

UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

GABRIELA MARTINEZ

**ESTUDO *IN VIVO* DA RESPOSTA TECIDUAL
FRENTE AO IMPLANTE SUBCUTÂNEO DO
SISTEMA “LATEXNANOAG”**

BAURU
2012

UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

GABRIELA MARTINEZ

**ESTUDO *IN VIVO* DA RESPOSTA TECIDUAL
FRENTE AO IMPLANTE SUBCUTÂNEO DO
SISTEMA “LATEXNANOAG”**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado pela aluna Gabriela Martinez ao Centro de Ciências da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do título de Cirurgiã Dentista, sob orientação da Prof. Dra. Angela Mitie Otta Kinoshita.

BAURU
2012

Martinez, Gabriela

M3855e

Estudo in vivo da resposta tecidual frente ao implante subcutâneo do sistema LatexNanoAg / Gabriela Martinez -- 2012.

33f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Angela Mitie Otta Kinoshita.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - Universidade Sagrado Coração - Bauru - SP

1. Regeneração óssea guiada. 2. Membrana oclusiva. 3. Látex natural. 4. Nanopartículas de prata. I. Kinoshita, Angela Mitie Otta. II. Título.

GABRIELA MARTINEZ

**ESTUDO *IN VIVO* DA RESPOSTA TECIDUAL FRENTE AO
IMPLANTE SUBCUTÂNEO DO SISTEMA “LATEXNANOAG”**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado pela aluna Gabriela Martinez ao Centro de Ciências da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do título de Cirurgiã Dentista em Odontologia, sob orientação da Prof. Dra. Angela Mitie Otta Kinoshita.

Banca examinadora:

Prof. Dra. Angela Mitie Otta Kinoshita
Universidade Sagrado Coração

Prof. Ms. Leandro De Andrade Holgado
Universidade Sagrado Coração

Prof. Ms. Regina Magrini Guedes De Azevedo
Universidade Sagrado Coração

Bauru, 14 de novembro de 2012.

À Deus pela certeza de que Ele esteve ao meu lado em todos os momentos da minha jornada e sei que assim se fará pelas quais não de vir. Aos meus preciosos pais, Marcelo e Joracira Martinez que confiaram em mim tornando possível o alcance a este sonho, hoje realizado e que me servem como fonte de força e perseverança. Aos meus queridos irmãos, Vinicius e Guilherme Martinez por se fazerem sempre ao meu lado, me trazendo alegrias, mesmo em momentos que sorrir parecia difícil. Ao meu amado esposo André H. Araújo pela paciência e compreensão, pelo amor que nos uni e me serve de estímulo para seguir conquistando meus objetivos. A parentes e amigos que estiveram ao meu lado. A minha orientadora Angela Kinoshita pela oportunidade que me deu e pelo tempo que se dispões a me ajudar, sua orientação foi com muita sabedoria contribuindo grandemente na minha formação acadêmica que com muita sabedoria me orientou. E aos demais professores que nessa trajetória acadêmica estiveram ao meu lado, a base do meu conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não é fruto apenas de um esforço individual mas de muitas contribuições que recolhi durante minha trajetória acadêmica. E assim há necessidade de expressar meus agradecimentos a todos aqueles que tornaram possível a realização deste trabalho, que os faço com muito agrado.

À Deus, incontestavelmente, Iluminador do meu caminho, Amigo fiel e protetor. Ao programa PIBIC de Iniciação Científica e ao CNPq pelo financiamento da pesquisa.

A minha orientadora, profa. Dra. Angela Kinoshita, pelo apoio, paciência e disponibilidade demonstrada durante todas as fases para conclusão deste trabalho, se fazendo um exemplo de competência, me trazendo conhecimentos extracurriculares.

Ao cirurgião-dentista e futuro mestre Leonardo Marques que ativamente me ajudou, boa vontade não lhe faltou nos procedimentos cirúrgicos que executamos, até mesmo aos sábados de manhã (risos) ele esteve firme ao meu lado.

A Profa. Dra. Marisa Matsumoto e à Wilson Orcini, especialista em Análise Clínica e responsável técnico do Laboratório de Biologia Molecular e Citogenética da USC, estes muito me ensinaram e contribuíram intensamente na realização deste trabalho. Assim, para evitar qualquer esquecimento, coletivamente agradeço a todos aos demais professores que mesmo em conversas pelos corredores das clínicas tiveram suas contribuições nesse trabalho.

A equipe do Laboratório de Histo-química da USC que sempre esteve a disposição.

Aos meus pais, porque sempre estiveram disponíveis para sustentar os meus almejos.

“O Senhor é o meu Pastor, e nada me
faltará.”
(SALMO 23:1)

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 compor membranas oclusivas é o látex natural, extraído da seringueira *Hevea brasiliensis*. Após sua polimerização, uma membrana é formada com várias propriedades de interesse para esta aplicação, como biocompatibilidade, alta resistência mecânica, elasticidade e flexibilidade. O filme de látex já foi testado em modelo animal como membrana oclusiva em defeitos críticos, apresentando bons resultados. Outra propriedade desse biomaterial, já relatada na literatura, diz respeito à sua capacidade de atuar como um sistema liberador de fármacos – “drug-delivery”. Esse trabalho consiste no estudo da reação tecidual de um novo biomaterial constituído de látex natural que libera gradativamente nanopartículas de prata: *LatexNanoAg*. A prata possui ação antimicrobiana conhecida há muito tempo. A forma em nanopartículas apresenta vantagens, pois, devido à dimensão nanométrica, a superfície de contato é maior em relação à forma livre evitando assim, o envenenamento por prata, pois sua dimensão impede a obstrução da membrana celular. Dessa forma, o estudo da biocompatibilidade desse novo biomaterial faz-se necessário para futuras aplicações como membrana oclusiva com ação antimicrobiana, para procedimento de ROG. Foram utilizados 18 ratos machos (*Rattus norvegicus*, Wistar) os quais sofreram, cirurgicamente, 3 incisões no dorso para implante subcutâneo do material a ser testado, *LatexNanoAg*, bem como do Látex e PTFE (Politetrafluoretileno). Após 7, 15, 60 dias 6 animais foram eutanasiados, e a reação tecidual analisada microscopicamente, observando a presença de necrose, de cápsula fibrosa, células inflamatórias, células gigantes. Registrou-se 6 imagens de cada lâmina, nas quais foram contabilizadas a quantidade de células mononucleares, poliformonucleares e células gigantes, bem como a presença ou não da cápsula fibrosa. Os dados quantitativos foram analisados estatisticamente através do teste não paramétrico Kruskal Wallis. Todos os materiais apresentaram reação tecidual semelhante, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na contagem de células inflamatórias ($p>0.05$). Com isso pode-se concluir que o novo sistema *LatexNanoAg* apresenta o mesmo tipo de resposta tecidual que o material controle, PTFE.

Palavras-chave: Regeneração óssea guiada. Membrana oclusiva. Látexnatural. Nanopartículas de Prata

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, among them, the Guided Bone Regeneration (GBR). In the GBR an occlusive membrane is used to seal the space of the bone defect preventing the invasion of epithelial cells and connective tissue. A biomaterial that has been studied to compose occlusive membranes is the natural latex extracted from the rubber tree *Hevea brasiliensis*. After polymerization, a membrane is formed with several properties of interest for this application, as biocompatibility, high mechanical strength, elasticity and flexibility. The latex film has already been tested in animal models as occlusive membrane in critical defects, showing good results. Another property of this biomaterial reported in the literature is its ability to act as a "drug-delivery" system. This work studied the tissue reaction through subcutaneous implant of the new biomaterial made of natural latex which gradually releases silver nanoparticles: *LatexNanoAg*. Silver antimicrobial effect has long been known. The nanoparticle form has advantages because the nanometer dimensions. The contact surface is higher compared to free form and its size prevents blockage of the cell membrane avoiding the silver poisoning. Thus, the study of the tissue reaction of this new biomaterial is necessary for future applications as occlusive membrane with antimicrobial activity in GBR procedures. Eighteen male rats (*Rattus norvegicus*, Wistar) were used, in which three incisions in dorsal subcutaneous were made to implant the material to be tested, *LatexNanoAg* as well as natural latex membrane and PTFE (polytetrafluoroethylene). After 7, 15, 60 days 6 animals were euthanized, and tissue reaction examined microscopically observing the presence of necrosis, fibrous capsule, inflammatory cells and giant cells. Six images of each slice were registered to record the number of mononuclear, polymorphonuclear and giant cells, as well as the presence or absence of the fibrous capsule. Quantitative data were statistically analyzed using the Kruskal-Wallis nonparametric test. All materials presented similar tissue reaction. No statistically significant differences in inflammatory cell count ($p > 0.05$) were found. Thus it can be concluded that the new system *LatexNanoAg* shows the same pattern of tissue response to a control material, PTFE.

Keywords: Guided bone regeneration. Occlusive membrane. Natural latex. Silver Nanoparticles

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Imagem TEM ilustrando as nanopartículas de prata liberada em água.....	13
Figura 2 - Foto dos medicamentos utilizados para os procedimentos de anestesia: Cloridrato de Ketamina e Xilazina - Dopalen® e Anasedan®.....	18
Figura 3 - Animal anestesiado com a tricotomia já realizada.....	18
Figura 4 - Incisão da pele com bisturi nº 3 e lâmina nº 12.....	19
Figura 5 - Divulsão com tesoura reta, expondo o tecido subcutâneo.....	19
Figura 6 - Material (LátexNanoAg) sendo implantado no subcutâneo do animal.....	20
Figura 7 - Fotomicrografia em aumento 2x para exemplificar o padrão de tomadas fotográficas adotado. A demarcação em preto simboliza os campos. Coloração Tricrômico de Masson.....	21
Figura 8 - Campo da ponta direita da imagem representada na figura 7, em aumento de 40x. Coloração HE.....	21
Figura 9 - Tela do programa ImageJ quando em utilização na ferramenta de contagem de células.....	22
Figura 10 - Campo em aumento de 40x, da lamina do biomaterial PTFE de 15 dias de preservação. As setas amarela, verde e azul, apontam respectivamente, uma célula mononucleada, uma célula gigante e uma polimorfonuclear.....	23

Figura 11 - Amostras removidas, neste exemplo, com 15 dia pós cirúrgico e fixadas em formol, prontas para inclusão em parafina.....	24
Figura 12 - Quadro ilustrativo: material implantado pelo período de preservação. Panorâmicas em aumento de 2x. coloração Tricrômico de Masson.....	25
Figura 13 - Infiltrado inflamatório com células mono e polimorfonuclear (seta amarela e azul, respectivamente), celula gigante (seta verde), fibroblasto (seta verde); tecido não organizado.....	26
Figura 14 - Cápsula fibrosa formada de fibras de colageno(*), fibroblasto(seta vermelha e fibrócito(seta roxa); Tecido organizado.....	26
Figura 15 - Representação gráfica da quantidade de células mononucleares em função do tempo.....	27
Figura 16 - Representação gráfica da quantidade de células polimorfonucleares em função do tempo.....	27
Figura 17 - Representação gráfica doTeste de Kruskall Wallis para comparação dos scores da reação tecidual, relativo ao período de 7 dias....	28

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO/REVISÃO DE LITERATURA	12
2. JUSTIFICATIVA.....	15
3. OBJETIVOS.....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	17
5. RESULTADOS.....	24
5.1. ANÁLISE MACROSCOPICO.....	24
5.2. ANÁLISE MICROSCOPICO.....	25
6. DISCUSSÃO.....	28
7. CONCLUSÃO.....	30
REFERÊNCIAS.....	31
ANEXO A.....	33

1. Introdução/revisão de literatura

A ciência dos biomateriais vem experimentando ampla expansão 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. De um modo geral, um biomaterial pode ser definido como todos os materiais destinados a possuir uma interface com os sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo. (BOOTH; PRICE, 1989)

As características que os biomateriais devem possuir são biocompatibilidade, não ser tóxico nem carcinogênico, apresentar bioestabilidade, propriedades mecânicas adequadas, peso e densidade adequados, ter custo relativamente baixo e ser de fácil processamento. (CALLIESTER, 2012; HILL, 1998)

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). (SILVEIRA et al., 2004)

Nos estudos *in vivo*, 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. (SCHAMLZ ; ARENHOLT-BINDSLEV, 2009)

Um biomaterial que vem sendo estudado para procedimentos de reparo ósseo é o látex natural. O látex natural extraído da serigueira *Hevea brasiliensis*. Após a polimerização, um filme é formado com flexibilidade, elasticidade, resistência mecânica, que são características mecânicas desejáveis para uso como membrana oclusiva, na odontologia. Balabanian et al. (2006), em estudos *in vivo*, verificaram a biocompatibilidade deste biomaterial, através do implante intra-ósseo no alvéolo de ratos.

Ereno et al. (2010) estudaram filme de látex como membrana oclusiva em procedimentos de ROG para tratar defeitos críticos, com resultados positivos.

Ferreira et al. (2009), entre outros estudos conforme Mendonça et al. (2010) sugerem a capacidade do látex em induzir a angiogênese.

Estudos demonstraram também a possibilidade de se agregar substâncias como proteínas e antibióticos ao filme de látex e, assim, formar-se um sistema com função de barreira oclusiva e sistema liberador de fármaco, simultaneamente. (HERCULANO et al., 2009; HERCULANO et al, 2010; HERCULANO et al., 2011)

Por sua vez, Guidelli et al., 2011 incorporaram nanopartículas de prata no filme de látex, formando um sistema polimérico que libera gradativamente essa substância.

A figura 1 a seguir, ilustra as nanopartículas dispersas em água obtida por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) após imersão do sistema *LatexNanoAg* por 48 horas em água ultrapura (MiliQ).

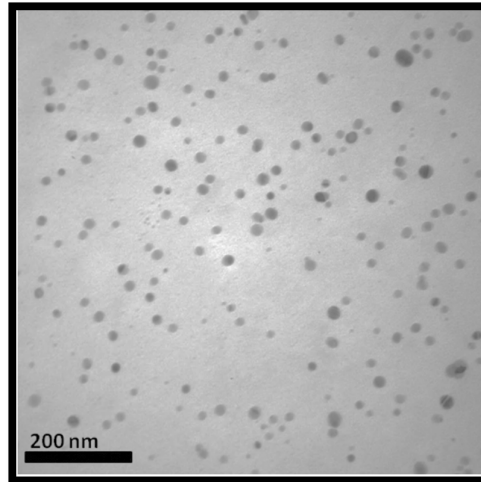


Figura 1 Imagem TEM ilustrando as nanopartículas de prata liberada em água

Durante as últimas décadas, nanopartículas de prata estão sendo utilizadas em diversas áreas como ótica e eletrônica, devido ao fato de suas propriedades elétricas e magnéticas serem altamente dependentes de suas dimensões. Atualmente, outras aplicações das nanopartículas foram encontradas na biotecnologia e bioengenharia, devido às propriedades antibactericida e antifúngica. Segundo Morones et al., (2005) essas partículas mostraram-se eficazes contra bactérias Gram- negativas *E. coli*, *V. cholera*, *P. aeruginosa* and *S. typhus*. Com isso, pesquisas são desenvolvidas a fim de incorporar essa substância em diversos produtos para uso médico/odontológico, incluindo-se instrumentos cirúrgicos, máscaras, substitutos ósseos e curativos. A liberação tópica de nanopartículas de prata por curativos mostrou-se eficiente na cicatrização cutânea, conforme Tian et al., (2007). Essa eficácia foi atribuída, pelos autores, às propriedades antimicrobianas das nanopartículas.

Na odontologia, pesquisas estão sendo realizadas incorporando nanopartículas de prata em matérias de uso odontológico devido ao seu efeito antibacteriano.

Kassaei et al. (2008) incorporaram nanopartículas de prata em resina acrílica e mostraram que na composição de 0,5%, essa associação exibe forte efeito antibactericida contra a *E. coli*, devido a liberação de nanopartículas de prata, com pouca toxicidade aos humanos. Além disso, a adição de pequenas

quantidades de prata melhora parcialmente as propriedades mecânicas da resina acrílica.

Gomes-Filho et al. (2010) avaliaram a reação tecidual frente a nanopartículas de prata em dispersão como uma nova alternativa de solução irrigadora de canal. Através do implante subcutâneo em ratos de tubos de polietileno contendo uma esponja de fibrina embebida na dispersão, concluíram que esta dispersão é biocompatível, especialmente em baixas concentrações.

Durner et al. (2011) estudaram a influência da incorporação de nanopartículas de prata em resinas fotopolimerizáveis, uma vez que elas podem auxiliar na redução de cáries. Concluíram que há alterações nas substâncias que são liberadas pela resina após sua polimerização.

Sendo assim, esse projeto propõe o estudo da biocompatibilidade *in vivo* desse novo biomaterial, *LatexNanoAg*, através de implante subcutâneo do mesmo no dorso de ratos, para que futuramente o mesmo seja utilizado como membrana oclusiva na odontologia.

2. Justificativa

A membrana de látex é um biomaterial de baixo custo e que apresenta propriedades mecânicas relevantes para aplicações como membrana oclusiva na odontologia. A associação a nanopartículas de prata representa um aperfeiçoamento do mesmo, por aliar a ação antimicrobiana ao mesmo. A primeira etapa para que esse material possa ser empregado em seres humanos é o estudo da biocompatibilidade, sendo que este trabalho analisou a resposta tecidual *in vivo*.

3. Objetivo Geral

Avaliação da resposta inflamatória após implante subcutâneo do novo material *LatexNanoAg*.

3.1 Objetivo Específico

Avaliar, tanto o padrão clínico quanto histológico, a reação tecidual após implante subcutâneo dos materiais implantados, membrana PTFE, membrana Látex e o novo material *LatexNanoAg*.

Comparar a resposta inflamatória causada pelo implante do novo material com a do grupo controle positivo (membrana de PTFE).

Quantificar as células inflamatórias e classificar o tipo de reação apresentado.

Observar a formação e posterior presença ou não da cápsula fibrosa.

4. Materiais e métodos

4.1 Delineamento experimental

Foram utilizados 18 ratos, machos, adultos da raça *Rattus norvegicus* com peso médio de 300g que foram divididos em 3 grupos correspondentes aos período de preservação.

Tabela 1: Descrição dos grupos de animais/período preservação

Grupo	Número de animais	Período de preservação
A	6	7 dias
B	6	15 dias
C	6	60 dias

As cirurgias de implante do biomaterial bem como todos os demais procedimentos práticos como a eutanásia e coleta de peças, a confecção das lâminas e as fotos para morfometria, foram realizadas na Universidade Sagrado Coração, após aprovação pelo comitê de Ética em Pesquisa (Protocolo 039/11)anexo I.

Para a realização do procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos à anestesia geral com administração pré-anestésica de relaxante muscular por via intramuscular (IM) de cloridrato de Xilasina (Anasedan – Vetbrands) 13mg/kg de peso corpóreo, seguido pela administração intramuscular de anestésico geral de cloridrato de Cetamina (Dopalen – Vetbrands) 87mg/kg de peso corpóreo (fig. 2).



Figura 2 Foto dos medicamentos utilizados para os procedimentos de anestesia: Cloridrato de Ketamina e Xilazina - Dopalen® e Anasedan®.

Com o animal sob anestesia geral, foi realizada a tricotomia na região dorsal (Fig. 3) e anti-sepsia com PVPI(polivinilpiridona) tópico. Após a montagem dos campos estéreis, em cada animal foram realizadas 3 incisões de aproximadamente 0,5 cm, seguida de divulsão com tesoura cirúrgica reta, subcutâneas no dorso do animal (Figs 4 e 5). Todos os animais receberam 1 membrana de cada material em estudo no subcutâneo do dorso com auxílio de uma pinça clínica (Fig. 6), sendo que a membrana de PTFE foi tomada como controle positivo. A seguir, foi realizada a sutura do tecido, com fio de sutura seda 4.0. Através deste procedimento são geradas 6 amostras (n=6) para cada material (membrana) implantado por período de observação.

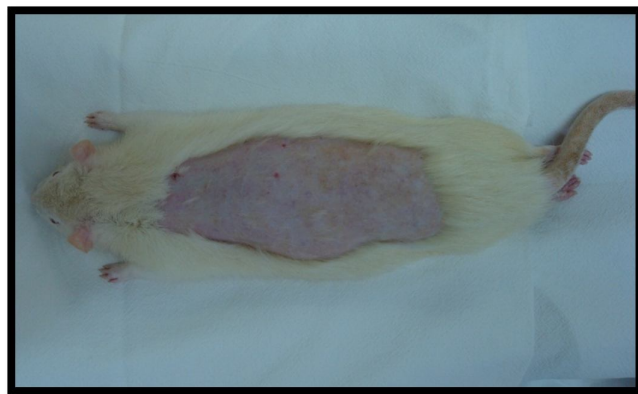


Figura 3 Animal anestesiado com a tricotomia já realizada.



Figura 4 Incisão da pele com bisturi nº 3 e lâmina nº 12.



Figura 5 Divulsão com tesoura reta, expondo o tecido subcutâneo.



Figura 6 Material (*Látex/NanoAg*) sendo implantado no subcutâneo do animal.

Após o implante os animais permaneceram no Biotério da universidade, recebendo dieta balanceada, padrão do Biotério e água *ad libitum*.

Após os períodos de preservação pré-determinados, os animais foram eutanasiados com superdosagem de anestésico geral (Cetamin®). Para coleta das peças, primeiramente foi realizada a tricotomia da região dorsal e, em seguida, remoção da peça com tesoura cirúrgica reta. Nesse instante realizou-se o exame macroscópico, observando a região do implante dos biomateriais. Onde analisou se a normalidade física do tecido, ausência de edema, e cicatrização dentro do padrão esperado. As peças foram fixadas em formol a 10% seguido de procedimentos de histotécnica e inclusão em parafina. Os cortes microscópicos foram obtidos no sentido longitudinal e corados pelos métodos da hematoxilina/eosina (HE) e Tricômico Masson, obtendo imagens histológicas como mostrada na figura 7. Em função do formato elíptico da imagem, adotou-se um padrão de 6 tomadas fotográficas em aumento de 40x, na interface entre o tecido e o biomaterial, sendo elas: 1 em cada ponta e 2 na parte superior da região da membrana e 2 na parte inferior (fig. 7), conseguindo uma imagem em aumento de 40x, como exemplifica a figura 8. Foi utilizado o Fotomicroscópio Nikon para as tomadas fotográficas e as contagem de células foi com a ajuda do programa ImageJ, exemplificado abaixo (fig. 9). Com isso,

para cada material e período de análise foram analisadas 36 imagens (n=6 com 6 imagens de cada lâmina, totalizando 324 imagens).

A quantificação diferencial das células inflamatórias se fez, principalmente, pela observação nuclear das células, sendo esta estrutura formado de RNA/DNA, ácidos, na coloração H.E., a hematoxilina embora não seja um corante básico, têm propriedades muito parecidas a ele e reage então a estruturas componentes do núcleo das células inflamatórias. Já a montagem das fotos panorâmicas para observação do tecido formado ao redor do material implantado foi feito em coloração Tricromico de Masson (fig. 12).

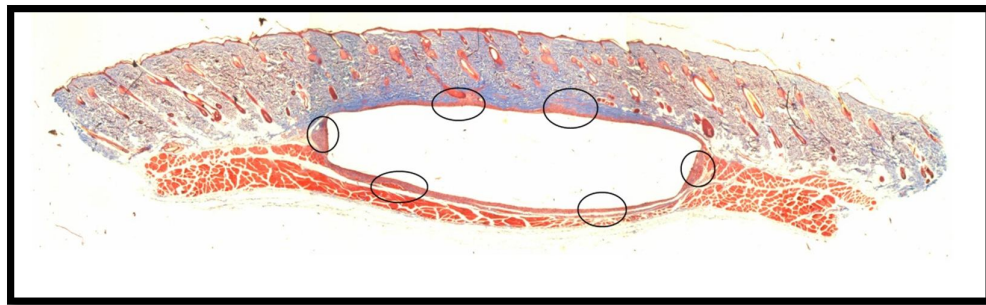


Figura 7 Fotomicrografia em aumento 2x para exemplificar o padrão de tomadas fotográficas adotado. A demarcação em preto simboliza os campos. Coloração Tricrômico de Masson.

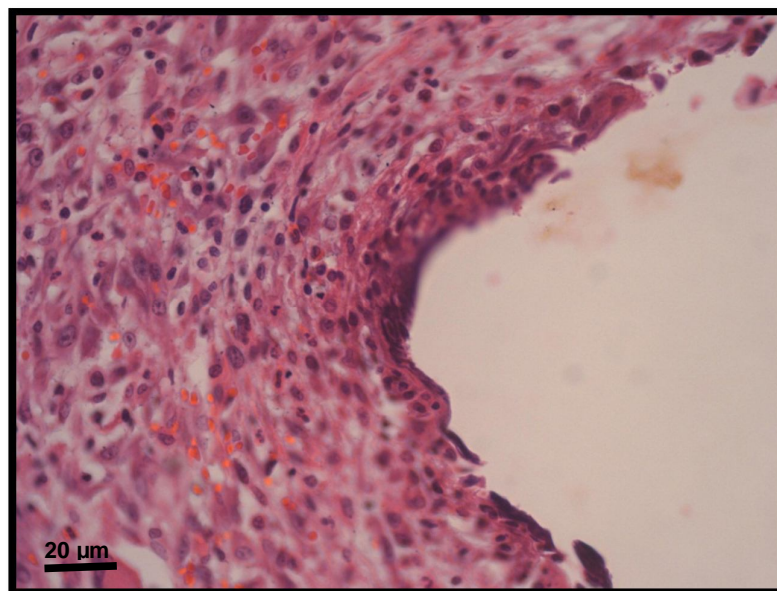


Figura 8 Campo da ponta direita da imagem representada na figura 7, em aumento de 40x. Coloração HE.

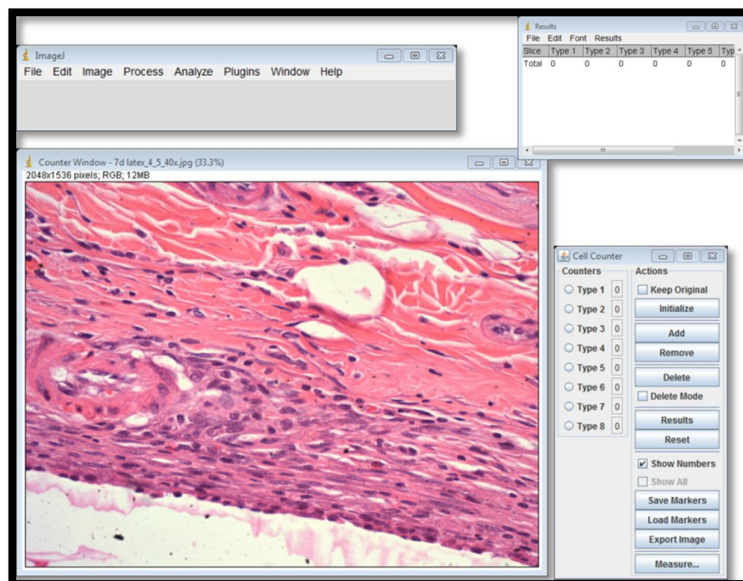


Figura 9 Tela do programa ImageJ quando em utilização na ferramenta de contagem de células.

A avaliação microscópica se firmou na formação do tecido de granulação e posterior cápsula fibrosa, formada ao redor da região do implante, como sinal da ausência de necrose e na avaliação da resposta tecidual mediante contagem de células inflamatórias, dividindo-as em polimorfonucleares, mononucleares e células gigantes (fig.10)

O grupo dos polimorfonucleares, sendo num processo inflamatório representado em maior número pelos neutrófilos, recebem esse nome pela forma multinobulada de seu núcleo. (fig. 10).

As células mononucleares, exemplificadas pelos linfócitos, são células pequenas com núcleo grande e bem corado. O citoplasma apresenta-se escasso.(fig. 10).

As células gigantes são células grandes, multinucleadas, formadas pela união de macrófagos frente a grandes corpos estranhos. (fig. 10).

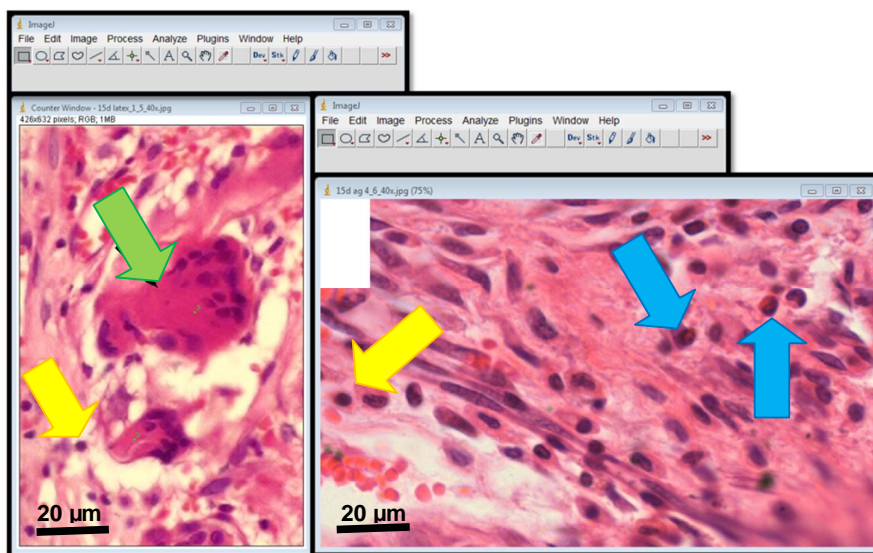


Figura 10 Campo em aumento de 40x, da lamina do biomaterial PTFE de 15 dias de preservação. As setas amarela, verde e azul, apontam respectivamente, uma célula mononucleada, uma célula gigante e uma polimorfonuclear.

Após a análise microscópica, os dados foram tabulados e submetidos à análise estatística, calculando-se a mediana do número de células para cada elemento celular por período de observação. A comparação entre os valores da mediana foi realizada pelo teste Kruskal Wallis, seguido de Student-Newman Keuls utilizando-se o software Biostat 5.0, considerando-se o nível de significância 5%. Os valores das contagens das células mononucleares e polimorfonucleares foram representados graficamente em diagrama Box-Plot.

Para a comparação da resposta biológica entre os materiais, adotou-se o mesmo índice de score de Yaltric et al. (2004), descrito na tabela 2 a seguir, para a mediana do número total de células inflamatórias encontrada nos 6 campos de cada lâmina.

Tabela 2: Índices de scores para reação tecidual*

Score	Quantidade de células	Descrição
1	0	Nenhuma reação
2	<25	Reação discreta
3	Entre 25 e 125	Reação moderada
4	> 125	Reação Severa

* Baseado em Yaltric et. Al (2004)²¹

5. Resultados

5.1. Análise Macroscópica

Durante o período de preservação, observou-se a ausência de edema, de calor, de rubor, em todos os animais, na região da incisão. A cicatrização progrediu de forma satisfatória.

Na remoção, as amostras foram facilmente visualizadas desde que as membranas são não reabsorvíveis (figura 11).

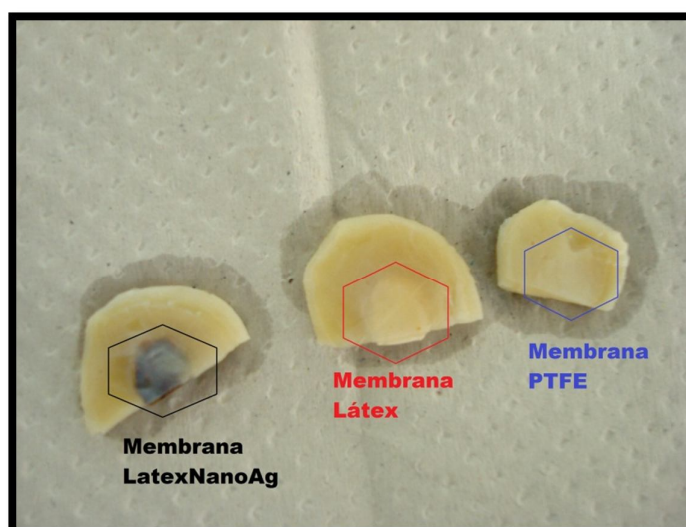


Figura 11 Amostras removidas, neste exemplo, com 15 dia pós cirúrgico e fixadas em formol, prontas para inclusão em parafina.

5.2. Análise Microscópica

A tabela 3 reúne as fotomicrografias panorâmicas, dos materiais implantados por período de preservação, todas em aumento 2x e coloração Tricrômico de Masson. Nelas observa-se no período inicial de 7 dias, a formação do tecido de granulação rodeando o material implantado, essa característica foi observada em todas as lâmina sendo que no período de 60 dias já observa se a capsula fibrosa, isolando assim o material implantado. O encapsulamento desse material foi possível devido a atividade celular, concluindo se que não houve necrose tecidual.

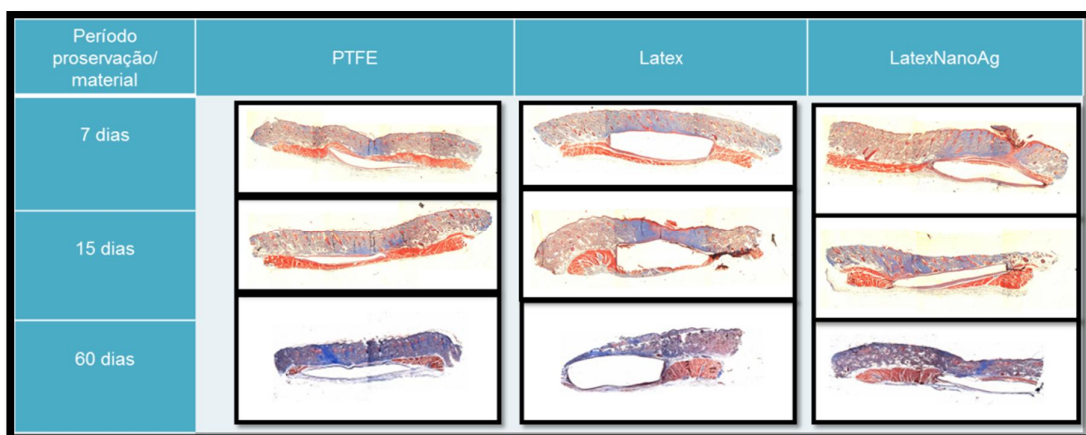


Figura 12 Quadro ilustrativo: material implantado pelo período de preservação. Panorâmicas em aumento de 2x. Coloração Tricrômico de Masson.

Em aumento de 40x, em todas as imagens, tornou-se possível a identificação das células presentes no infiltrado inflamatório (fig. 13), células mono e polimorfonucleares bem como as células gigantes, fibroblastos. Inicialmente, aos 7 e 15 dias, estas encontravam-se em uma matriz colágena não organizada. Após intensa síntese de colágeno (60 dias) pode-se observar um tecido organizado, com muita matriz orgânica (fibras de colágeno) e poucas células, em sua maioria fibrócitos e fibroblastos sintetizando colágeno, sendo este último compondo a cápsula fibrosa (fig. 14).

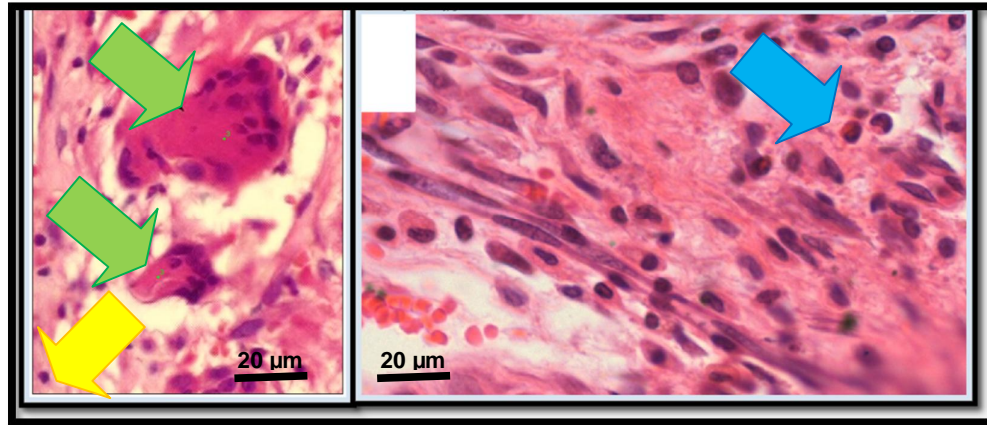


Figura 13 Infiltrado inflamatório com células mono e polimorfonuclear (seta amarela e azul, respectivamente), célula gigante (seta verde), tecido não organizado.

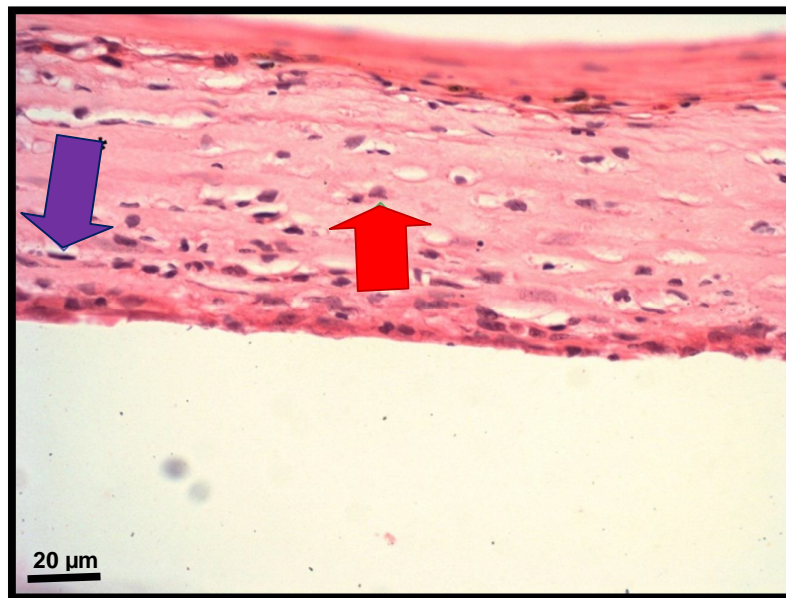


Figura 14 Cápsula fibrosa formada de fibras de colágeno(*), fibroblasto(seta vermelha e fibrócito(seta roxa); Tecido organizado.

As figuras 15 e 16 mostram a distribuição das contagens de células mononucleares e polimorfonucleares em função do tempo de implante em diagrama Box-plot mediana.

Há redução significativa na quantidade de células no período de 60 dias ($p < 0.05$ Kruskal Wallis seguido de Student-Newman Keuls) em relação aos períodos de implante de 7 e 15 dias para todos os materiais implantados, em ambos tipos celulares. Não há diferença entre as contagens nos períodos de 7 e 15 dias.

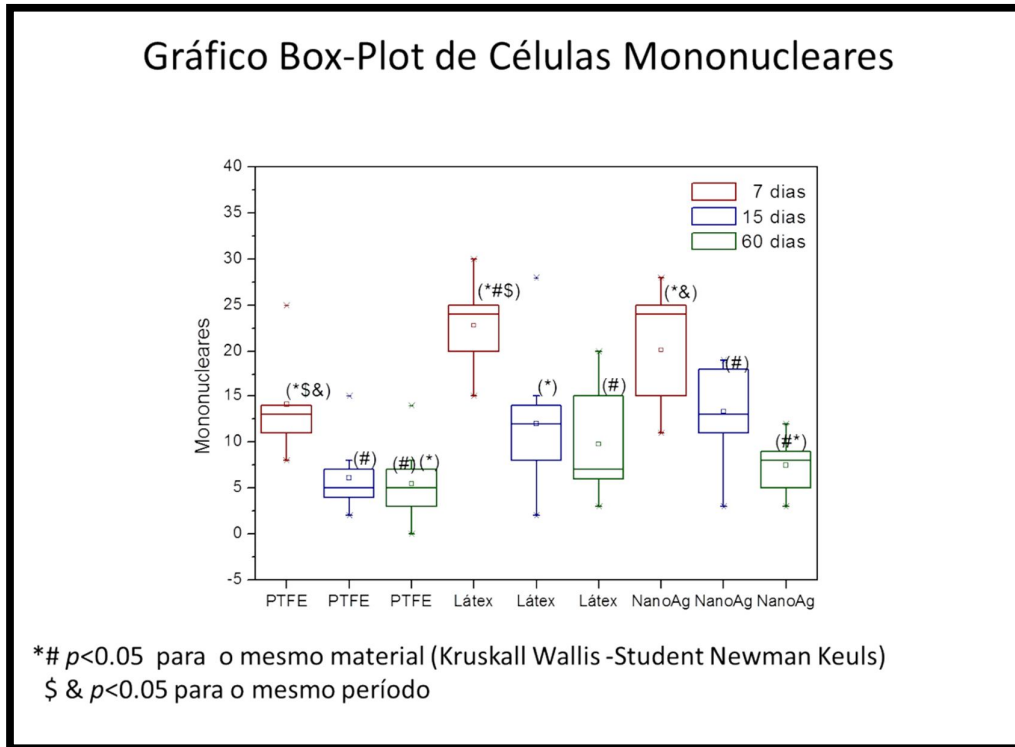


Figura 15 Representação gráfica da quantidade de células mononucleares em função do tempo.

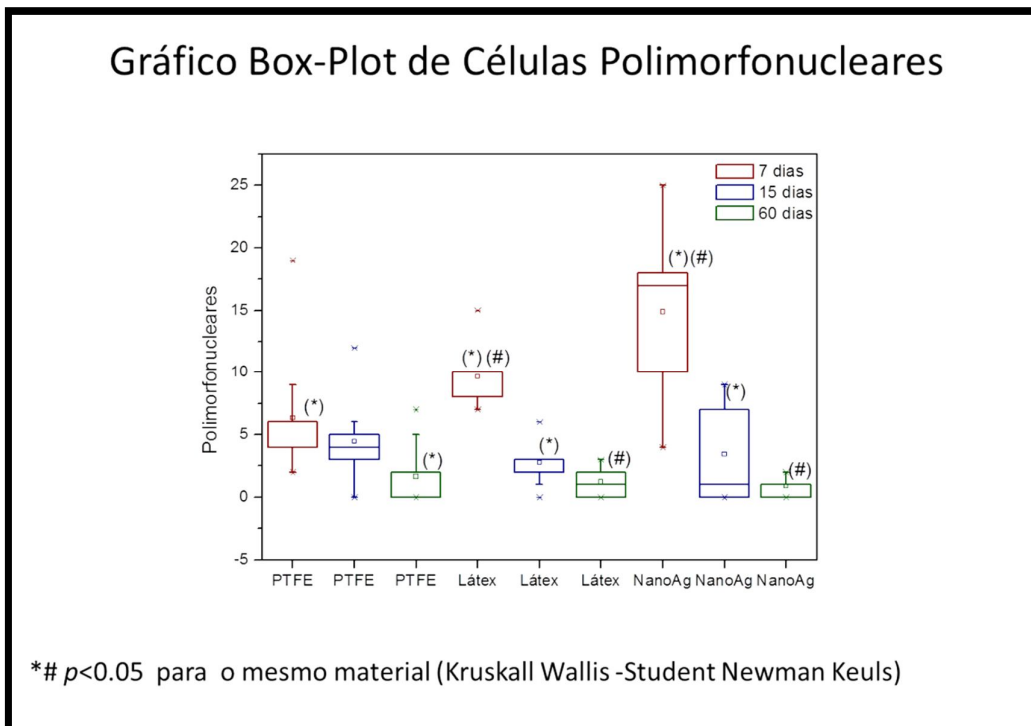


Figura 16 Representação gráfica da quantidade de células polimorfonucleares em função do tempo.

A tabela 3 mostra o resultado da classificação da mediana do número total de células inflamatórias pelo score descrito na tabela 2. Os valores estão representados como número de lâminas no respectivo score/total de lâminas examinadas. Não há diferença estatística entre os scores obtidos.

Tabela 3: Classificação número total células inflamatórias

	Scores			
	1	2	3	4
7 dias				
NanoAg	3/6	3/6	0/6	0/6
Látex	6/6	0/6	0/6	0/6
PTFE	6/6	0/6	0/6	0/6
14 dias				
NanoAg	6/6	0/6	0/6	0/6
Látex	6/6	0/6	0/6	0/6
PTFE	6/6	0/6	0/6	0/6
60 dias				
NanoAg	6/6	0/6	0/6	0/6
Látex	6/6	0/6	0/6	0/6
PTFE	6/6	0/6	0/6	0/6

6. Discussão

O Látex natural, obtido da seringueira *Hevea brasilienses*, despertou grande interesse, em seu estado de borracha, devido suas propriedades de elasticidade, plasticidade, resistência ao desgaste, impermeabilidade. Do ponto de vista biológico, segundo Ferreira et al., (2009) e Mendonça et al. (2010) afirmam sua capacidade de acelerar o processo de angiogênese. Balabanian et al., (2006) atestaram *in vivo* a biocompatibilidade deste biomaterial através do implante intra-ósseo no alvéolo de ratos; e na forma de filme, foi testada como membrana oclusiva em procedimentos de ROG, apresentando bons resultado, conforme Ereno et al. (2010). E quando impreganado com algum

fármaco, a membrana de látex funciona como um “drug delivery”, liberando gradativamente essas substâncias (fig. 1).

Atualmente, várias pesquisas estão sendo conduzidas utilizando nanotecnologia. Nanopartículas de prata estão sendo utilizadas em diversas áreas e, mediante as propriedades antibactericida e antifúngica as nanopartículas ganharam interesse na biotecnologia e bioengenharia. (GUIDELLI et al., 2011; MORONES et al, 2005; TIAN et al, 2007)

KASSAEE et al. (2008) realizaram estudos utilizando as nanopartículas de prata às resinas acrílicas. GOMES-FILHO et al. (2010) associaram as partículas em solução irrigadora de canais radiculares.

O sistema *LatexNanoAg* foi desenvolvido tendo em vista a possibilidade das membranas de látex atuarem como um sistema drug-delivery, segundo Herculano et al., (2009); Herculano et al., (2010); Herculano et al., (2011) e assim aliar as propriedades biológicas do látex às da nanopartículas de Prata.

A resposta tecidual frente ao implante subcutâneo do *LatexNanoAg* foi semelhante ao do Látex e do PTFE, baseado no índice de scores relatado na literatura. (YALTIRIK et al., 2004)

Clinicamente, não se observou alterações no comportamento dos animais ao longo dos períodos de estudo. Os locais de incisão sofreram cicatrização progressiva, compatíveis com o tempo pós-cirúrgico. Não foram observados rubor, edema ou outros sinais de inflamação exacerbada.

Macroscopicamente, durante a remoção dos materiais, observou-se que os materiais encontravam-se no mesmo local de implante, e não foram observados sinais de necrose ou outras reações adversas.

A análise microscópica realizada pela contagem de células inflamatórias mostrou que não há diferenças nas respostas dos materiais (tabela 3, figura 17) ($p > 0.05$, Kruskal Wallis). No entanto, há redução progressiva na quantidade de células quando comparados os períodos iniciais (7 e 15 dias) ao final (60 dias) $p < 0.05$, figuras 15 e 16. Segundo Kafejian et al. (1997), essa redução de células inflamatórias com encapsulamento dos materiais indica que o material implantado não causou agressão aos tecidos, ressaltando que para ocorrer o processo de reparo, a ocorrência da inflamação é primordial. A presença de células gigantes foi escassa, outro indicativo de reação normal.

7. Conclusão

Observou se uma resposta inflamatória dentro da normalidade frente ao implante dos materiais em estudo, tanto o padrão clínico quanto histológico.

Tanto os grupos com membranas de Látex quanto os com sistema *LatexNanoAg* apresentaram se com o mesmo padrão observado no grupo controle, membrana PTFE.

O numero de células inflamatórias em todos grupos e períodos seguirem padrão esperado, com um maior numero de células inflamatórias no período inicial (Inflamação Aguda), 7 dias e posteriormente a redução gradual das células nos períodos mais longos (15 e 60 dias)

Em todos os grupos inicialmente observou se a formação de um tecido de granulação e mais tarde a formação da capsula fibrosa, observada no período de 60 dias.

Conclui se que o material em teste, sistema *LatexNanoAg* não causa reação tecidual exacerbada pois não houve diferença significativa entre a resposta do grupo controle e do Látex.

REFERENCIAS

BALABANIAN CACA, COUTINHO-NETTO J, LAMANO-CARVALHO TL, LACERDA SA, BRENTGANI LG. **Biocompatibility of natural latex implanted into dental alveolys of rats**. Journal of Oral Science, v 48, n. 48, p. 201-205, 2006.

CALLIESTER, W.D. **Ciência e Engenharia de Materiais**. Rio de Janeiro: Editora LCT, 2002.

DURNER J, STOJANOVIC M, URCAN E, HICKEL R, AND REICHL F-X.. **Influence of silver nano-particles on monomer elution from light-cured composites**. Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials, v. 7, n. 27, p. 631-636, 2011.

ERENO C, GUIMARÃES SAC, PASETTO S, HERCULANO RD, SILVA CP, GRAEFF CFO, TAVANO O, BAFFA O, AND KINOSHITA A. **Latex use as an occlusive membrane for guided bone regeneration**. Journal of Biomedical Materials, Research Part A v. 3, n. 95A, p. 932-939, 2010.

FERREIRA M, MENDONÇA RJ, COUTINHO-NETTO J, AND MULATO M.. **Angiogenic properties of natural rubber latex biomembranes and the serum fraction of Hevea brasiliensis**. Brazilian Journal of Physics, v. 39, p. 564-569, 2009

GOMES-FILHO JE, DE MORAES COSTA MT, CINTRA LTÂ, LODI CS, DUARTE PCT, OKAMOTO R, BERNABÉ PFE, NERY MJ, AND CANNON M.. **Evaluation of alveolar socket response to Angelus MTA and experimental light-cure MTA**. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, v. 5, n. 110, p.93-97, 2010.

GUIDELLI EJ, KINOSHITA A, BAFFA O,. **Delivery System of Silver nanoparticles based on latex membranes: Preliminary Results** in 18th ICMP International Conference on Medical Physics – Book of abstracts Porto Alegre, Brazil, 2011.

HERCULANO RD, ALENCAR DE QUEIROZ AA, KINOSHITA A, OLIVEIRA JR ON, AND GRAEFF CFO. **On the release of metronidazole from natural rubber latex membranes**. Materials Science and Engineering: C, v. 2, n. 31, p. 272-275, 2011.

HERCULANO RD, GUIMARÃES SAC, BELMONTE GC, DUARTE MAH, OLIVEIRA JR ON, KINOSHITA A, AND GRAEFF CFO.. **Metronidazole release using natural rubber latex as matrix**. Materials Research, v. 13, p. 57-61, 2010.

HERCULANO RD, SILVA CP, ERENO C, GUIMARAES SAC, KINOSHITA A, AND GRAEFF CFO. **Natural rubber latex used as drug delivery system in guided bone regeneration (GBR)**. *Materials Research*, v. 12, p. 253-256, 2009.

HILL, D. **Design engineering of biomaterials for medical devices**. New York: John Wiley & Sons, 1998.

KAFEJIAN, ANDRÉA PAULA et al . **Estudo comparativo das reações teciduais à implantação de silicone e politetrafluoroetileno no dorso de ratos**. *Acta Cir. Bras.*, São Paulo, 1997. v. 12, n. 3.

KASSAEE MZ, AKHAVAN A, SHEIKH N, AND SODAGAR A.. **Antibacterial effects of a new dental acrylic resin containing silver nanoparticles**. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 3, n. 110, p. 1699-1703, 2008

MENDONÇA RJ, MAURÍCIO VB, DE BORTOLLI TEIXEIRA L, LACHAT JJ, AND COUTINHO-NETTO J.. **Increased vascular permeability, angiogenesis and wound healing induced by the serum of natural latex of the rubber tree *Hevea brasiliensis***. *Phytotherapy Research*, .v. 5, n. 24, p. 764-768, 2010

MORONES JR, ELECHIGUERRA JL, CAMACHO A, HOLT K, KOURI JB, RAMIREZ JT, AND YACAMAN MJ.. **The bactericidal effect of silver nanoparticles**. *Nanotechnology*, v. 10, n. 16, p. 2346. 2005.

SCHAMLZ G AND ARENHOLT-BINDSLEV D (eds) **Dental Materials Berlin Heidelberg Springer**. Verlag, 2009.

SILVEIRA VAS, PEREIRA AC, AMADEI SU. **Interdisciplinary aspect in the research of dental material biocompatibility**. *Taubaté*, v. 4, n. 10, p. 209-213, 2004.

Silver Nanoparticles. **Wikipedia, the free encyclopedia**, 2011. Disponível em <http://en.wikipedia.org/wiki/Silver_nanoparticles>. Acesso em 18 março 2011.

TIAN J, WONG KKY, HO C-M, LOK C-N, YU W-Y, CHE C-M, CHIU J-F, AND TAM PKH. **Topical Delivery of Silver Nanoparticles Promotes Wound Healing**. *ChemMedChem*,, v. 1, n. 2, p. 129-136, 2007.

YALTIRIK M, OZBAS H, BILGIC B, ISSEVER H. **Reactions of Connective Tissue to Mineral Trioxide Aggregate and Amalgam**. *Journal of endodontics*, v. 2, n. 30, 95-9, 2004.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

USC UNIVERSIDADE
SAGRADO
CORAÇÃO
Líderes com coração

PRPPG
Pró-reitoria
de Pesquisa e
Pós-graduação

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**CERTIFICADO**

Baseado em parecer competente este Comitê de Ética em Pesquisa analisou o Projeto “*ESTUDO IN VITRO DA BIOCAMPATIBILIDADE DE MEMBRANA DE LÁTEX ASSOCIADA A NANOPARTÍCULAS DE PRATA*”, Protocolo nº 039/11, tendo como responsável o Pesquisador **ANGELA MITIE OTTA KINOSHITA** e o considerou **APROVADO**.

Bauru, 28 de abril de 2011.



Prof. Dr. Marcos da Cunha Lopes Virmond
Presidente Comitê de Ética em Pesquisa – USC