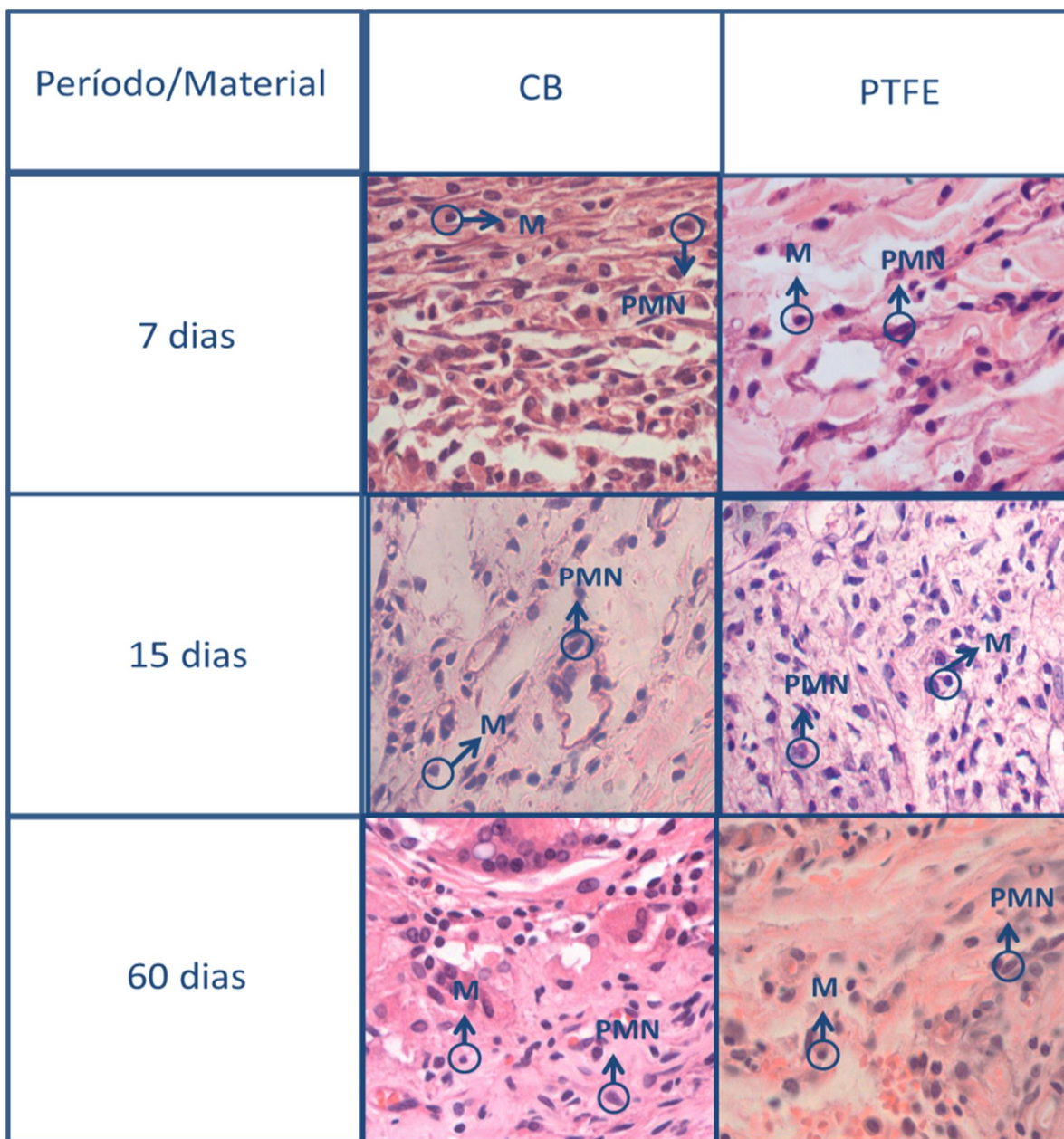
(mononucleares e polimorfonucleares) para comparar o número de células presentes na reação do implante subcutâneo em cada uma das peças.

Figura 20 - Imagens panorâmicas de cada membrana em cada período



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 21 - Imagens das lâminas de cada membrana em cada período



Fonte: Elaborada pelo autor.

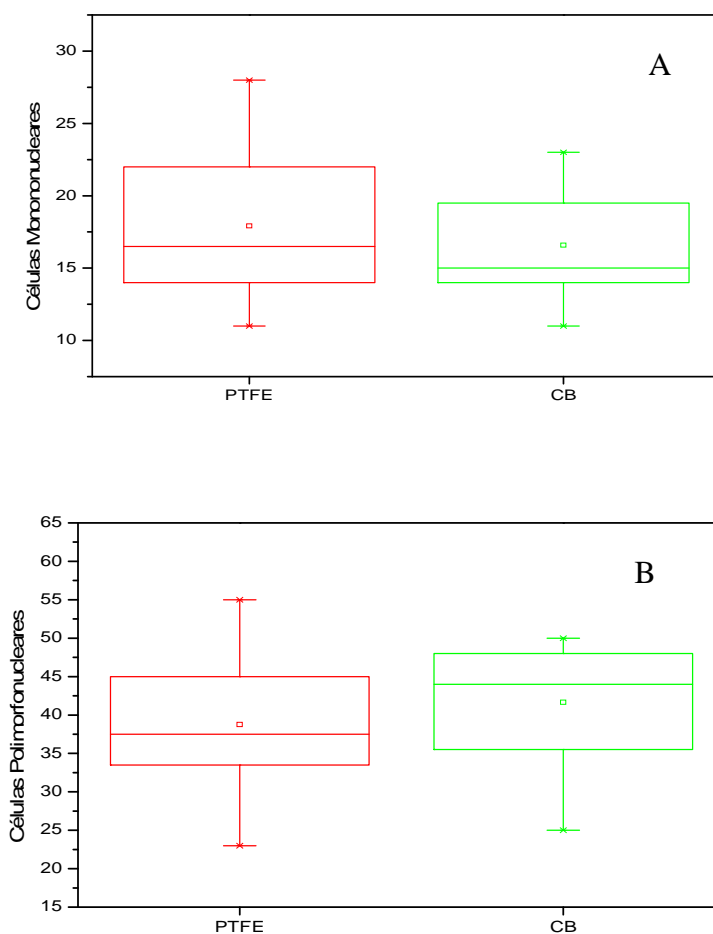
4.3 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

A fim de se 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. A figura 22 representa o gráfico Box-Plot (mediana e quartis) do número de células inflamatórias mononucleares (A) e Polimorfonucleares (B) 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, as figuras 23 e 24 mostram essa representação para os períodos de 15 e 60 dias.

As figuras 25 e 26 mostram como variaram o número de células mononucleares e polimorfonucleares ao longo do tempo para cada tipo de material estudado.

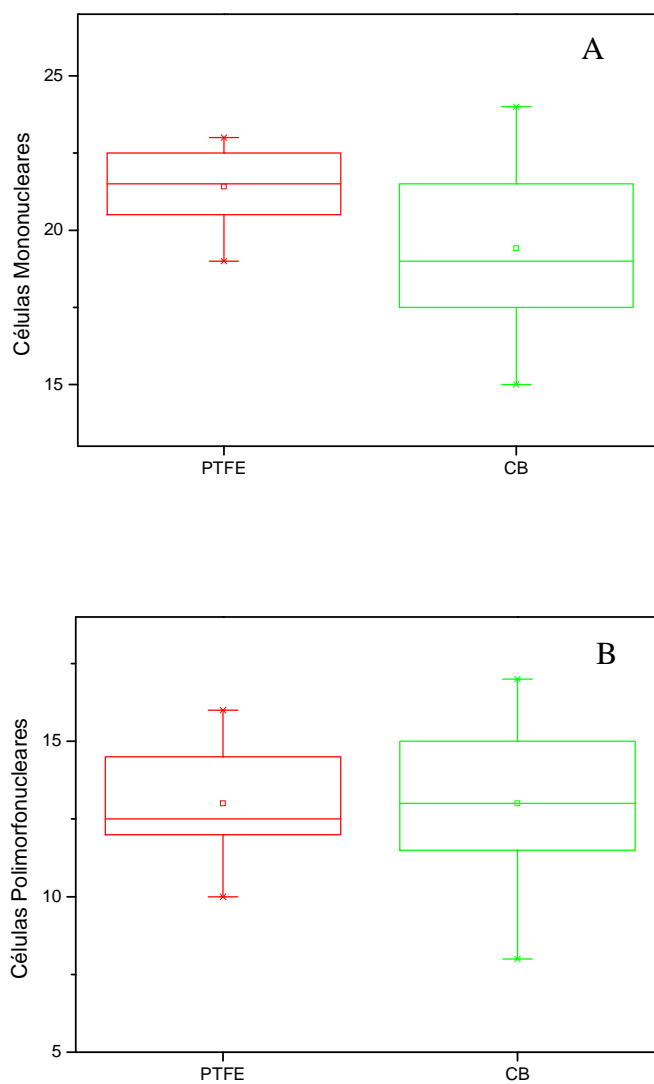
Figura 22 - Gráfico Box Plot (Mediana e Quartis) do número de células inflamatórias relativo ao período de 7 dias (A) Mononucleares e (B) Polimorfonucleares.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: Em cada gráfico, letras iguais indicam os resultados diferentes estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis, Student Newman Keuls)

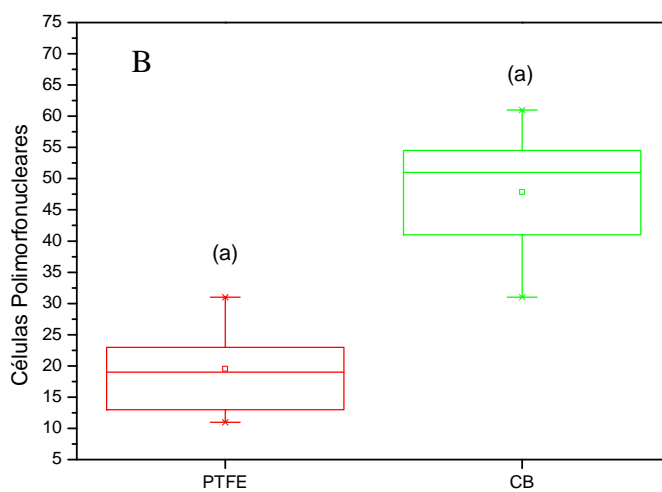
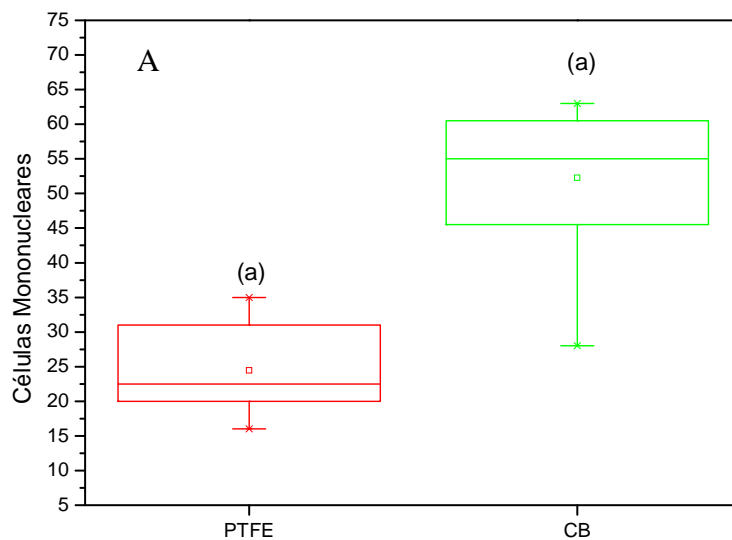
Figura 23 - Gráfico Box Plot (Mediana e Quartis) do número de células inflamatórias relativo ao período de 15 dias (A) Mononucleares e (B) Polimorfonucleares.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: Em cada gráfico, letras iguais indicam os resultados diferentes estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis, Student Newman Keuls)

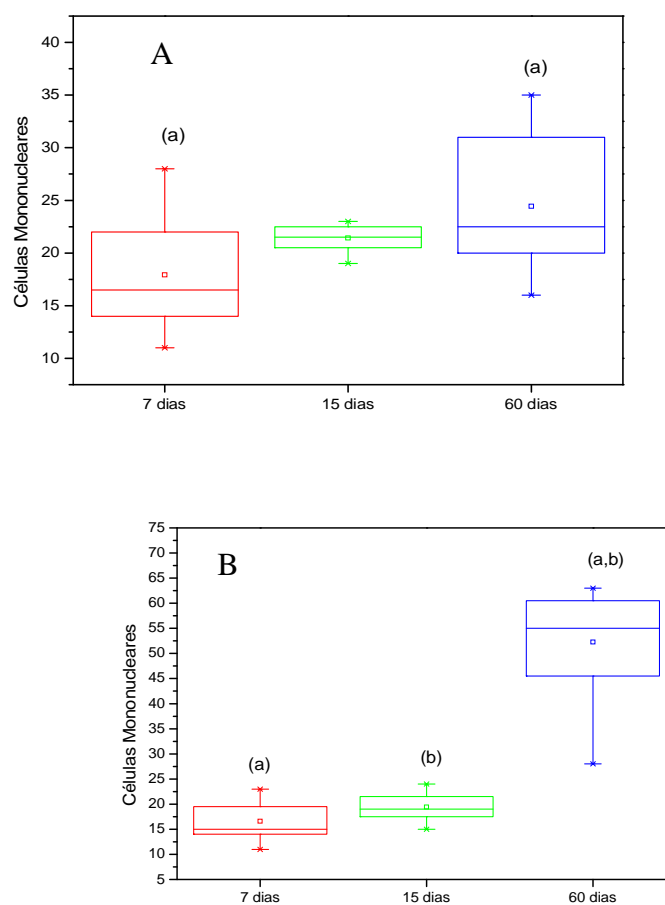
Figura 24 - Gráfico Box Plot (Mediana e Quartis) do número de células inflamatórias relativo ao período de 60 dias (A) Mononucleares e (B) Polimorfonucleares



Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: Em cada gráfico, letras iguais indicam os resultados diferentes estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis, Student Newman Keuls)

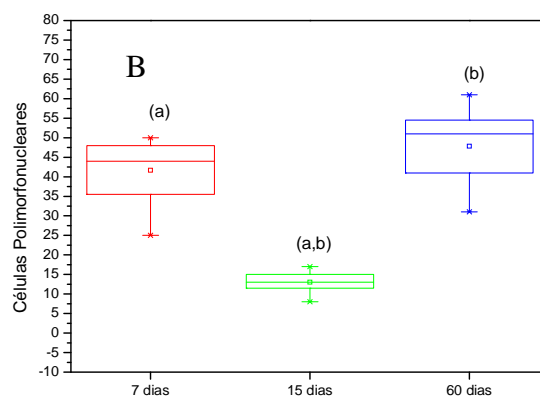
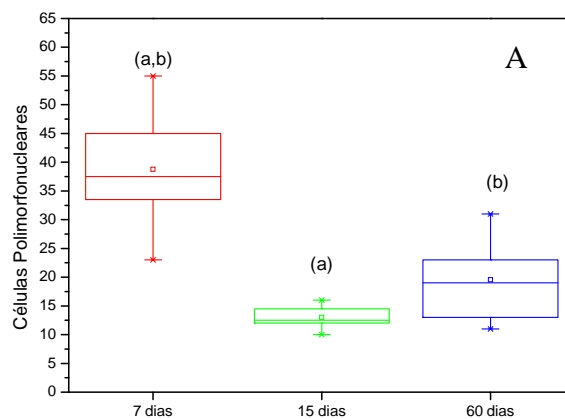
Figura 25 - Gráfico Box Plot (Mediana e Quartis) do número de células mononucleares encontradas ao longo do tempo devido ao implante dos materiais (A) PTFE (B) Celulose Bacteriana (CB).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: Em cada gráfico, letras iguais indicam os resultados diferentes estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis, Student Newman Keuls)

Figura 26 - Gráfico Box Plot (Mediana e Quartis) do número de células polimorfonucleares encontradas ao longo do tempo devido ao implante dos materiais (A) PTFE (B) Celulose Bacteriana (CB).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: Em cada gráfico, letras iguais indicam os resultados diferentes estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis, Student Newman Keuls)

A fim de se 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 3 sumariza os resultados obtidos. Não foram encontradas diferenças estatísticas significantes ($p>0.05$, Kruskal Wallis, Student Newman Keuls)

Tabela 3 - Razão do número de lâminas no score (tabela 1) e total de lâminas analisadas de acordo com o período e materiais estudados.

Período/score	PTFE				Celulose Bacteriana (CB)			
	1	2	3	4	1	2	3	4
7 dias	0/6	3/6	3/6	0/6	0/6	2/6	4/6	0/6
15 dias	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

Fonte: Elaborada pelo autor.

5 DISCUSSÃO

Apresentar resposta biológica apropriada a uma determinada aplicação e ser compatível aos tecidos vivos é o significado de biocompatibilidade. Para avaliar a capacidade de um material ser biocompatível é necessária a realização de testes para saber se o mesmo obedece aos parâmetros de qualidade e segurança para futuras aplicações clínicas.

Testes *in vitro* ainda têm suas limitações, sendo necessários testes *in vivo*, uma vez que somente a partir de testes com animais que é possível avaliar a compatibilidade tecidual do material a ser testado. A CB é uma membrana produzida através da extração da parede celular da bactéria *Gluconacetobacter Xylinus* que vem sendo estudada como possível novo biomaterial em aplicações para regeneração óssea guiada. Apesar desta membrana já ter uso clínico em algumas áreas de especialidade médica, mais testes são necessários e devem ser aprimorados até o uso deste novo biomaterial para finalidade odontológica. Assim, com o objetivo de se ter mais informações sobre sua biocompatibilidade, neste trabalho foram realizados implantes subcutâneos no dorso de ratos machos para analisar a evolução da resposta tecidual, sendo este método o meio mais apropriado para sua aplicação.

Previamente ao implante, foi realizado o estudo morfológico do biomaterial com Microscopia Eletrônica de Varredura a análise da superfície de CB e PTFE (material comercial e comprovadamente biocompatível) e a imagem resultante foi de superfície lisa e sem grandes porosidades e rugosidades (figura 7), indicando similaridades quanto à morfologia.

Foram avaliadas as respostas macroscópicas e microscópicas de ambas as membranas. Na análise macroscópica foi observado que nenhum dos biomateriais apresentou rejeição tecidual ou áreas de necrose e sem reações inflamatórias severas, já mostrando possível biocompatibilidade. A análise microscópica qualitativa mostra as membranas em cada período e a formação de cápsula fibrosa envolvendo o material a partir do tecido de granulação que gradativamente foi se organizando em torno do biomaterial até que toda membrana fosse encapsulada (figura 20), resultado de um mecanismo de defesa chamado de “reação de corpo estranho”.

Assim como no trabalho de Marques et al ⁽¹²⁾, os parâmetros para análise microscópica foram os mesmos, a contagem de células polimorfonucleares e de mononucleares. A figura 21 ilustra imagens obtidas dos tecidos adjacentes aos materiais estudados, nos diferentes períodos de

estudo, e que foram utilizadas para as contagens onde podemos observar células mononucleares e polimorfonucleares.

Analisando cada um dos gráficos, temos que nos períodos iniciais de 7 e 15 dias (Figuras 22 e 23) tanto células mononucleares, bem como células polimorfonucleares não apresentam diferenças nas contagens, $p > 0.05$, indicando que a resposta tecidual foi a mesma para as duas membranas. Já no do período de 60 dias as células inflamatórias apresentaram-se em maior quantidade nos tecidos após implante da membrana de CB em relação à membrana de PTFE (figura 24).

Quando comparamos a evolução da resposta tecidual de cada tipo de célula nos diferentes períodos, observamos que o número de células mononucleares de PTFE aumentou quando comparados os períodos de 7 e 60 dias. Já a quantidade de células mononucleares de CB em todos os períodos aumentou significativamente (Figura 25). Analisando a quantidade de células polimorfonucleares nos diferentes períodos de cada uma das membranas, vemos que tanto para CB como na PTFE houve uma diminuição do número de células em questão de forma significativa em cada um dos períodos, salvo que no período de 60 dias de CB que foi contado um valor maior de polimorfonucleares do que no período de 15 dias.

A tabela 3 apresenta resultado da atribuição de Scores para o número de células presentes na lâmina, sendo 1 o valor atribuído quando havia ausência de células, 2 quando a quantidade presente era menor que 25 células, 3 para números entre 25 e 125 células (35). E a resultante da análise foi que após a atribuição dos scores 3 laminas das 6 de PTFE no período de sete dias foram classificadas no score 2 e 3 laminas das 6 no score 3. Para a CB 2 lâminas foram classificadas no score 2 e 4 com score 3. Nos demais períodos 6 lâminas de 6 foram classificadas com score 3 em ambas as membranas. Não há diferença estatística significativa entre esses padrões. Sendo assim, apesar da contagens do número de células apresentar diferença entre os materiais nos períodos de 15 e 60, a resposta inflamatória de ambas foi a mesma, mais uma vez mostrando a similaridade entre os materiais e possível biocompatibilidade.

Saska et al ⁽¹⁵⁾ mostraram que a Celulose bacteriana não apresenta citotoxicidade, ação mutagênica e genotoxicidade. A CB favorece a proliferação de fibroblastos que é responsável pela formação de matriz extracelular que possibilitará a cicatrização, mostrando possível biocompatibilidade em testes *in vitro*. Sendo assim, os resultados desse trabalho complementam esse estudo prévio, demonstrando que, *in vivo* a CB exibe o mesmo padrão de resposta tecidual

quando comparada PTFE já comprovadamente biocompatível, e, dessa forma, contribuindo para que a CB possa futuramente ser empregada com segurança como biomaterial.

6 CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho mostram que o padrão inflamatório após implante subcutâneo de CB foi semelhante a membrana de PTFE, material comprovadamente biocompatível ($p > 0.05$, Kruskal Wallis). Ambos biomateriais exibiram aumento de número de células mononucleares ao longo dos períodos analisados e redução de polimorfonucleares, que eram abundantes nos períodos iniciais e tiveram seu número reduzido ao longo do processo, fenômeno esse visto em uma reação de reparo normal.

REFERÊNCIAS

1. Ratner, BD. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. 2nd. Amsterdam; Boston: Elsevier Academic Press, 2004;12:851.
2. Helmus, MN; Tweden, K. Materials Selection. In: Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering, Part A, v.1, p.27-59, 1995
3. Madihally, SV; Matthew, H. W. T. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, v.20, n.12, p.1133-1142. 1999.
4. Nehrer, S.; Breinan, H. A.; Ramappa, A.; Shortkroff, S.; Young, G.; Minas, T.; Sledge, C. B.; Yannas, I. V.; Spector, M. Canine chondrocytes seeded in type I and type II collagen implants investigated in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.38, 1997.
5. Czaja, W. K.; Young, D. J.; Kawecki, M.; Brown, R. M. The Future Prospects of microbial cellulose in biomedical Applications. *Biomacromolecules*, v.8, n.1, p.1-12. 2007.
6. Serrano, M. C.; Pagani, R.; Valletregi, M.; Pena, J.; Ramila, A.; Izquierdo, I.; Portoles, M. T. In vitro biocompatibility assessment of poly(epsilon-caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts. *Biomaterials*, v.25, n.25, p.5603-5611. 2004.
7. Vert, M.; Li, S.M.; Spenhauer, G.; Guerin, P. Biosorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. v.3, p.432-446, 1992.
8. Craighead, H. G.; James, C. D.; Turner, A. M. P. Chemical and topographical patterning for directed cell attachment. *Current Opinion in Solid State & Materials Science*, v.5, n.2-3, p.177-184. 2001.
9. Kumari, T.V.; Vasudev, U.; Kumar, A.; MENON, B. Cell surface interactions in the study of biocompatibility. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, v.15, n.2, p.37-41. 2002.
10. Oréfice, R.L; Preira, M.M; Mansur, H; Sander. *Biomateriais: fundamentos e aplicações*. Cultura Médica, 2006.
11. Silveira V, Pereira A.C, Amadei S.U, de Mello R.S. Aspecto interdisciplinar na pesquisa da biocompatibilidade dos materiais dentários. *Revista Biociências*, v.10,n.4,p. 209-213.2008
12. Marques L, Holgado L.A, Simoes R.D, Pereira J.D, Floriano J.F, Mota L.S. Kinoshita A. Subcutaneous tissue reaction and cytotoxicity of polyvinylidene fluoride and polyvinylidene fluoride-trifluoroethylene blends associated with natural polymers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. v.101, n.7,p.1284-1293.2013

13. Pairokh M, Mirsoltani B, Raoof M, Tabrizchi H, Haghdoost A.A. Comparative study of subcutaneous tissue responses to a novel root-end filling material and white and grey mineral trioxide aggregate. *International Endodontic* .p. 283-289. 2011
14. Viana V.N, Guerreiro T.J.M, Ferreira S.G, Sasso C.E, Tanomaru F.M, Cerri PS. Biocompatibility of an experimental MTA sealer implanted in the rat subcutaneous: Quantitative and immunohistochemical evaluation. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* ;v.100,n.7,p.1773-178. 2012.
15. Saska S, Barud HS, Gaspar AMM, Marchetto R, Ribeiro SJL, Messaddeq Y. Bacterial cellulose-hydroxyapatite nanocomposites for bone regeneration. *International journal of biomaterials*.2011.
16. 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. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.23,n.9, p.2253–2266. 2012.
17. Brown, R. M.; Saxena, I. M.; Kudlicka, K. Cellulose biosynthesis in higher plants. *Trends in Plant Science*, v. 1, p. 149-156, 1996.
18. Bodhibukkana C, Srichana T, Kaewnopparat S, Tangthong N, Bouking P, Martin GP, et al. Composite membrane of bacterially-derived cellulose and molecularly imprinted polymer for use as a transdermal enantioselective controlled-release system of racemic propranolol. *Journal of controlled release*, v.113,n.1,p.43–56.2006
19. Fontana, J. D.; De Souza, A. M.; Fontana, C. K.; Torriani, I. L.; Moreschi, J. C.; Gallotti, B. J.; De Souza, S. J.; Narcisco, G. P.; Bichara, J. A.; Farah, L. F. *Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute*. *Appl Biochem Biotechnol*, v.24-25, p.253-64. 1990.
20. Siqueira, J. J. P.; Moreschi, J. C. Membranas de celulose porosas desidratadas para curativos em úlceras, escoriações e queimaduras. *Cirurgia Vascular & Angiologia* v.16, p.179. 2000.
21. Klemm, D.; Schumann, D.; Udhardt, U.; Marsch, S. Bacterial synthesized cellulose - artificial blood vessels for microsurgery. *Progress in Polymer Science* , v.26, p.1561-1603. 2001.
22. Recouvreux, O.S.D et al. *Desenvolvimento de novos biomateriais baseados em celulose bacteriana para aplicações biomédicas e de engenharia de tecidos*.UFSC-Santa Catarina. 2008.
23. Svensson, A.; Nicklasson, E.; Harrah, T.; Panilaitis, B.; Kaplan, D. L.; BRITTBURG, M.; Gatenholm, P. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. *Biomaterials*, v.26, n.4, p.419-31. 2005.

24. Helenius, G.; Backdahl, H.; Bodin, A.; Nannmark, U.; Gatenholm, P.; Isberg, B. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v.76A, n.2, p.431-438. 2006.
25. Tokoh, C.; Takabe, K.; Fujita, M.; Saiki, H. Cellulose synthesized by *Acetobacter xylinum* in the presence of acetyl glucomannan. *Cellulose*, v.5, p.249-261. 1998.
26. Schadel, A., Thun, G., Stork, L., & Metzler, R. Immunodiffusion and immunohistochemical investigations on the reactivity of oxide ceramic middle-ear implants. *ORL*, v.55, n.4, p. 216-221. 1993
27. Sevastjanova, NA, Mansurova, LA, Dombrovska, LE, Slutskii, LI. Biochemical characterization of connective tissue reaction to synthetic polymer implants. *Biomaterials*. 1987; 8(4):242-247.
28. Vince, D, Geoffrey, Hunt JA, Williams, DF. "Quantitative assessment of the tissue response to implanted biomaterials." *Biomaterials*. 1991;12(8):731-736.
29. Irion, G. *Feridas: novas abordagens, manejo clínico e atlas em cores*. Guanabara Koogan. 2005
30. Santos, VLCG, Duarte YAO, Diogo, MJD. "Avanços tecnológicos no tratamento de feridas e algumas aplicações em domicílio." *Atendimento domiciliar: um enfoque gerontológico*. São Paulo: Atheneu p.265-306. 2000
31. Swaim, SF, Gillette, RL. *An update on wound medications and dressings. The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian*, v.20.1998.
32. Thakare, VM, Chaudhari, R. Y., & Patil, V. R. Promotion of cutaneous wound healing by herbal formulation containing *Azadirachta indica* and *Cynodon dactylon* extract in wistar rats. *International Journal of Pharmaceutical Research & Development*, v.3, p.80-86.2011
33. Mester, E., Mester, A. F., & Mester, A. The biomedical effects of laser application. *Lasers in surgery and medicine*, v.5,n.1, p.31-39. 1985
34. Robbins, S. L., Cotran, R. S., Kumar, V., & Collins, T. Fundamentos de Robbins: patologia estrutural e funcional. In *Fundamentos de Robbins: patologia estrutural e funcional; Robbins pathologic basis of disease*. Guanabara Koogan. 2001
35. Yaltirik M, Ozbas H, Bilgic B, Issever H. 2004. Reactions of Connective Tissue to Mineral Trioxide Aggregate and Amalgam. *Journal of endodontics*. 30(2):95-9.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS CEUA - USC

CERTIFICADO

PROTOCOLO N° 18/13

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(CB) PRODUZIDA POR *Gluconacetobacter xylinus*", sob a responsabilidade da pesquisadora Profª 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.



Dra. Dulce H. J. Constantino
Presidente CEUA - USC



Francine Souza
Secretária CEUA - USC