



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: IMPLANTODONTIA

DÉBORA AMGARTEN RIBEIRO

**ANÁLISE DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA À IMPLANTAÇÃO
DE MEMBRANAS DE PLGA+LACTAMAS E PLGA+
NANOPARTÍCULAS DE PRATA NO TECIDO SUBCUTÂNEO
DE RATOS**

Dissertação de Mestrado

Florianópolis
2016

DÉBORA AMGARTEN RIBEIRO

**ANÁLISE DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA À IMPLANTAÇÃO
DE MEMBRANAS DE PLGA+LACTAMAS E PLGA+
NANOPARTÍCULAS DE PRATA NO TECIDO SUBCUTÂNEO
DE RATOS**

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração: Implantodontia.

Professor Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
Professor Coorientador: Águedo Aragones

Florianópolis
2016

Débora Amgarten Ribeiro

**ANÁLISE DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA À IMPLANTAÇÃO
DE MEMBRANAS DE PLGA+LACTAMAS E PLGA+
NANOPARTÍCULAS DE PRATA NO TECIDO SUBCUTÂNEO
DE RATOS**

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do Título de “MESTRE EM ODONTOLOGIA - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO IMPLANTODONTIA”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Florianópolis, 29 de fevereiro de 2016.

Profa. Dra. Izabel Cristina Santos Almeida
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da
Universidade Federal de Santa Catarina

Débora Amgarten Ribeiro

**ANÁLISE DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA À IMPLANTAÇÃO
DE MEMBRANAS DE PLGA+LACTAMAS E PLGA+
NANOPARTÍCULAS DE PRATA NO TECIDO SUBCUTÂNEO
DE RATOS**

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
Orientador - UFSC

Profa. Dra. Elena Riet Correa Rivero
Membro - UFSC

Profa. Dra. Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro
Membro - UFSC

Profa. Dra. Andréa Lima Pimenta
Membro - UFSC

Prof. Dr. César Magalhães Benfatti
Suplente - UFSC

*Dedico este trabalho a você, vizinho.
Sei que estaria muito feliz em estar presente neste
momento! Obrigada por ser minha referência de
dedicação e esforço.*

AGRADECIMENTOS

*Agradeço primeiramente a **Deus**. Por guiar meus passos sempre pelo melhor caminho, ainda que tortuoso. Por colocar ao meu redor tantos “anjos”, que tornam o caminhar menos árduo e muito mais prazeroso.*

*Agradeço à minha família, principalmente minha **mãe**, Regina, meu **pai**, João Fernando, meus irmãos **Leonardo** e **Murilo**. Vocês são meu centro, um porto seguro nos momentos de incerteza e a força que me move sempre para frente. Amo vocês!*

- Mãe, obrigada por ser minha melhor amiga; por estar sempre presente, me apoiando em cada decisão e inquietude e por fazer tudo tão mais fácil para todos nós!

*Aos meus avós: **João** (in memoriam), **Anita**, **Décio** e **Terezinha**, por serem meu exemplo e me ensinarem que na humildade e simplicidade se traça uma grande trajetória. Sucesso maior que essa família linda e cheia de amor não há!*

*Aos meus padrinhos, **Dione** e **Cláudio**, pelo amor e por me ajudarem a realizar meus sonhos; por serem exemplo de bondade e pureza, ao mesmo tempo em que são fortaleza.*

*Ao meu orientador, **Professor Ricardo de Souza Magini**, um grande exemplo de professor, orador; de inteligência e memória ímpares. Com você aprendi a paixão pela docência e a beleza de ser “Mestre”. Muito obrigada!*

Aos demais professores do CEPID:

***Professor Antônio Carlos Cardoso**, que me fez questionar certezas, da profissão e da vida e, sem dúvida, esteve disposto a nos*

tornar melhores. De todos os conhecimentos passados, o pensamento crítico foi o maior deles! Obrigada.

Professor Marco Aurélio Bianchini, que com sua praticidade e sinceridade, nos instiga a sermos melhores e a buscarmos o que realmente importa! Obrigada por todas as oportunidades dadas!

Professor César Benfatti, com sua disponibilidade e paciência, entrega à profissão e ao CEPID, se mostrou um grande amigo e um exemplo a ser seguido. Muito obrigada por tudo!

Professores Júlio Souza, Luiz Mezzomo e Professora Cláudia Volpato, pela ótima convivência e pela oportunidade de aprender com a experiência de vocês, sempre de maneira leve! Obrigada.

Ao meu coorientador, **Águedo Aragones**, pela paciência e disponibilidade, pelas conversas e principalmente pela oportunidade de fazer parte deste projeto.

A todos os **professores da Pós-Graduação**, pelo conhecimento passado e pela convivência durante esses dois anos.

Aos meus amigos/parceiros de caminhada na pesquisa: **Emiliana Antunes Menegazzo**, obrigada pelo companheirismo e dedicação; por, assim como eu, querer que tudo desse certo sempre! Foi muito bom te ter ao meu lado. Obrigada! Ao **Renan Dias**, pela paciência e boa vontade, obrigada! Peço desculpas pelas vezes que não pude te atender! Quero que saibam que podem contar comigo sempre! À minha “musa inspiradora” **Isis de Carvalho Encarnação**, de certa forma mentora deste encontro e deste trabalho. Muito obrigada pela ajuda e pela amizade. Você é muito especial!

Agradecimento mais que especial às nossas “anjas”, Professora **Elena Riet Corrêa Rivero**, sempre e sempre disponível para nos atender

e socorrer! Sua dedicação e amor ao que faz são inspiradores; suas doçura e firmeza na medida certa fazem a convivência e seus ensinamentos muito agradáveis! Muito, muito obrigada por tudo!

*Professora **Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro**, pela doçura e disponibilidade para me ouvir sempre, e pelos conhecimentos passados em cada oportunidade! És um exemplo para mim! Muito obrigada!*

*À Professora **Andréa de Lima Pimenta**, que sempre esteve disponível, com sua alegria e entrega à pesquisa, para esclarecer nossas dúvidas e contribuir com seus conhecimentos e novas ideias! Obrigada por viabilizar este projeto com suas descobertas e enriquecê-lo sempre!*

*Ao Professor **Adair Roberto Soares dos Santos**, por nos acolher e aos nossos animais, viabilizando a execução deste trabalho. Muito obrigada! Ao Professor **Alexandre Onofre** e à **Elaine Borsatto**, agradeço por nos permitirem utilizar o microscópio multiobservador e o laboratório e pelo carinho e atenção!*

Ao Núcleo de Pesquisa em Materiais Cerâmicos e Compósitos (CERMAT), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), fundamental para a confecção das membranas utilizadas neste estudo.

*Aos professores da Patologia, **Filipe Modolo**, **Rogério Gondak** e **Rodrigo de Lima**, e os técnicos **Tiago** e **Sônia** pela convivência e ajuda em muitos momentos no laboratório.*

*À **Silvane** e **Fran**, pela disponibilidade e ajuda indispensáveis para o bom funcionamento do CEPID.*

*Aos funcionários e servidores da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, em especial a **Ana Maria Frandolozo**, pela disponibilidade e simpatia.*

Aos **animais** utilizados nesta pesquisa, todo o meu respeito e gratidão pelo bem prestado à ciência.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** – CNPq, pelo apoio financeiro durante o mestrado.

A todos que, de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho!

Agradeço, agora, àqueles que fizeram dos meus dois anos de Florianópolis muito especiais!

Agradeço aos meus amigos: **Bruna Barbosa Corrêa**, pela amizade desde que me lembro, por saber o que eu penso só com o olhar. Por compartilhar sempre comigo, os bons e maus momentos, alguns ideais de vida e sonhos, e por ser tão diferente que me ensina todo dia! Obrigada por me abrir as portas da sua casa, onde sempre me senti na minha!

Gabriel Magrin, meu parceiro de todas as horas. Obrigada por ser essa pessoa tão alegre, tão disposta, e tão dedicada, que às vezes irrita! Pelas incontáveis horas de conversas e reflexões, por partilhar das mesmas ideias e manias e por ser alguém que admiro muito!

Patrícia Medeiros, minha palitinha! Seu jeito doce ao mesmo tempo que forte me faz ter certeza do seu sucesso. Obrigada pela amizade, carinho e cuidado! Torço muito por você!

Felipe Damerou (Pepes), obrigada por ser minha alegria de viver, cantando para mim na clínica sempre que eu peço, Haha! Seu jeito leve de ver a vida torna tudo mais leve à sua volta! A amizade por interesse rendeu, viu!

*Meus “gringos” preferidos: **Miguel, Dani e Jair**. Obrigada pelo tempo compartilhado, pelas experiências trocadas e pela amizade, que vai além da parceria da clínica!*

*À minha querida **Carol Morsch** (Morschinha), toda a minha gratidão não seria suficiente para você. Sempre disponível, sempre se doando, sempre sendo Carol. Guerreira, competente e acima de tudo doce e humana! És minha inspiração todos os dias!*

*Aos amigos do CEPID, **Gabi, Carol Rafael, Letícia, Juan, Thaise, Mariane, Mada, Adri, Karin, Abra, Maurício, Bernardo, Artur, Gil, Haline, Zé, Cintia, Clessius, Guenther e Rafa Cid**, obrigada pelos momentos vividos juntos, pela amizade e mais ainda pelo conhecimento compartilhado.*

A todos os colegas de mestrado e de pós-graduação pelos bons momentos vividos.

*Às minhas queridas amigas que o mestrado me trouxe: **Angela Giacomini**, que como você mesma diz, parece ser de sempre para sempre! Obrigada por ser leve e querida, por compartilhar muitas ideias e alguns sonhos. Só te desejo o melhor!*

***Iane Nery e Renata Vasconcelos**, nem preciso dizer o quanto vocês são especiais para mim! Obrigada por partilharem comigo esses dois anos e uma vida ainda! Tenho certeza que ganhei uma irmã baiana e uma de Natal. Obrigada por serem meu porto seguro, amo vocês!*

***Morgane, Alana e Camilo, Guchinha, May, Andria, Jussara, Manu, Dani, Carla, Bruna, Charo, Ana Carol**, obrigada por partilharem momentos importantes comigo. Por serem alegria e força aqui em Florianópolis!*

*“Os que se encantam com a prática sem a ciência são
como os timoneiros que entram no navio sem timão
nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”.*

Leonardo da Vinci

RESUMO

As implicações biológicas da incorporação de agentes antibiofilmes às membranas utilizadas nas técnicas reconstrutivas de tecido ósseo não estão completamente esclarecidas. O objetivo deste estudo foi analisar a resposta inflamatória à implantação subcutânea de membranas de PLGA (ácido polilático co-glicólico) associadas a duas categorias de agentes antibiofilme: quatro tipos de lactamas e dois de nanopartículas de prata. Foram implantados, ao todo, 08 tipos de membranas (controles e testes) em 45 ratos Wistar adultos machos, distribuídos aleatoriamente nos períodos experimentais de 2, 7 e 30 dias. Cada animal recebeu 04 discos de membrana de 6mm de diâmetro, sendo que em todos os animais, 02 sítios obrigatoriamente receberam os discos controle (PLGA puro e colágeno) e os outros 02 sítios receberam, randomicamente, discos teste. Após cada período experimental, os animais foram anestesiados e submetidos a biópsias excisionais das áreas dos implantes e punção cardíaca (eutanásia) para a coleta de amostras de sangue e análise laboratorial - hemograma. As amostras removidas foram fixadas em formol, processadas e incluídas em parafina. A partir de cortes semi-seriados de 5 micrometros, foram confeccionadas as lâminas histológicas, coradas com HE para análise descritiva e semi-quantitativa da resposta inflamatória e biocompatibilidade dos compostos testados. A membrana controle de colágeno foi a que mostrou maior reação tecidual ao longo dos 30 dias, com presença de macrófagos e células gigantes multinucleadas. As membranas testadas mostraram reação amena, muito semelhante entre si, e à membrana controle de PLGA puro. Dentro dos períodos experimentais testados, as amostras teste mostraram melhor resposta tecidual que as amostras controle.

Descritores: Antibacterianos. Biofilmes. Inflamação. Lactamas. Materiais biocompatíveis. Membranas. Nanopartículas. Prata.

ABSTRACT

Biological aspects of the use of membranes for tissue reconstructive procedures embedded with anti-bacterial agents are not completely elicited. The aim of this study was to analyze the inflammatory response to subcutaneous implantation of bioabsorbable poly(lactic-co-glycolic acid) - PLGA membranes embedded with two different categories of anti-bacterial agents: four types of lactams and two silver nanoparticles. Collagen and pure PLGA membranes were used as control groups. Each animal randomly received 04 membranes, 02 of them necessarily the control discs. After 02, 07 and 30 days of implantation, the animals were anesthetized for the excisional biopsy of the implant areas and for blood sample collections through cardiac puncture (euthanasia). The skin samples were histologically processed and embedded in paraffin to undergo semi-serial cuts of 5 micrometers; these slides were stained using Hematoxylin-Eosin and descriptively analyzed by light microscopy. Semi-quantitative inflammatory response analyses of the tested compounds were also made. Both tested antibiofilm agents showed a similar mild reaction with a good resolution at the end of the experimental period. Within the experimental periods tested, the test samples showed better tissue response than the control samples.

Keywords: Anti-bacterial agents. Biocompatible materials. Biofilms. Inflammation. Lactams. Membranes. Nanoparticles. Silver.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: **Lactamas I,II,III e IV**, respectivamente..... 41
- Figura 2: **Confecção das membranas**. Discos de membranas com 6 mm de diâmetro (da esquerda para a direita: Colágeno, PLGA puro, PLGA + Lactama I, PLGA + Lactama II, PLGA + Lactama III, PLGA + Lactama IV, PLGA + NpAg I e PLGA + NpAg II). 43
- Figura 3: **Procedimento Cirúrgico**. A) Região dorsal após tricotomia e antisepsia; B) Guia de acetato posicionada; C) Delimitação das lojas cirúrgicas; D) Incisão; E) Divulsão; F) Inserção do disco de membrana (subcutâneo); G e H) Sutura. 45
- Figura 4: **Parâmetros adotados quanto à magnitude do infiltrado inflamatório na área de tecido conjuntivo reacional (HE - 40X)**. A) Escasso; B) Leve; C) Moderado e D) Intenso. **Asterisco (*)**: fibroblastos maduros em cápsula organizada. **Setas**: células inflamatórias. 50
- Figura 5: **Parâmetros adotados quanto à espessura de cápsula (HE – 10X)**: A) Espessa; B) Fina; C) Intermediária. 51
- Figura 6: **A) Colágeno 2 dias (HE 400X)** Processo inflamatório misto leve presente no tecido circunjacente à membrana e neoformação de vasos sanguíneos (v). **B) Colágeno 7 dias (HE 400X)** Processo inflamatório crônico escasso e cápsula conjuntiva em organização com presença de fibroblastos jovens (f) em meio às fibras mais organizadas. **C) Colágeno 30 dias (HE 400X)** Processo inflamatório crônico intenso na área de implantação da membrana e leve na cápsula. **D) PLGA 2 dias (HE 400X)** Processo inflamatório misto moderado e cápsula conjuntiva com presença de fibroblastos (f). **E) PLGA 7 dias (HE 400X)** Infiltrado inflamatório inexpressivo e cápsula conjuntiva bem organizada. **F) PLGA 30 dias (HE 400X)** Processo inflamatório crônico escasso e cápsula conjuntiva bem organizada, com presença de fibroblastos (f) jovens e maduros. * **Áreas de implantação da membrana**. **Setas**: Células inflamatórias..... 65

Figura 7: **A) PLGA+Lactamas 2 dias (HE-400X)** Processo inflamatório inexpressivo na área de implantação próxima ao tecido muscular e cápsula conjuntiva de tipo e espessura intermediárias. **B) PLGA+Lactamas 7 dias (HE-400X)** Processo inflamatório crônico leve e cápsula conjuntiva de tipo e espessura intermediárias, com presença de fibroblastos jovens (f) em meio às fibras em organização. **C) PLGA+Lactamas 30 dias (HE-400X)** Processo inflamatório crônico discreto, com cápsula conjuntiva de tipo e espessura intermediárias, com fibroblastos (f) em meio às fibras mais organizadas. **D) PLGA+NpAg 2 dias (HE-400X)** Processo inflamatório misto intenso e cápsula conjuntiva espessa composta por tecido de granulação. **E) PLGA+NpAg 7 dias (HE-400X)** Infiltrado inflamatório inexpressivo e cápsula conjuntiva de tipo e espessura intermediárias. **F) PLGA+NpAg 30 dias (HE-400X)** Processo inflamatório inexpressivo e cápsula conjuntiva de tipo intermediário, com presença de fibroblastos (f) jovens e maduros e neoformação de vasos sanguíneos (v). * **Áreas de implantação da membrana. Setas: Células inflamatórias.**66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Índice Kappa Inter examinadores e critérios de classificação dos níveis de concordância do coeficiente Kappa para cada variável estudada.....	48
Tabela 2: Frequência e associação das características do processo inflamatório com os grupos estudados para o período experimental de 2 dias.	60
Tabela 3: Frequência e associação das características do processo inflamatório com os grupos estudados para o período experimental de 7 dias.	61
Tabela 4: Frequência e associação das características do processo inflamatório com os grupos estudados para o período experimental de 30 dias.	62
Tabela 5: Teste não-paramétrico de Spearman para verificar a correlação entre as variáveis.....	63
Tabela 6: Médias e desvios-padrão dos parâmetros séricos de acordo com os grupos estudados, e o detalhamento estatístico pelo teste Tukey HSD.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABREVIATURAS

BIOM - Biomaterial

CBE - Companhia Brasileira de Esterilização

CCB - Centro de Ciências Biológicas

CERMAT - Núcleo de Pesquisa em Materiais Cerâmicos

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CGMN - Células Gigantes Multinucleadas

CHC - Concentração de Hemoglobina Corpuscular

CHCl₃ - Clorofórmio

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EC - Espessura da Cápsula

Eos - Eosinófilos

h - Hora(s)

HA - Hidroxiapatita

HCM - Hemoglobina Corpuscular Média

HCT - Hematócrito

HE - Hematoxilina-Eosina

HGB - Hemoglobina

LANDI - Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação

Lin - Linfócitos

Ltda. - Limitada

m/v - Massa por volume

MAC - Macrófagos

mg/kg - Miligrama por quilograma

MI - Magnitude do Infiltrado
mm - Milímetros
Mon - Monócitos
NECR - Necrose
NEOV - Neovascularização
NPAg - Nanopartículas de prata
PA - ACS - Para Análise - *American Chemical Society*
PGA - Ácido Poliglicólico
pH - Potencial Hidrogeniônico
PI - Processo Inflamatório
PLA - Ácido Polilático
PLGA - Ácido polilático co-glicólico
PLT - Plaquetas
PTFE - Politetrafluoretileno
PTFE-e - Politetrafluoretileno expandido
RBC (Red Blood Cells) - Hemácias
RDW (Red Cell Distribution Width) - Índice de Anisocitose
ROG - Regeneração Óssea Guiada
RTG - Regeneração Tecidual Guiada
Seg - Neutrófilos Segmentados (maduros)
TC - Tipo de Cápsula
UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina
VCM - Volume Corpuscular Médio
WBC (White Blood Cells) - Glóbulos Brancos

SÍMBOLOS

® - Marca registrada

°C - Grau Celsius

± - Mais ou menos

% - Por cento

nº - Número

µm - Micrômetros

X - Vezes

+ - Mais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	29
OBJETIVO GERAL:	37
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	37
2 METODOLOGIA.....	39
ANTIBIOFILMES TESTADOS.....	41
OBTENÇÃO E PREPARO DAS MEMBRANAS	42
PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	43
COLETA DAS AMOSTRAS DE TECIDO SUBCUTÂNEO	44
COLETA/ANÁLISE DAS AMOSTRAS SÉRICAS	46
<i>Parâmetros Séricos Adotados</i>	46
PROCESSAMENTO E ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS AMOSTRAS DE TECIDO.....	47
<i>Parâmetros Microscópicos Adotados</i>	49
ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	52
3 RESULTADOS.....	55
<i>Colágeno</i>	55
<i>PLGA</i>	56
<i>PLGA+Lactamas</i>	56
<i>PLGA+NpAg</i>	57
4 DISCUSSÃO	67
5 CONCLUSÃO	75
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

7 ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA - UFSC).....	89
--	----

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

Após a perda dentária, o processo alveolar sofre uma remodelação que implica tanto na sua redução em altura como em espessura. Esta perda pode trazer prejuízos estéticos e funcionais que muitas vezes dificultam ou até impossibilitam a reabilitação com implantes osseointegrados (DAMIEN; PARSONS, 199; ARAÚJO; LINDHE, 2005; VAN DER WEIJDEN). Para reabilitar pacientes edêntulos com rebordos alveolares atróficos são necessários procedimentos de reconstrução óssea (BUSER et al., 1996; CHIAPASCO; CASENTINI; ZANIBONI, 2009) e os enxertos ósseos autógenos ainda são considerados padrão ouro, embora por vezes, existam dificuldades relacionadas com a quantidade disponível de material autógeno nas áreas doadoras além das consequentes morbidades e complicações locais relacionadas à necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica para a coleta de material a ser enxertado (MCALLISTER; HAGHIGHAT, 2007).

Como alternativa à utilização exclusiva do enxerto ósseo autógeno, uma das técnicas reconstrutivas mais aplicadas para estimular a neoformação óssea é a Regeneração Óssea Guiada (ROG) que, assim como a Regeneração Tecidual Guiada (RTG), utiliza uma barreira física para que haja migração celular seletiva, evitando uma invasão do tecido epitelial e de fibroblastos do tecido conjuntivo, durante o período de cicatrização, nos sítios onde se deseja nova formação óssea para aumento ou preservação do rebordo alveolar em altura e espessura (DAHLIN et al., 1988; DAHLIN et al., 1990; SALONEN; PERSSON, 1990; HÄMMERLE; KARRING, 1998; BUSER et al., 2000). As membranas,

comumente utilizadas como barreira física tecidual nas técnicas reconstrutivas, devem apresentar características como: biocompatibilidade, permeabilidade seletiva, degradação controlada, estabilidade dimensional e rigidez adequadas para funcionar como mantenedora de espaço, facilidade de manejo cirúrgico, além de permitir a adição de substâncias como antimicrobianos e bioestimuladores (RETZEPI; DONOS, 2010).

Dentre as membranas que podem ser utilizadas nos procedimentos reconstrutivos, existem diferenças quanto à reabsorção - membranas absorvíveis e não absorvíveis - e ao tipo de material com o qual são fabricadas - de origem animal (naturais), sintéticas ou derivadas de polímeros. Dentre as absorvíveis, as membranas de colágeno, geralmente de origem animal, são consideradas “padrão ouro” por proporcionarem facilidade na manipulação e baixa imunogenicidade, já que é a proteína estrutural mais abundante no tecido conjuntivo - um terço do total de proteínas do corpo (HUTMACHER; HÜRZELER; SCHLIEPHAKE, 1996). Entretanto, apresentam baixa estabilidade dimensional e rápida absorção, dificultando sua indicação para procedimentos mais extensos e complexos (SCHLEGEL et al.1997; ROTHAMEL et al., 2004; FERREIRA et al., 2012). O colágeno é reabsorvido através das vias de degradação enzimática (colagenases/proteases), de enzimas derivadas de macrófagos e/ou leucócitos polimorfonucleares e proteases bacterianas (HUTMACHER; HÜRZELER; SCHLIEPHAKE, 1996; TATAKIS; PROMSUDTHI; WIKESJÖ, 1999; ROTHAMEL et al., 2004), como as que fazem parte do ciclo metabólico de periodontopatógenos e mostraram degradar proteínas

humanas de importância biológica. A *P. gingivalis* tem alta afinidade pelo colágeno e acelera sua degradação (SELA et al., 2009).

As membranas derivadas de polímeros são uma alternativa às limitações das membranas de colágeno. Das primeiras a serem produzidas para utilização em regeneração tecidual, as confeccionadas em politetrafluoretileno, expandido ou não (PTFE/PTFE-e), não podem ser absorvidas pelo organismo, o que confere estabilidade dimensional por um longo período; no entanto, estão mais sujeitas à exposição ao meio bucal e processos inflamatórios/infecciosos, além da necessidade de uma segunda etapa cirúrgica para sua remoção após o período de regeneração (HÜRZELER et al., 1998; ROTHAMEL et al., 2004). A introdução de barreiras poliméricas absorvíveis nos procedimentos reconstrutivos objetivou contornar as limitações anteriores e, em geral, são confeccionadas a partir dos ácidos polilático (PLA) e poliglicólico (PGA) ou a combinação de ambos - ácido polilático co-glicólico (PLGA) (TATAKIS; PROMSUDTHI; WIKESJÖ, 1999).

Os polímeros derivados do ácido poliglicólico (PGA) exibem boas propriedades mecânicas e seu principal uso é como material de suporte; já os derivados do ácido polilático (PLA) são biocompatíveis, possuem alta resistência, comportamento termoplástico e degradação lenta. A combinação destes polímeros permite melhorar suas propriedades físicas e químicas, diminuindo a dureza de suas fibras e modulando o seu tempo de degradação; tornando-a uma boa alternativa para a obtenção de um material com as propriedades desejadas para o uso em procedimentos reconstrutivos (HUTMACHER; HÜRZELER;

SCHLIEPHAKE, 1996; OWEN et al., 2010; DANHIER et al., 2012; CHEN et al., 2012).

As membranas derivadas dos ácidos polilático e poliglicólico, sofrem uma degradação hidrofílica lenta sendo que, na primeira fase, a água penetra na superfície do dispositivo, convertendo longas cadeias poliméricas em cadeias menores e, finalmente, em fragmentos solúveis. Neste momento, há uma redução na massa molar sem a perda das propriedades físicas, seguida pela perda das propriedades físicas e fragmentação do dispositivo. Na segunda fase, os produtos da hidrólise são incorporados ao ciclo de Krebs e metabolizados, o que resulta em rápida perda da massa polimérica (ATHANASIOU; NIEDERAUER; AGRAWAL, 1996; IGNATIUS e CLAES, 1996; DUEK, et al. 1999). A duração de cada uma dessas fases e a taxa de degradação dependem da natureza do polímero, do pH, temperatura, grau de cristalinização, hidrofiliabilidade, morfologia, densidade de ligação, composição da superfície e volume da membrana. A adição de alguns compostos, como monômeros, drogas, catalisadores e compostos ácidos ou básicos, bem como modificações na estrutura química, já demonstraram afetar o grau de degradação destes polímeros, o que leva a crer que o tempo em função destas membranas ainda não pode ser completamente controlado (HÄMMERLE; JUNG, 2003; YU; ZHOU, 2003; RETZEPI; DONOS, 2010).

Mesmo ainda não tendo uma cinética de degradação e interação com o hospedeiro de todo elucidadas, devido à escassez de estudos de longo prazo, o PLGA é uma alternativa que vem sendo muito utilizada na biomedicina: revestindo tubos, cateteres urinários, fios de sutura, fixações

ósseas (HUTMACHER; HÜRZELER; SCHLIEPHAKE, 1996; GÓMEZ et al., 2006), além de permitir a incorporação de substâncias antimicrobianas, imunoestimulantes e anti-inflamatórias, com liberação local controlada (OWEN et al., 2010; DANHIER et al., 2012; CHEN et al., 2012).

Um pré-requisito para o sucesso de qualquer tratamento regenerativo/reconstrutivo é um processo de cicatrização livre de infecções. A adesão bacteriana e a colonização de membranas expostas podem resultar no desenvolvimento de infecção e conseqüente falha do tratamento regenerativo (SELA et al., 2009). O equilíbrio das interações hospedeiro - bactérias presentes no biofilme da cavidade bucal é de grande importância para a conclusão adequada do tratamento regenerativo; um desequilíbrio pode provocar injúrias aos tecidos com potencial prejuízo à neoformação óssea (MOMBELLI, 2002).

O processo inicial de aderência bacteriana ocorre de forma organizada: minutos após a higiene bucal, forma-se a película adquirida nas superfícies – dentes, implantes ou nas membranas, se/quando expostas (LISTGARTEN, 1972; LISTGARTEN; MAYO; TREMBLAY, 1975; LISTGARTEN, 1976). Em uma etapa seguinte à formação da película adquirida, as células bacterianas que estavam reversivelmente fixadas à superfície, se unem irreversivelmente à ela e passam a secretar a matriz extracelular que irá estruturar o biofilme, o que já lhes confere certa resistência aos antimicrobianos. Novas bactérias planctônicas são recrutadas e incorporadas ao biofilme, embebidas em uma matriz altamente hidratada de exopolímeros bacterianos e se proliferam até adquirirem a forma de microcolônias aderidas. O biofilme passa a

apresentar uma conformação tridimensional que lhe confere grande heterogeneidade estrutural e microambientes com distintas concentrações de O₂ e de nutrientes. Após a maturação do biofilme, algumas bactérias da periferia passam do estado sésil para o estado flagelar móvel, possibilitando a colonização de um novo ambiente.

E assim, a maioria das bactérias patogênicas passa a coexistir como uma comunidade complexa (COSTERTON et al., 1987; DAVIES, 2003; CARNIOL; GILMORE, 2004; RICHARDS & MELANDER, 2009), atuando como uma entidade multicelular quando um determinado nível populacional é atingido. Estas comunidades bacterianas organizadas em biofilmes possuem mecanismos de percepção da densidade populacional, conhecido como “*Quorum Sensing*”, e interagem através da produção de sinais moleculares sintetizados pelas células e detectados por receptores específicos (CHA et al., 1998; DAVIES, 2003; HALL-STOODLEY et al., 2004). Esta sinalização inclui o aumento da expressão e a troca de genes benéficos para a manutenção do biofilme; alterações fenotípicas na morfologia da colônia; produção de grandes quantidades de polímeros extracelulares; maior acesso aos nutrientes e maior proximidade entre as células, o que facilita interações ecológicas de mutualismo, sinergismo e de proteção (COSTERTON et al., 1987), tornando-as capazes de resistir aos antibióticos convencionais e permitindo a evolução de espécies resistentes (DAVIES, 2003).

Para combater as infecções microbianas, alguns compostos atuam nos seus estágios iniciais, na adesão bacteriana ou através do bloqueio do “*quorum sensing*”; e inibem a formação e manutenção dos biofilmes sem promover a morte dos patógenos, diminuindo a

possibilidade de desenvolvimento de resistência por parte das bactérias (MUSK; HERGENROTHER, 2006; PIMENTA et al., 2013; PEREIRA et al., 2014). Uma classe de compostos que desempenha este papel é o grupo das furanonas halogenadas naturais, isoladas da alga vermelha *Delisea pulchra*, que demonstraram atividade inibitória contra a formação de biofilme em *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* (REN; SIMS; WOOD, 2001; REN; SIMS; WOOD, 2002; MANEFIELD et al., 2002; HENTZER et al., 2002; HENTZER et al., 2003). A dificuldade na obtenção das furanonas naturais e sua alta citotoxicidade estimularam o desenvolvimento de compostos análogos sintéticos, com estrutura química semelhante, e que também atuam como potenciais inibidores de biofilme; dentre eles, as lactamas (HE et al., 2012; PEREIRA et al., 2014).

Além das lactamas, as nanopartículas de prata (NPAg) vêm sendo utilizadas como alternativa aos antibióticos tradicionais, na nanoquímica e nanoengenharia médica e farmacêutica, bem como nas indústrias alimentícia e têxtil, com o objetivo de limitar o crescimento bacteriano (CHOPRA, 2007; VIGNESHWARAN et al., 2007), prevenir a colonização bacteriana na superfície de cateteres e próteses (GOSHEGER et al., 2004; SAMUEL; GUGGENBICHLER, 2004) e inibir a formação de biofilmes (PARK et al., 2013; SECINTI et al., 2011). As NPAg mostraram-se efetivas como curativos na redução de infecções microbianas da pele, do tecido ósseo e em feridas; atuando de maneira local e diminuindo o período de administração de antibióticos sistêmicos (ULKUR et al., 2005). É sabido que as nanopartículas de prata atuam em um amplo espectro bacteriano, incluindo bactérias gram-positivas e gram-

negativas, mas os mecanismos de ação através dos quais exercem a sua atividade não estão completamente elucidados. A indução de danos no DNA, a inibição enzimática, a geração de espécies reativas de oxigênio e a ruptura das membranas celulares são mecanismos sugestivos da ação antimicrobiana das NPAg. (STEVENS et al., 2009; MARTINEZ-GUTIERREZ et al., 2010; PARK et al., 2013). Estas nanopartículas apresentam grande solubilidade e reatividade química e, por isso, existe uma preocupação geral com a toxicidade e a segurança na administração em suas diversas formas (PARK et al., 2011).

Um recente trabalho deste grupo de pesquisa demonstrou, *in vitro*, altos níveis de viabilidade celular quando o PLGA + Hidroxiapatita foi incorporado com antibiofilmes - três tipos de lactamas e nanopartículas de prata. Todos os compostos reduziram o biofilme em mais de 99% e apresentaram porcentagens de sobrevivência celular que viabilizam sua utilização (PEREIRA-NETO, 2013). A incorporação de nanopartículas de prata (NPAg) ao PLGA já havia demonstrado reduzir fortemente o crescimento bacteriano. Em baixas concentrações, algumas nanopartículas foram capazes de induzir mudanças morfológicas na superfície de polímeros e afetar a molhabilidade e rugosidade do mesmo, influenciando no processo de adesão bacteriana e prevenindo a formação de biofilme (LEE et al., 2006; FORTUNATI et al., 2007).

Neste contexto, somado ao fato de a principal intercorrência nas cirurgias regenerativas ser a contaminação da membrana - se exposta - o desenvolvimento de compostos capazes de inibir a formação de biofilmes tornou-se excelente alternativa aos antibióticos convencionais. Esses compostos inibidores da formação e manutenção dos biofilmes

promovem um efetivo combate às infecções microbianas, diminuindo a possibilidade de desenvolvimento da resistência bacteriana (MUSK; HERGENROTHER, 2006). A incorporação de agentes antibiofilmes às membranas absorvíveis e sintéticas possui relevância clínica inquestionável na odontologia, para prevenir infecções e melhorar a previsibilidade das técnicas reconstrutivas de tecido ósseo. No entanto, a revisão de literatura realizada para este trabalho demonstrou divergências quanto às implicações biológicas, em animais e humanos, da utilização destes antibiofilmes incorporados aos biomateriais empregados na estimulação da regeneração óssea/tecidual.

OBJETIVO GERAL:

Avaliar a resposta inflamatória promovida por Lactamas e Nanopartículas de prata incorporadas a membranas de PLGA e implantadas no tecido subcutâneo de ratos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a) Avaliar, histologicamente, a intensidade da resposta inflamatória gerada nos tecidos ao redor das membranas implantadas.
- b) Descrever e quantificar, por meio de escores, os eventos teciduais correlacionados à inflamação encontrados nos tecidos em contato com os materiais implantados.
- c) Analisar a hemocompatibilidade dos materiais estudados.

2 METODOLOGIA

Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sob o protocolo PP00920 (em anexo); e foi desenvolvido juntamente com outros dois projetos de Iniciação Científica, um deles com bolsa PIBITI - CNPq, intitulado “Avaliação da biocompatibilidade das membranas absorvíveis de PLGA+Lactamas e PLGA+ Nanopartículas de prata em tecido subcutâneo de ratos - estudo in vivo”, e o outro com bolsa PIBIC - CNPq, intitulado “Avaliação da toxicidade, distribuição e acúmulo das nanopartículas de prata e lactamas em fígado e rim de ratos”.

Para a realização do experimento foram utilizados 45 ratos (*Rattus norvegicus albinus* - Wistar) provenientes do Biotério Central da UFSC; sendo todos eles machos adultos jovens (08 semanas), pesando aproximadamente 280 gramas e mantidos em gaiolas coletivas (05 animais por gaiola) higienizadas periodicamente, em uma sala com 20°C (+/- 2°C), 60% (+/- 5%) de umidade e em ciclo claro/escuro de 12/12h. Os experimentos se iniciaram após um período de 03 dias de aclimação, e os animais foram alimentados *ad libitum* com dieta sólida padrão e água durante todo o período do experimento.

Os animais, distribuídos aleatoriamente nos períodos experimentais de 02, 07 e 30 dias (COSTA; HEBLING; SOUZA, 2005), receberam membranas em quatro sítios no tecido subcutâneo da região dorsal. Em dois deles, todos os animais receberam as duas membranas controle de colágeno e de PLGA puro, enquanto nos sítios restantes os

animais receberam dois dos seis tipos de membranas teste, que correspondiam a quatro grupos de lactamas e dois de nanopartículas de prata, obedecendo a uma ordem pré-estabelecida para que houvesse rotatividade das membranas pelas regiões anatômicas, de modo que cada grupo controle totalizou um “n” de 15 animais e cada grupo teste um “n” de 5 animais por período experimental, conforme distribuição abaixo esquematizada:

- Grupo I: Colágeno (n = 15 por período experimental).
- Grupo II: PLGA puro (n = 15 por período experimental).
- Grupo III: PLGA + Lac I (n = 5 por período experimental).
- Grupo IV: PLGA + Lac II (n = 5 por período experimental).
- Grupo V: PLGA + Lac III (n = 5 por período experimental).
- Grupo VI: PLGA + Lac IV (n = 5 por período experimental).
- Grupo VII: PLGA + NP Ag I (n = 5 por período experimental).
- Grupo VIII: PLGA + NP Ag II (n = 5 por período experimental).

As cirurgias foram realizadas no Laboratório de Neurobiologia da Dor e da Inflamação – LANDI - do Programa de Pós-Graduação em Neurociências do Centro de Ciências Biológicas (CCB) e as análises foram realizadas no Laboratório de Citologia Clínica, no Laboratório de Pós Graduação em Odontologia e no Centro de Ensino e Pesquisas em Implantes Dentários (CEPID), do Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC – Florianópolis - SC.

ANTIBIOFILMES TESTADOS

As lactamas utilizadas neste estudo foram sintetizadas pelo grupo do Prof. Luiz Cláudio A. Barbosa, do Departamento de Agroquímica, da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais (Fig. 1) e utilizadas na concentração inibitória mínima (CIM) para a formação do biofilme, proposta por Pimenta et al. (2003).

As NpAg utilizadas neste estudo foram fornecidas pela TNS Nanotecnologia Ltda. (Florianópolis, Brasil) e apresentavam-se como uma dispersão coloidal de prata metálica em meio aquoso, com pH de aproximadamente 4,0, estabilizadas com moléculas orgânicas e apresentando um tamanho médio de partículas de 10nm, variando de 5 à 20 nm.

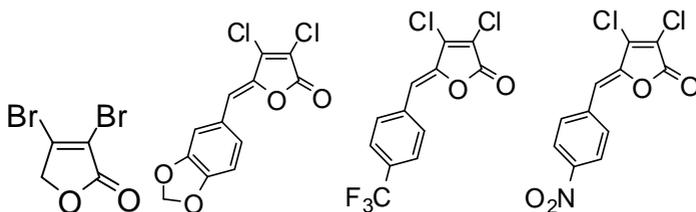


Figura 1: *Lactamas I,II,III e IV, respectivamente.*

OBTENÇÃO E PREPARO DAS MEMBRANAS

As membranas de PLGA, incorporadas ou não com Lactamas e NPAG, foram todas fabricadas no Núcleo de Pesquisa em Materiais Cerâmicos e Compósitos (CERMAT), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), a partir da técnica de evaporação do solvente. Esta técnica consistiu na completa dissolução do copolímero de PLGA (82/18) – PLG 8218 (Purasorb[®], Corbion Purac – Amsterdam, Holanda) em clorofórmio PA-ACS (CHCl₃, LabSynth – Diadema, Brasil) a 10% m/v, sob constante agitação à temperatura ambiente. A solução foi então depositada em placas de vidro circulares e armazenadas em temperatura ambiente até a completa evaporação do solvente. As membranas que continham agentes antibiofilme receberam quantidades pré-estabelecidas (concentração inibitória mínima para a formação do biofilme) das substâncias logo após a completa dissolução do PLGA em clorofórmio, e a solução foi depositadas em placas de vidro circulares, também armazenadas em temperatura ambiente até a evaporação do solvente.

Após o período de 48h para a completa evaporação do solvente, as membranas foram cortadas com perfurador metálico (CiS[®], Sertic – São Paulo, Brasil) de modo a padronizá-las em discos de 6mm de diâmetro, enviados para esterilização com radiação gama (CBE – Unidade de Esterilização Cotia Ltda. – Cotia, Brasil) (Figura 2). As membranas de colágeno (Bio-Gide[®], Geistlich – Wolhusen, Suíça) foram cortadas ainda estéreis, com *punch* cirúrgico de 6mm (ABC Instrumentos cirúrgicos Ltda. – São Paulo, Brasil), previamente esterilizado.

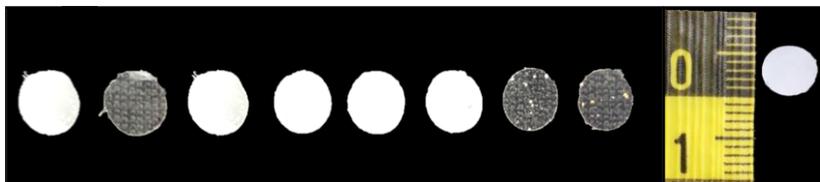


Figura 2: **Confecção das membranas.** Discos de membranas com 6 mm de diâmetro (da esquerda para a direita: Colágeno, PLGA puro, PLGA + Lactama I, PLGA + Lactama II, PLGA + Lactama III, PLGA + Lactama IV, PLGA + NpAg I e PLGA + NpAg II).

PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Após pesagem e anestesia por via intraperitoneal com uma combinação de 90 mg/kg de cloridrato de ketamina 10% (Quetamina[®], Vetecia – São Paulo, Brasil) e 10 mg/kg cloridrato de xilazina 2% (Dopaser[®], Calier S.A. – Barcelona, Espanha), a região dorsal dos animais foi tricotomizada e a antissepsia realizada com algodão embebido em solução de iodopovidine (Povidine[®], Johnson & Johnson - São Paulo, Brasil). As quatro incisões cutâneas (2 cm) foram realizadas a partir de uma guia em acetato, longitudinalmente, com cabo e lâmina de bisturi n^o15 (Swann-Morton[®], Surgical Blades – Inglaterra), de modo a se obter lojas cirúrgicas individuais distantes 2 cm entre si, para evitar a movimentação dos implantes. Todas as membranas, com 6mm de diâmetro, foram inseridas com a ajuda de uma pinça clínica n^o3 em lojas subcutâneas, a uma profundidade de 2 mm, logo após a incisão e divulsão dos tecidos com tesoura de ponta romba. Suturas em Nylon 5-0 (Ethicon[®],

Johnson&Johnson - São Paulo, Brasil) foram realizadas para coaptação dos bordos da ferida (Figura 3).

Os animais foram monitorados até a recuperação da anestesia e realocados em suas gaiolas. Visitas diárias foram realizadas para troca da maravalha, reposição de água e comida e para observação e tratamento de quaisquer intercorrências.

COLETA DAS AMOSTRAS DE TECIDO SUBCUTÂNEO

Para análise da evolução do processo inflamatório, ao final dos períodos de 2, 7 e 30 dias pós-operatórios (COSTA; HEBLING; SOUZA, 2005), os animais foram novamente anestesiados e tricotomizados conforme técnica previamente descrita. Biópsias excisionais cuidadosas da área de implantação das membranas, com suficiente margem de segurança, foram realizadas com uma tesoura a fim de manter o tecido reacional em contato com o material. Todas as amostras foram armazenadas em cassetes individuais e imersas em solução de formol tamponado a 10% para fixação e posterior processamento.

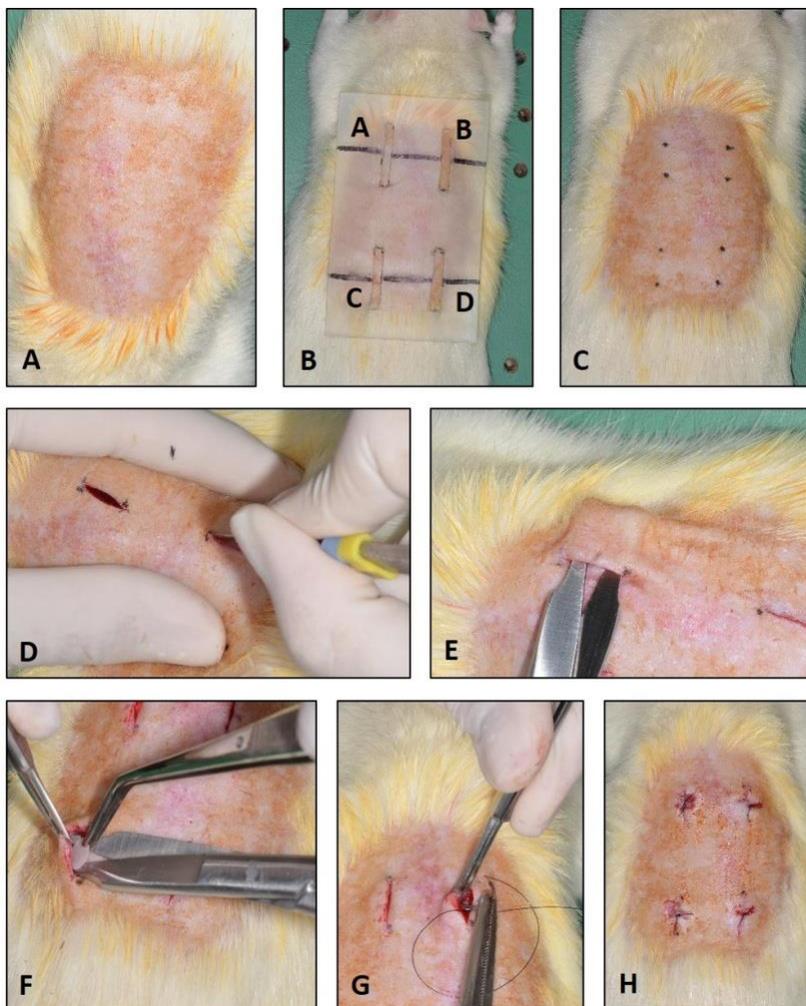


Figura 3: Procedimento Cirúrgico. A) Região dorsal após tricotomia e antissepsia; B) Guia de acetato posicionada; C) Delimitação das lojas cirúrgicas; D) Incisão; E) Divulsão; F) Inserção do disco de membrana (subcutâneo); G e H) Sutura.

COLETA/ANÁLISE DAS AMOSTRAS SÉRICAS

Para a análise sérica da resposta inflamatória à implantação dos antibiofilmes testados, foram coletadas amostras de sangue, via punção intracardíaca, de todos os animais após cada período experimental, que foram armazenadas em tubos para coleta de sangue (BD Vacutainer® - Nova Jersey, Estados Unidos) contendo solução anticoagulante de EDTA, mantidos a -20°C, e enviados em até 24h para um laboratório especializado na análise de amostras animais (Pet Labor Exames Veterinários – Florianópolis, Brasil). No momento do rompimento do diafragma para acesso ao coração e execução da punção intracardíaca, foi provocada a eutanásia dos animais.

Para análise da hemocompatibilidade dos materiais testados, os resultados do hemograma completo de cada animal, e principalmente o leucograma, foram comparados estatisticamente ao de um único animal controle, saudável e que não passou por procedimento cirúrgico.

Parâmetros Séricos Adotados

Hemograma Completo:

RBC (Red Blood Cells): contagem de hemácias;

HGB: dosagem de hemoglobina;

HCT: hematócrito (percentual de hemácias no sangue);

VCM: volume corpuscular médio (tamanho das hemácias);

HCM: hemoglobina corpuscular media (peso de hemoglobina nas hemácias);

CHC: concentração de hemoglobina corpuscular (nas hemácias);
RDW (Red Cell Distribution Width): índice de anisocitose (diferença de tamanho entre as hemácias);
PLT: contagem de plaquetas;
WBC (White Blood Cells): contagem de leucócitos;
SEG: contagem de neutrófilos segmentados (maduros);
LIN: contagem de linfócitos;
EOS: contagem de eosinófilos;
MON: contagem de monócitos.

PROCESSAMENTO E ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS AMOSTRAS DE TECIDO

As peças fixadas em formol a 10% tamponado por 48h foram processadas utilizando-se um processador automático de tecidos – histotécnico (OMA DM-20, OMA Equipamentos para Laboratórios Ltda. – São Paulo - Brasil), no qual foram desidratadas em banhos sequenciais em cadeias crescentes de etanol (70%, 90% e 100%), diafanizadas em xilol I, II e III e impregnadas em parafina a 65°C (I e II). Após o processamento, cada amostra foi seccionada ao meio e ambas as peças foram incluídas em parafina. Dos blocos de parafina contendo as peças foram obtidos cortes seriados de 5 µm de espessura, com o auxílio de um micrótomo, montados em lâminas de vidro previamente limpas e corados com hematoxilina-eosina (HE) para a análise histológica.

Os cortes histológicos foram examinados em microscópio de luz comum, nos aumentos de 50X, 100X e 400X, sendo percorrida toda a

extensão do corte para análise da implantação das membranas. As características histológicas do tecido em contato com o material foram analisadas descritivamente por dois observadores previamente calibrados e, posteriormente, foi realizada uma análise semi-quantitativa segundo os parâmetros de biocompatibilidade. Os examinadores realizaram o teste Kappa para avaliar a confiabilidade das análises e a concordância inter examinadores (Tabela 1). As análises foram feitas de acordo com a norma ABNT NBR ISO 10993-1, que diz respeito à avaliação biológica de produtos para a saúde.

Tabela 1: Índice Kappa Inter examinadores e critérios de classificação dos níveis de concordância do coeficiente Kappa para cada variável estudada.

Variáveis	Coefficiente Kappa (Inter Examinadores)	Nível de Concordância
PI	0,77	Substancial
MI	0,85	Quase Perfeito
TC	1,00	Quase Perfeito
EC	1,00	Quase Perfeito
MAC	0,74	Substancial
CGMN	1,00	Quase Perfeito
NEOV	1,00	Quase Perfeito
NECR	1,00	Quase Perfeito

PI: Processo Inflamatório; MI: Magnitude do infiltrado inflamatório; TC: Tipo da Cápsula; EC: Espessura da Cápsula; MAC: Macrófagos; CGMN: Células Gigantes Multinucleadas; NEOV: Neovascularização; NECR: Necrose.

As análises histológicas descritivas consideraram a presença de processo inflamatório, sua classificação quanto ao tipo predominante de células e magnitude; a presença de cápsula de tecido conjuntivo (área reacional adjacente ao material implantado), sua definição, suas características e sua espessura; a presença ou ausência de células gigantes multinucleadas, macrófagos, necrose e a neoformação de vasos sanguíneos. Para a análise semi-quantitativa, os seguintes parâmetros de biocompatibilidade postos na forma de escores foram adotados (BORTOLUZZI, 2005; BÓRIO, 2014):

Parâmetros Microscópicos Adotados

Quanto ao Tipo de Processo Inflamatório Predominante (PI):

0. Ausente/Inexpressivo.
1. Agudo.
2. Crônico.
3. Misto.

Quanto à Magnitude do Infiltrado Inflamatório (MI):

0. Ausente/Escasso: 0 a 10 células inflamatórias por campo (Figura 4A).
1. Leve: 11 a 25 células inflamatórias por campo (Figura 4B).
2. Moderado: 26 a 50 células inflamatórias por campo (Figura 4C).

3. Intenso: acima de 50 células inflamatórias por campo (Figura 4D).

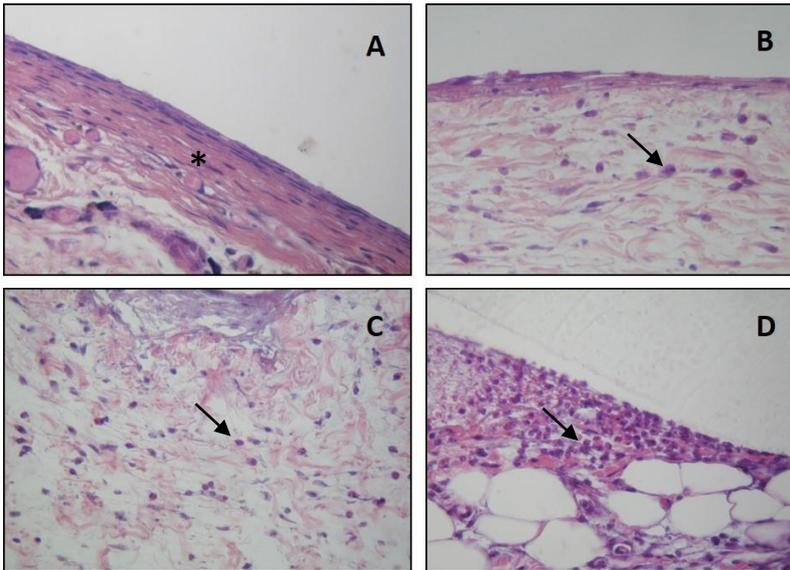


Figura 4: **Parâmetros adotados quanto à magnitude do infiltrado** inflamatório na área de tecido conjuntivo reacional (HE - 40X). A) Escasso; B) Leve; C) Moderado e D) Intenso. **Asterisco (*)**: fibroblastos maduros em cápsula organizada. **Setas**: células inflamatórias.

Quanto ao tipo de Cápsula (TC):

1. Tecido de Granulação: tecido conjuntivo com predomínio de celularidade (células inflamatórias e proliferação fibroblástica) e vascularização.
2. Fibrosa Densa: tecido conjuntivo com predomínio de fibras colágenas bem organizadas e pouca celularidade.
3. Intermediária: tecido conjuntivo com presença de fibras colágenas em estágio inicial de organização e moderada

celularidade, composta principalmente por fibroblastos jovens.

Quanto à espessura da Cápsula (EC):

0. Indefinida.
1. Fina (Figura 5B).
2. Espessa (Figura 5A).
3. Intermediária (Figura 5C).

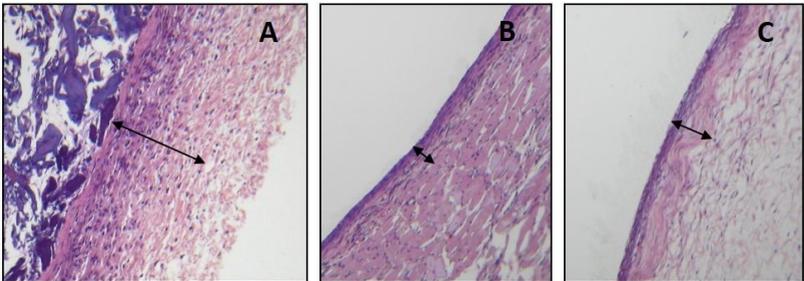


Figura 5: Parâmetros adotados quanto à espessura de cápsula (HE – 10X): A) Espessa; B) Fina; C) Intermediária.

Quanto à presença de Macrófagos (MAC):

0. Ausentes.
1. Presentes.

Quanto à presença de Células Gigantes Multinucleadas (CGMN):

0. Ausentes.
1. Presentes.

Quanto à presença de Neovascularização (NEOV):

- 0. Ausente.
- 1. Presente.

Quanto à presença de Necrose (NECR):

- 0. Ausente.
- 1. Presente.

ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

A análise descritiva dos dados realizada previamente mostrou muita similaridade na resposta inflamatória entre as classes de antibiofilmes testados; os quatro tipos de lactamas e os dois tipos de nanopartículas de prata apresentaram respostas bastante semelhantes entre si em cada período experimental, o que permitiu que para a análise semi-quantitativa das variáveis histológicas, todas as lactamas fossem agrupadas entre si, bem como as nanopartículas entre si, totalizando quatro grandes grupos (Colágeno, PLGA, PLGA+Lactamas e PLGA+NpAg), para aumentar a representatividade da amostra e permitir uma análise estatística adequada.

Os dados foram coletados, digitados na forma de escores em uma planilha Excel® e exportados para o *software* SPSS 20.0®. Foram realizadas as análises descritivas, médias e desvios para as variáveis quantitativas e distribuição de porcentagens para as variáveis qualitativas. Para verificar a associação entre os biomateriais e as demais variáveis

qualitativas estudadas, foi utilizado o teste qui-quadrado de Pearson ou Exato de Fischer, que foram então correlacionadas aos períodos experimentais pelo Teste não-paramétrico de Spearman. Para as variáveis referentes aos parâmetros séricos, foi utilizado o teste ANOVA a fim de verificar se houve diferença estatisticamente significativa entre as variáveis testadas e o controle, e o Teste de Tukey para verificar onde esta diferença ocorreu. Para testar a homogeneidade dos dados, foi utilizado o teste de Levene. Consideraram-se significativos os valores de $\alpha=0,05$, ou seja, nível de significância de no mínimo 5%.

3 RESULTADOS

Colágeno

Após a análise estatística dos dados, observou-se que para o grupo controle de colágeno, ao período experimental de 2 dias (Tabela 2), havia predominância de infiltrado inflamatório crônico de leve a moderado e cápsula conjuntiva de espessura indefinida constituída por tecido de granulação, passando, aos 7 dias (Tabela 3), a um infiltrado inflamatório crônico inexpressivo em 60% das amostras, sendo de discreto a leve no restante delas. A cápsula conjuntiva próxima ao material implantado apresentou uma maior organização das fibras, no entanto, não foi possível definir exatamente sua espessura (o tecido reacional se fundia ao tecido conjuntivo adjacente), sendo que este dado apresentou significância estatística ($p \leq 0,0001$) em relação aos demais grupos testados. Aos 30 dias (Tabela 4), o infiltrado inflamatório crônico foi intenso em 50% dos casos ($p \leq 0,0001$), com presença de cápsula conjuntiva do tipo intermediária (50%) a fibrosa (33%). Macrófagos e CGMN estavam ausentes em quase todas as amostras aos 2 e 7 dias, entretanto, aos 30 dias, estavam presentes em 83 e 67% das amostras, respectivamente, e localizavam-se principalmente na área da membrana implantada, que neste período já se apresentava bastante degradada microscopicamente e não era mais visível clinicamente. Estes dados foram estatisticamente significantes ($p \leq 0,0001$) em relação aos demais grupos testados.

PLGA

O grupo controle de PLGA puro, sem a incorporação de antibiofilmes, apresentou boa evolução da resposta inflamatória. Aos 2 dias, o infiltrado inflamatório se mostrou agudo em 36% das amostras e crônico em 43% delas, sendo de intensidade leve a moderada. A cápsula conjuntiva apresentou constituição intermediária (tecido conjuntivo com fibras colágenas em estágio inicial de organização e moderada presença de células, principalmente fibroblastos jovens) em 64% das amostras – $p < 0,05$ em relação aos demais grupos testados. Aos 7 dias, houve uma evolução do processo inflamatório, apresentando-se predominantemente crônico, de intensidade discreta a leve (50% das amostras). Em quase todas as amostras, houve presença de cápsula conjuntiva de tipo e espessura intermediárias, o que se manteve para o período de 30 dias em todas as amostras, que também apresentaram um infiltrado inflamatório crônico leve. Outro dado que mostrou boa evolução do processo inflamatório foi a presença de macrófagos, que aos 2 dias foi observada em 50% das amostras ($p < 0,05$ em relação aos demais grupos), caindo para 8 e 27% das amostras, aos 7 e 30 dias, respectivamente. A presença de CGMN não foi expressiva para este grupo, e a presença de neovascularização foi observada em quase todas as amostras.

PLGA+Lactamas

O grupo de membranas que recebeu as lactamas como antibiofilme também apresentou boa evolução do processo inflamatório. Aos 2 dias, este se mostrou crônico em 53% das amostras, sendo de intensidade leve a moderada, o que se manteve aos 7 dias, e

predominantemente leve aos 30 dias. A cápsula conjuntiva se apresentou indefinida em 63% das amostras e constituída por tecido de granulação em 79% das amostras aos 2 dias, evoluindo para uma cápsula definida de tipo e espessura intermediárias aos 7 dias e fina em 50% das amostras aos 30 dias ($p \leq 0,0001$). Macrófagos e CGMN estavam ausentes em quase todas as amostras aos 2, 7 e 30 dias e houve presença de neovascularização em praticamente todas as amostras nos três períodos experimentais.

PLGA+NpAg

O grupo que recebeu nanopartículas de prata como agente antibiofilme mostrou excelente evolução do processo inflamatório. Aos 2 dias, o infiltrado inflamatório se mostrou crônico, de intensidade moderada a intensa (55% das amostras), evoluindo para uma intensidade de leve a moderada (50%) aos 7 dias e se tornando inexpressivo em 45% das amostras, com intensidade de discreta a leve, aos 30 dias. Cápsula conjuntiva espessa em 55% das amostras e constituída por tecido de granulação aos 2 dias, se tornando de espessura e tipo intermediários aos 7 dias e apresentando-se fina em 11% das amostras aos 30 dias. Macrófagos e CGMN ausentes em praticamente todas as amostras em todos os períodos e neovascularização presente em 67% das amostras aos 2 dias e em todas as amostras aos 7 e 30 dias.

Não foi verificada presença de necrose em nenhuma das amostras, em nenhum dos períodos experimentais.

A correlação entre as variáveis (Tabela 5) não se mostrou significativa quando o tipo de biomaterial foi confrontado com todas as

outras variáveis. Já quando o tempo foi a variável analisada, houve correlação positiva para o tipo e a espessura da cápsula, células gigantes multinucleadas e neovascularização, ou seja, quanto maior o período experimental, mais a cápsula se aproximava da espessura e do tipo intermediários e mais apresentava CGMN e neovascularização; para a magnitude do infiltrado a correlação foi negativa, ou seja, a intensidade do infiltrado inflamatório diminuiu ao longo do tempo. A variável processo inflamatório teve uma correlação positiva com a magnitude do infiltrado, que por sua vez apresentou correlação positiva com a presença de macrófagos e negativa com o tipo de cápsula – quanto maior a magnitude do infiltrado, maior a ocorrência de tecido de granulação. A espessura da cápsula apresentou correlação positiva com o tipo de cápsula (em geral quando a cápsula se apresentava de espessura intermediária, era também do tipo intermediário, com celularidade marcante em meio às fibras colágenas em organização). Por fim, quando confrontadas as duas variáveis, macrófagos sempre estavam presentes onde houve presença de células gigantes multinucleadas

Para os dados séricos (Tabela 6), nota-se que os índices do eritrograma mostraram diferença estatística apenas para o volume corpuscular médio (VCM), significativamente elevado aos 2 e 7 dias, retornando à normalidade aos 30 dias; denotando aumento reversível no volume das hemácias (hemácias macrocíticas) no período inicial do experimento. O índice RDW, que se refere à diferença de tamanho entre as hemácias, elevou-se ligeiramente aos 2 dias, mas manteve-se significativamente elevado dos 7 até os 30 dias; o que denota irregularidade no tamanho das hemácias e pode indicar uma carência de

ferro devido à hemorragia causada pelo procedimento cirúrgico. Para a concentração de plaquetas, houve um significativo aumento nos 2 primeiros dias, atingindo seu pico aos 7 dias ($p < 0,013$) e reduzindo significativamente aos 30 dias, conforme o esperado no processo de reparo da ferida.

Já para os índices do leucograma (Tabela 6), todos mostraram alteração significativa, compatível com a resposta inflamatória gerada por um procedimento cirúrgico. No entanto, não houve alteração que fosse persistente ou exacerbada ao ponto de ser atribuída a uma toxicidade sistêmica dos antibiofilmes testados. O número de leucócitos totais teve seu pico aos 7 dias ($p < 0,001$), reduzindo novamente aos 30, quando atingiu níveis próximos aos de 2 dias. Para o índice de neutrófilos segmentados, houve significativa e gradativa redução para todos os períodos experimentais. Como esperado, aos 2 dias houve o pico máximo da concentração de eosinófilos ($p < 0,001$), que reduziu dos 7 aos 30 dias sem, no entanto, apresentar uma significância estatística; e os linfócitos, que tiveram significativo aumento aos dois dias, mas gradativamente atingiram sua concentração máxima aos 30 dias. Os níveis de monócitos tiveram aumento gradativo até os 7 dias, e aos 30 dias reduziram significativamente a valores próximos ao do animal controle.

Tabela 2: Frequência e associação das características do processo inflamatório com os grupos estudados para o período experimental de 2 dias.

Período de 2 dias									
	Colágeno		PLGA		PLGA+Lact		PLGA+NpAg		P valor*
	n	%	n	%	n	%	n	%	
PI									0,370
Inexpressivo	0	0,0%	1	100,0%	0	0,0%	0	0,0%	
Agudo	4	30,8%	5	38,5%	4	30,8%	0	0,0%	
Crônico	10	30,3%	6	18,2%	10	30,3%	7	21,2%	
Misto	1	10,0%	2	20,0%	5	50,0%	2	20,0%	
MI									0,363
Discreto	0	0,0%	1	100,0%	0	0,0%	0	0,0%	
Leve	8	38,1%	5	23,8%	7	33,3%	1	4,8%	
Moderado	5	25,0%	5	25,0%	7	35,0%	3	15,0%	
Intenso	2	13,3%	3	20,0%	5	33,3%	5	33,3%	
MAC									0,002
Ausentes	15	31,9%	7	14,9%	16	34,0%	9	19,1%	
Presentes	0	0,0%	7	70,0%	3	30,0%	0	0,0%	
NEOV									0,302
Ausente	1	12,5%	2	25,0%	2	25,0%	3	37,5%	
Presente	14	28,6%	12	24,5%	17	34,7%	6	12,2%	
TC									0,002
Tec. Granul.	14	33,3%	5	11,9%	15	35,7%	8	19,0%	
Intermediário	1	6,7%	9	60,0%	4	26,7%	1	6,7%	
EC									0,004
Indefinida	13	40,6%	3	9,4%	12	37,5%	4	12,5%	
Fina	0	0,0%	1	100,0%	0	0,0%	0	0,0%	
Espessa	2	15,4%	4	30,8%	2	15,4%	5	38,5%	
Intermediária	0	0,0%	6	54,5%	5	45,5%	0	0,0%	

*Teste qui-quadrado de Pearson. Valor de p em negrito indica significância estatística para $\alpha \leq 0,05$. PI: Processo Inflamatório; MI: Magnitude do infiltrado inflamatório; MAC: Macrófagos; NEOV: Neovascularização; TC: Tipo da Cápsula; EC: Espessura da Cápsula.

Tabela 3: Frequência e associação das características do processo inflamatório com os grupos estudados para o período experimental de 7 dias.

	Período de 7 dias								P valor*
	Colágeno		PLGA		PLGA+Lact		PLGA+NpAg		
	n	%	n	%	n	%	n	%	
PI									0,534
Inexpressivo	6	37,5%	4	25,0%	4	25,0%	2	12,5%	
Crônico	9	22,0%	8	19,5%	16	39,0%	8	19,5%	
MI									0,239
Discreto	8	44,4%	4	22,2%	4	22,2%	2	11,1%	
Leve	5	22,7%	6	27,3%	8	36,4%	3	13,6%	
Moderado	2	13,3%	2	13,3%	6	40,0%	5	33,3%	
Intenso	0	0,0%	0	0,0%	2	100,0%	0	0,0%	
MAC									0,269
Ausentes	15	30,0%	11	22,0%	16	32,0%	8	16,0%	
Presentes	0	0,0%	1	14,3%	4	57,1%	2	28,6%	
CGMN									0,961
Ausentes	14	26,4%	11	20,8%	19	35,8%	9	17,0%	
Presentes	1	25,0%	1	25,0%	1	25,0%	1	25,0%	
NEOV									0,280
Ausente	0	0,0%	0	0,0%	2	100,0%	0	0,0%	
Presente	15	27,3%	12	21,8%	18	32,7%	10	18,2%	
TC									0,394
Tec. Granul.	3	60,0%	0	0,0%	2	40,0%	0	0,0%	
Tec. Fibroso	0	0,0%	1	100,0%	0	0,0%	0	0,0%	
Intermediário	12	23,5%	11	21,6%	18	35,3%	10	19,6%	
EC									≤0,0001
Indefinida	12	80,0%	0	0,0%	3	20,0%	0	0,0%	
Fina	0	0,0%	4	36,4%	5	45,5%	2	18,2%	
Intermediária	3	9,7%	8	25,8%	12	38,7%	8	25,8%	

*Teste qui-quadrado de Pearson. Valor de *p* em negrito indica significância estatística para $\alpha \leq 0,05$. PI: Processo Inflamatório; MI: Magnitude do infiltrado inflamatório; MAC: Macrófagos; CGMN: Células Gigantes Multinucleadas; NEOV: Neovascularização; TC: Tipo da Cápsula; EC: Espessura da Cápsula.

Tabela 4: Frequência e associação das características do processo inflamatório com os grupos estudados para o período experimental de 30 dias.

	Período de 30 dias								P valor*
	Colágeno		PLGA		PLGA+Lact		PLGA+NpAg		
	n	%	n	%	n	%	n	%	
PI									0,024
Inexpressivo	0	0,0%	1	12,5%	3	37,5%	4	50,0%	
Crônico	12	25,0%	14	29,2%	17	35,4%	5	10,4%	
MI									≤0,0001
Discreto	1	9,1%	3	27,3%	3	27,3%	4	36,4%	
Leve	4	13,3%	12	40,0%	10	33,3%	4	13,3%	
Moderado	1	11,1%	0	0,0%	7	77,8%	1	11,1%	
Intenso	6	100,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	
MAC									≤0,0001
Ausentes	2	5,3%	11	28,9%	16	42,1%	9	23,7%	
Presentes	10	55,6%	4	22,2%	4	22,2%	0	0,0%	
CGMN									≤0,0001
Ausentes	4	8,9%	15	33,3%	19	42,2%	7	15,6%	
Presentes	8	72,7%	0	0,0%	1	9,1%	2	18,2%	
TC									≤0,0001
Tec. Granul.	2	100,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	
Tec. Fibroso	4	100,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	
Intermediário	6	12,0%	15	30,0%	20	40,0%	9	18,0%	
EC									≤0,0001
Indefinida	0	0,0%	0	0,0%	1	100,0%	0	0,0%	
Fina	3	21,4%	0	0,0%	10	71,4%	1	7,1%	
Espessa	1	100,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	
Intermediária	8	20,0%	15	37,5%	9	22,5%	8	20,0%	

*Teste qui-quadrado de Pearson. Valor de p em negrito indica significância estatística para $\alpha \leq 0,05$. PI: Processo Inflamatório; MI: Magnitude do infiltrado inflamatório; MAC: Macrófagos; CGMN: Células Gigantes Multinucleadas; TC: Tipo da Cápsula; EC: Espessura da Cápsula.

Tabela 5: Teste não-paramétrico de Spearman para verificar a correlação entre as variáveis.

	BIOM	TEMPO	PI	MI	T C	E C	MAC	CGMNs	NEOV
BIOM	r=1,000
TEMPO	r=0,030 p=0,696	r=1,000
PI	r=0,064 p=0,403	r=-0,075 p=0,330	r=1,000
MI	r=0,092 p=0,229	r=-0,306 p<0,001	r=-0,577 p<0,001	r=1,000
T C	r=0,149 p=0,053	r=0,556 p<0,001	r=-0,192 p=0,012	r=-0,369 p<0,001	r=1,000
E C	r=0,195 p=0,011	r=0,460 p<0,001	r=-0,069 p=0,373	r=-0,125 p=0,105	r=0,376 p<0,001	r=1,000	.	.	.
MAC	r=-0,143 p=0,062	r=0,146 p=0,057	r=0,042 p=0,584	r=0,236 p=0,002	r=-0,066 p=0,391	r=0,135 p=0,078	r=1,000	.	.
CGMN	r=-0,145 p=0,059	r=0,282 p<0,001	r=0,066 p=0,393	r=0,137 p=0,075	r=0,032 p=0,681	r=0,129 p=0,094	r=0,303 p<0,001	r=1,000	.
NEOV	r=-0,113 p=0,141	r=-0,244 p<0,001	r=-0,075 p=0,331	r=-0,017 p=0,829	r=0,041 p=0,589	r=-0,005 p=0,949	r=0,065 p=0,396	r=0,078 p=0,313	r=1,000

Valor de p em negrito indica significância estatística para $\alpha \leq 0,05$. BIOM: Biomaterial; PI: Processo Inflamatório; MI: Magnitude do infiltrado inflamatório; TC: Tipo da Cápsula; EC: Espessura da Cápsula; MAC: Macrófagos; CGMN: Células Gigantes Multinucleadas; NEOV: Neovascularização.

Tabela 6: Médias e desvios-padrão dos parâmetros séricos de acordo com os grupos estudados, e o detalhamento estatístico pelo teste Tukey HSD.

	Controle	2 dias	7 dias	30 dias
	$\bar{X} \pm DP$	$\bar{X} \pm DP$	$\bar{X} \pm DP$	$\bar{X} \pm DP$
RBC	9,09± 0,01 ^a	8,02±0,33 ^a	8,19±2,32 ^a	8,31±0,37 ^a
HGB	15,30 ±0,01 ^a	15,09±0,61 ^a	15,59± 4,31 ^a	15,42±0,60 ^a
HCT	42,00± 0,01 ^a	42,33±1,75 ^a	45,20±2,00 ^a	44,13±12,36 ^a
VCM	46,00 ±0,01 ^a	52,80±1,52 ^b	55,27±1,28 ^b	49,60±18,76 ^a
HCM	17,00 ±0,01 ^a	18,67±0,72 ^a	19,07±0,45 ^a	17,33±4,82 ^a
CHC	36,00± 0,01 ^a	35,60±0,50 ^a	34,53±0,64 ^a	32,60±9,03 ^a
RDW	12,00 0,01 ^a	13,20± 0,86 ^{ab}	14,80± 0,41 ^b	14,13 ±3,94 ^b
PLT	767,00±0,01 ^a	1321,33±153,0 ^b	1419,80±126,3 ^b	965,33±279,58 ^c
WBC	2,70±0,01 ^a	3,95±2,16 ^{ab}	8,19±2,98 ^c	5,19±2,35 ^b
Seg	39,00±0,01 ^a	30,40±7,38 ^b	25,47± 3,54 ^c	18,47±5,74 ^d
Lin	58,00±0,01 ^a	65,07±7,17 ^{ab}	69,73±3,99 ^b	71,80±20,01 ^b
Eos	0,00±0,01 ^a	0,93±0,79 ^b	0,87±0,74 ^b	0,67±0,72 ^b
Mon	3,00±0,01 ^{ab}	3,60±0,82 ^{bc}	3,93±0,79 ^c	2,40±0,82 ^a

Médias seguidas por letras minúsculas sobrescritas iguais, nas linhas, não diferem entre si pelo teste Tukey HSD, ao nível de significância de 5%. RBC (Red Blood Cells): Hemácias; HGB: Hemoglobina; HCT: Hematócrito; VCM: Volume corpuscular médio; HCM: Hemoglobina corpuscular media; CHC: Concentração de Hemoglobina Corpuscular; RDW (Red Cell Distribution Width): Índice de anisocitose; PLT: plaquetas; WBC (White Blood Cells): Glóbulos brancos; Seg: neutrófilos segmentados; Lin: Linfócitos; Eos: Eosinófilos; Mon: Monócitos.

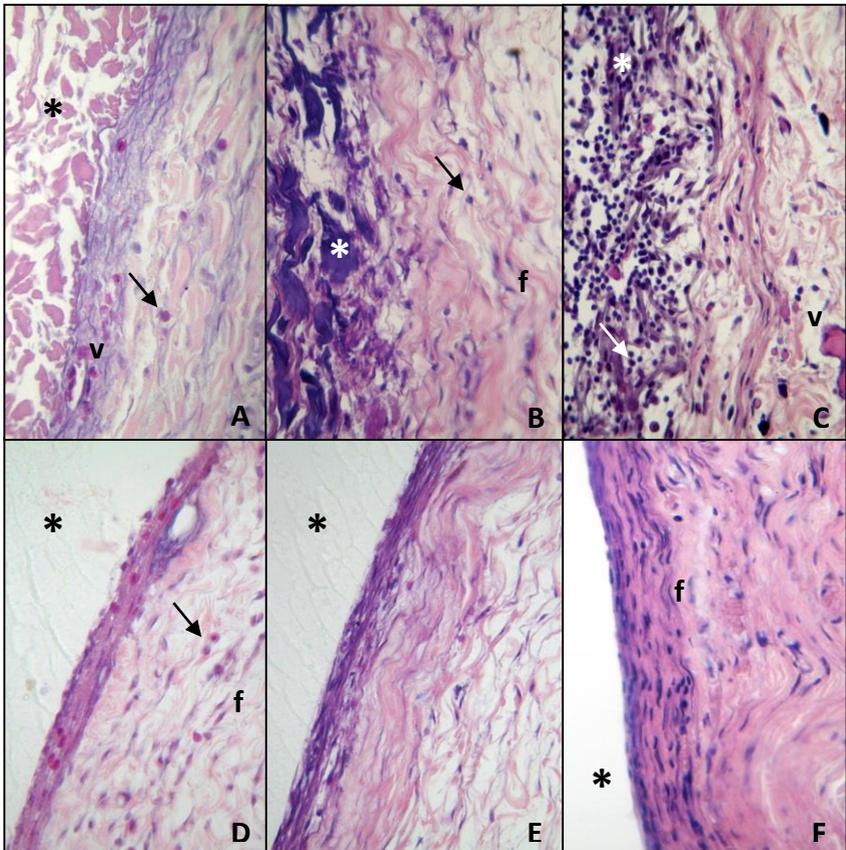


Figura 6: **A) Colágeno 2 dias (HE 400X)** Processo inflamatório misto leve presente no tecido circunjacente à membrana e neoformação de vasos sanguíneos (v). **B) Colágeno 7 dias (HE 400X)** Processo inflamatório crônico escasso e cápsula conjuntiva em organização com presença de fibroblastos jovens (f) em meio às fibras mais organizadas. **C) Colágeno 30 dias (HE 400X)** Processo inflamatório crônico intenso na área de implantação da membrana e leve na cápsula. **D) PLGA 2 dias (HE 400X)** Processo inflamatório misto moderado e cápsula conjuntiva com presença de fibroblastos (f). **E) PLGA 7 dias (HE 400X)** Infiltrado inflamatório inexpressivo e cápsula conjuntiva bem organizada. **F) PLGA 30 dias (HE 400X)** Processo inflamatório crônico escasso e cápsula conjuntiva bem organizada, com presença de fibroblastos (f) jovens e maduros. * Áreas de implantação da membrana. Setas: Células inflamatórias.

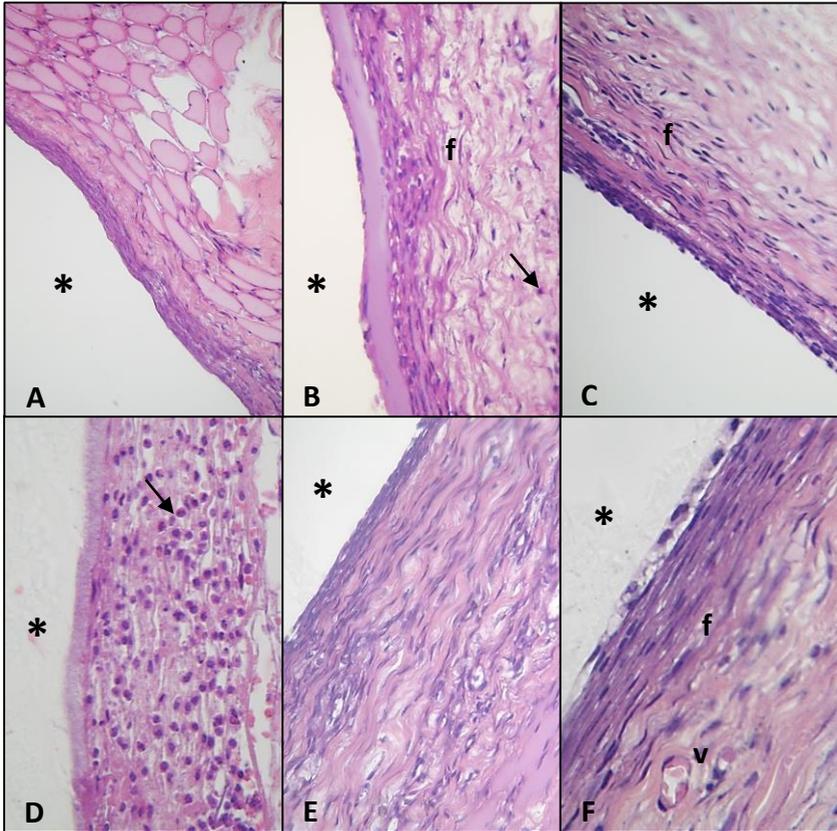


Figura 7: **A) PLGA+Lactamas 2 dias (HE-400X)** Processo inflamatório inexpressivo na área de implantação próxima ao tecido muscular e cápsula conjuntiva de tipo e espessura intermediárias. **B) PLGA+Lactamas 7 dias (HE-400X)** Processo inflamatório crônico leve e cápsula conjuntiva de tipo e espessura intermediárias, com presença de fibroblastos jovens (f) em meio às fibras em organização. **C) PLGA+Lactamas 30 dias (HE-400X)** Processo inflamatório crônico discreto, com cápsula conjuntiva de tipo e espessura intermediárias, com fibroblastos (f) em meio às fibras mais organizadas. **D) PLGA+NpAg 2 dias (HE-400X)** Processo inflamatório misto intenso e cápsula conjuntiva espessa composta por tecido de granulação. **E) PLGA+NpAg 7 dias (HE-400X)** Infiltrado inflamatório inexpressivo e cápsula conjuntiva de tipo e espessura intermediárias. **F) PLGA+NpAg 30 dias (HE-400X)** Processo inflamatório inexpressivo e cápsula conjuntiva de tipo intermediário, com presença de fibroblastos (f) jovens e maduros e neoformação de vasos sanguíneos (v). * Áreas de implantação da membrana. Setas: Células inflamatórias.

4 DISCUSSÃO

Um biomaterial, qualquer dispositivo não-viável introduzido no organismo para exercer uma função determinada e interagir com o mesmo deve ser eficaz e biocompatível (TATAKIS; PROMSUDTHI; WIKESJÖ, 1999). O conceito de biocompatibilidade geralmente é associado a uma interação favorável do material com o hospedeiro, envolvendo uma resposta inflamatória local de baixa a média intensidade e transitória, bem como uma resposta imunogênica amena; as reações teciduais resultantes da degradação/reabsorção do material devem ser mínimas e reversíveis e não devem afetar o processo de regeneração (COOPERMAN; MICHAELI, 1984; GOTLOW, 1993; SCHLEGEL, et al., 1997; WILLIAMS, 2008; WILLIAMS, 2009).

Alguns dos meios para se avaliar a biocompatibilidade são: cultura celular e citotoxicidade, implantação subcutânea, hemocompatibilidade, toxicidade sistêmica, mutagenicidade, sensibilização e avaliação histológica da reação tecidual a curto e longo prazo, segundo as normas técnicas internacionais, tais como a *ISO 10993 – Biological Evaluation of Medical Devices* (TATAKIS; PROMSUDTHI; WIKESJÖ, 1999; PEREIRA, 2008). O modelo animal de pequeno porte há muito é utilizado para estudos de biocompatibilidade, pela facilidade de manuseio e similaridade com a resposta fisiológica humana. Viabiliza a implantação subcutânea do biomaterial, a análise da hemocompatibilidade e a análise histológica da reação tecidual subsequente, de forma que seja possível controlar as variáveis e a dinâmica do processo ao longo dos períodos experimentais.

A fim de avaliar a biocompatibilidade através da reação tecidual local, bem como a hemocompatibilidade dos materiais testados ao longo de 02, 07 e 30 dias, neste estudo foram implantadas membranas incorporadas com antibiofilmes na região subcutânea do dorso de 45 ratos adultos machos. Um outro estudo que analisará a toxicidade sistêmica em fígado e rim já está sendo conduzido pelo mesmo grupo de pesquisa.

Segundo Abou Neel et al. (2013), os biomateriais de origem natural/biológica seriam mais biocompatíveis que os de origem sintética, pelo fato de serem derivados principalmente do colágeno, proteína mais abundante no organismo; ao passo que os materiais sintéticos podem apresentar resíduos de fabricação ou a liberação de produtos durante o processo de degradação que afetariam sua biocompatibilidade. Para comprovar esta teoria é que optou-se pela utilização de membranas de colágeno e de PLGA puro como materiais de controle, que foram implantados em todos os animais testados, sem exceção.

O colágeno foi o primeiro material de escolha como controle, devido ao seu *status* de “padrão ouro”, pela facilidade de obtenção, manipulação e biocompatibilidade, foi extensamente estudado e tem um perfil de resposta tecidual já bastante conhecido em modelos animais e humanos (COOPERMAN; MICHAELI, 1984; LUNDGREN et al., 1994; SCHLEGEL et al., 1997; TATAKIS et al., 1999; BUNYARATAVEJ, WANG, 2001; DONOS, KOSTOPOULOS & KARRING, 2002; ABOU NEEL et al., 2012). É a proteína estrutural mais abundante no tecido conjuntivo e representa um terço do total de proteínas do corpo (HUTMACHER; HÜRZELER; SCHLIEPHAKE, 1996).

Apesar disto, no presente estudo, o grupo controle de colágeno apresentou a pior evolução do processo inflamatório dentro do período estudado. Aos 7 dias predominava um infiltrado inflamatório inexpressivo, mas aos 30 dias, metade das amostras apresentavam infiltrado inflamatório intenso, com presença expressiva de macrófagos e CGMN na área de implantação da membrana, enquanto a cápsula conjuntiva se apresentou de tipo intermediária a fibrosa e de espessura intermediária. Silveira, em 2012, avaliou em camundongos o padrão de resposta tecidual e imunogenicidade da membrana de colágeno de cortical bovina (Gen Derm[®] - Baumer, Mogi Mirim, Brasil) e obteve evolução semelhante à do presente estudo. Observou, aos 6 dias, esparsos sinais de reabsorção da membrana, com formação de cápsula fibrosa e aos 12 e 15 dias, maior estágio de invasão e degradação, e significativamente maior número de células gigantes multinucleadas. Ao contrário dos achados de Koslovski et al., em 2009, que testaram a biodegradação da Bio-Gide[®] na calota craniana de ratos e notaram infiltrado crônico escasso na porção abaixo da membrana e próxima ao osso, mas não observaram sinais de inflamação nem reação de corpo estranho na porção interna da membrana, que apresentava neovascularização e invasão por fibroblastos aos 30 dias.

Microscopicamente, no presente estudo, era possível localizar, aos 30 dias, a área da membrana em todas as amostras consideradas passíveis de análise, com nítidos sinais de degradação avançada e um intenso processo de reabsorção destas membranas. No entanto, no momento da coleta das amostras não era mais possível observá-las clinicamente (macroscopicamente) no local da sua implantação, o que leva a crer que todo esse intenso processo inflamatório se encaminharia

para o reparo e regeneração completa dos tecidos se um período experimental mais longo fosse adotado. Membranas de colágeno já demonstraram sofrer reabsorção pelas vias de degradação enzimática (colagenases/ proteases), de enzimas derivadas de macrófagos e/ou leucócitos polimorfonucleares e proteases bacterianas (HUTMACHER; HÜRZELER; SCHLIEPHAKE, 1996; TATAKIS; PROMSUDTHI; WIKESJO, 1999; ROTHAMEL et al., 2004). Koslovski et al. obtiveram uma taxa de 60% de reabsorção do material ao final do primeiro mês de estudo. Esta rápida degradação das membranas de colágeno pode comprometer sua utilização clínica e a quantidade de tecido neoformado em um procedimento regenerativo (ABOU NEEL et al., 2013).

Como não foram encontrados registros na literatura de avaliação da resposta inflamatória *in vivo* aos agentes antibiofilmes utilizados neste estudo, optou-se por comparar seus resultados aos materiais adotados como controles. A evolução da resposta biológica das amostras de PLGA foi muito diferente das amostras de colágeno, então serão confrontados diretamente os dados de todas as amostras de PLGA, com e sem a incorporação de antibiofilmes.

Aos 2 dias, nas amostras controle de PLGA sem a incorporação de agentes antibiofilme ainda se observava uma maior presença de infiltrado inflamatório agudo, embora não significativa, e significativamente mais macrófagos, diferentemente das amostras de PLGA contendo antibiofilmes onde o infiltrado inflamatório era predominantemente crônico (quase a totalidade das amostras de NpAg) e os macrófagos, ausentes. A cápsula conjuntiva era composta por tecido de granulação na maior parte das amostras de PLGA contendo

antibiofilmes, enquanto nas amostras de PLGA ela se apresentava constituída por tecido intermediário. Percebe-se um padrão distinto na resposta inflamatória quando comparadas as amostras com a incorporação de antibiofilmes às amostras sem a incorporação dos mesmos.

Aos 30 dias, o infiltrado inflamatório nas amostras de PLGA sem a incorporação de biofilmes evoluiu para crônico leve e havia presença de macrófagos em um quarto das amostras; nas amostras contendo lactamas ainda foi observado um infiltrado inflamatório crônico moderado, enquanto nas amostras de NpAg ele já era inexpressivo em quase metade das amostras, predominantemente de discreto a leve. A cápsula conjuntiva era de tipo intermediário em todas as amostras, contendo ou não antibiofilmes, e predominantemente de espessura intermediária, se apresentando fina em metade das amostras contendo lactamas. É sabido que uma redução gradual na espessura da cápsula e sua conformação em tecido conjuntivo fibroso denotam boa tolerância pelo organismo (YALTIRIK et al., 2004), o que mostra uma evolução extremamente positiva da resposta inflamatória dos grupos testados em relação aos grupos adotados como controle ao longo dos períodos experimentais. Houve uma correlação negativa entre tempo e o infiltrado inflamatório nas amostras testadas, uma diminuição da resposta inflamatória ao longo do tempo que denota a biocompatibilidade de todas as amostras testadas.

Lundgren et al., em 1995, testaram uma matriz de PLA modificado e o compararam a uma membrana de poliglactina 910 (PLGA) em defeitos periodontais de macacos. Para a poliglactina, nas porções das membranas integradas aos tecidos, não havia infiltrado

inflamatório. Todas as membranas mostraram graus variados de fragmentação e algumas já apresentavam sinais iniciais de reabsorção às 6 semanas. Em estudo com metodologia semelhante à nossa, com a implantação de tela de poliglactina 910 em subcutâneo de camundongos, Andretto e cols. observaram uma resposta bastante distinta, com presença de células gigantes e grande quantidade de mastócitos no 30º dia. Relataram haver cronificação da reação de corpo estranho e absorção do material implantado entre o 14º e 30º dias.

Os polímeros derivados dos ácidos polilático e poliglicólico são aplicados como biomaterial desde 1930 e já foram extensamente estudados na sua forma isolada ou como copolímero (PLGA), sendo que não há uma relação linear entre a proporção de ácido lático e glicólico e as propriedades físicas/mecânicas de seus copolímeros (HUTMACHER; HÜRZELER; SCHLIEPHAKE, 1996). Ignatius e Claes, em 1996, testaram *in vitro* a biocompatibilidade do PLGA (90:10) e do PLDLA. Ambos não demonstraram sinais de citotoxicidade, sugerindo biocompatibilidade satisfatória. Entretanto, a queda no pH decorrente de sua degradação em produtos ácidos seria responsável por um aumento da citotoxicidade (TAYLOR et al., 1994). Estas peculiaridades do polímero utilizado neste estudo podem justificar as diferenças na resposta biológica entre as membranas incorporadas ou não com agentes antibiofilmes, bem como a observação de uma área mais corada por hematoxilina na extremidade da cápsula conjuntiva em contato com a área de implantação da membrana em todas as amostras de PLGA. Esta coloração é acidofílica, e pode evidenciar a queda do pH decorrente da degradação do polímero.

As membranas derivadas dos ácidos polilático e poliglicólico, sofrem uma degradação hidrofílica lenta. Neste estudo, no momento da coleta das amostras e após o processamento histológico, todas as membranas de PLGA - com ou sem a incorporação de antibiofilmes - se mostraram quase íntegras, com alguma alteração em sua estrutura que as tornaram mais opacas e mais friáveis; porém, à análise histológica, as amostras estavam fragmentadas em todos os tempos experimentais, provavelmente por estarem expostas ao xilol (solvente orgânico) durante a sua coloração, já que as amostras foram seccionadas somente após o processamento histológico e antes da inclusão em parafina. Hämmerle, em 2003, observou que membranas de PLA não mostravam sinais evidentes de degradação após 4 meses de implantação. Clinicamente, se espera que uma membrana reabsorvível não ultrapasse o tempo de 6 meses a 1 ano para degradação, para que esta não perca suas vantagens em relação à membrana não-reabsorvível e não atrapalhe a conduta clínica subsequente.

Destaque especial deve-se dar para a conformação tridimensional de muitas das amostras de lactamas (sem especificidade quanto ao tipo nem ao período experimental), que após a implantação se enrolavam, ora parcialmente, ora completamente, sobre seu próprio eixo. Isto pode ser devido à temperatura do meio; a características próprias das lactamas (como a possível hidrofobicidade), ou do solvente (DMSO) utilizado para a diluição deste antibiofilme (originalmente em forma de pó). Para sua aplicação clínica, esta particularidade requer a utilização da membrana juntamente com algum dispositivo de fixação da mesma, já que um dos

principais requisitos de uma membrana para uso em procedimentos regenerativos é sua estabilidade dimensional em longo prazo.

O hemograma apresentou resultados compatíveis com uma resposta inflamatória gerada por um procedimento cirúrgico quando comparado ao animal controle, sem caracterizar resposta exacerbada nem persistência sistêmica do quadro inflamatório ao longo dos períodos experimentais, o que denota a hemocompatibilidade de todos os materiais utilizados. De modo geral, dentre as amostras de PLGA - incorporadas ou não com antibiofilmes - todas mostraram boa evolução do processo inflamatório quando comparadas ao controle de colágeno, a formação de uma cápsula conjuntiva bem organizada com a peculiaridade de ser também bastante celularizada, composta principalmente de fibras colágenas, grande número de fibroblastos jovens e pouco ou inexpressivo infiltrado inflamatório ao final dos períodos experimentais. Sendo assim, espera-se que os tecidos circunjacentes se mantenham inalterados durante todo o período de cicatrização até o término do processo de degradação das membranas e completa regeneração dos tecidos. Dentre os agentes antibiofilmes testados, ambos apresentaram igualmente uma excelente evolução do processo inflamatório e uma resposta biológica favorável à sua aplicação clínica. Estudos adicionais no sentido de caracterizar melhor suas propriedades e interações químicas; bem como estudos a longo prazo para avaliar sua degradação, quantificar as células inflamatórias e presença ou ausência de quimiocinas e anticorpos específicos são necessários para esclarecer a cinética de interação com o hospedeiro e estabelecer um protocolo definitivo de aplicação clínica dos materiais testados.

5 CONCLUSÃO

Como conclusão deste estudo, pode-se dizer que as amostras de PLGA+Lactamas e PLGA+NpAg mostraram excelente evolução do processo inflamatório, uma resposta inflamatória amena e formação de cápsula conjuntiva mais organizada e fibrosa ao longo dos períodos experimentais testados, características de biocompatibilidade; bem como uma resposta sistêmica compatível com o procedimento cirúrgico e característica de hemocompatibilidade dos materiais utilizados.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU NEEL, E. A.; BOZEC, L.; KNOWLES, J. C.; SYED, O.; MUDERA, V.; DAY, R.; HYUN, J. K. Collagen--emerging collagen based therapies hit the patient. **Adv Drug Deliv Rev.**, v. 65, n. 4, p. 429-56, Apr. 2013.

ANDRETTO, R.; FRANÇA, L. C. M; TORRICO, H. E.; CAMACHO, R. G. Reação tecidual associada ao implante de tela de poliglactina 910 em camundongos: Estudo histopatológico com parâmetros imunohistoquímicos. **Rev Bras Videocirurg.**, v. 5, n. 3, p. 128-33, Jul/Set. 2007.

ARAÚJO, M. G.; LINDHE, J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. **J Clin Periodontol.**, v. 32, n. 2, p. 212–8, Feb. 2005.

ATHANASIOU, K. A.; NIEDERAUER, G. G.; AGRAWAL, C. M. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials*, v. 17, n. 2, p. 93-102, Jan. 1996.

BORTOLUZZI, Eduardo Antunes. **Avaliação da reação do tecido subcutâneo de ratos à implantação dos cimentos MTA e Portland brancos acrescidos de radiopacificadores.** 2005. 175f. Dissertação (Mestrado em Odontologia – área de concentração Endodontia), Faculdade de Odontologia de Bauru, São Paulo, 2005.

BÓRIO, C. C. et al. Subcutaneous connective tissue reactions to iRoot SP, mineral trioxide aggregate (MTA) Fillapex, DiaRoot BioAggregate and MTA. **Int Endod J.**, v. 47, n. 7, p. 667–74, Jul. 2014.

BUNYARATAVEJ, P.; WANG, H. L. Collagen membranes: a review. **J Periodontol.**, v. 72, n. 2, p. 215-29, Feb. 2001.

BUSER, D. et al. Lateral ridge augmentation using autografts and barrier membranes: a clinical study with 40 partially edentulous patients. **J Oral Maxillofac Surg.**, v. 54, n. 4, p. 420-32, Apr. 1996.

BUSER, D. et al. Localized ridge augmentation with autografts and barriers membranes. **Periodontol 2000**, v. 19, p. 151-63, Feb. 1999.

CARNIOL, K.; GILMORE, M. S. Signal transduction, quorum-sensing and extracellular protease activity in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. **J Bacteriol.**, v. 186, n. 24, p. 8161-3, Dec. 2004.

CHA, C. et al. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. **Mol Plant Microbe Interact.**, v. 11, n. 11, p. 1119-29, Nov. 1998.

CHEN, G. et al. Effects of surface functionalization of PLGA membranes for guided bone regeneration on proliferation and behavior of osteoblasts. **J Biomed Mater Res A.**, v. 101, n. 1, p. 44-53, Jan. 2013.

CHIAPASCO, M.; CASENTINI, P.; ZANIBONI, M. Bone augmentation procedures in implant dentistry. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 24, p.237-259, 2009.

CHOPRA, I. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern? **J Antimicrob Chemother.**, v. 59, n. 4, p. 587-90, Apr. 2007.

COOPERMAN, L.; MICHAELI, D. The immunogenicity of injectable collagen. I. A 1-year prospective study. **J Am Acad Dermatol.**, v. 10, n. 4, p.638-46. Apr. 1984.

COSTA, C. A. S.; HEBLING, J.; SOUZA, P. P. C. Testes de Biocompatibilidade dos Materiais Odontológicos. In: ESTRELA, C. Metodologia Científica: Ciência, Ensino, Pesquisa. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2005. Cap. 12. p. 231-271.

COSTERTON, J. W. et al. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annu Rev Microbiol.**, v. 41, p. 435-464, 1987.

DAHLIN, C. et al. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. **Plast Reconstr Surg.**, v. 81, n. 5, p. 672-6, May 1988.

DAHLIN, C. *et al.* Healing of maxillary and mandibular bone defects using a membrane technique. An experimental study in monkeys. **Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.**, v. 24, n. 1, p. 13-9, 1990.

DAMIEN, C.J.; PARSONS, J.R. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. **J Appl Biomater.**, v. 2, n. 3, p.187-208, 1991.

DANHIER, F. et al. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. **J Control Release**, v. 161, n. 2, p. 505-22, Jul. 2012.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nat Rev Drug Discov.**, v. 2, n. 2, p. 114-22, Feb. 2003.

DONOS, N.; KOSTOPOULOS, L. & KARRING, T. Alveolar ridge augmentation using a resorbable copolymer membrane and autogenous bone grafts. An experimental study in the rat. **Clinical Oral Implants Research**, v. 13, p. 203–213, 2002.

DUEK, E. A. R.; ZAVAGLIA, C. A. C, BELANGERO, W. D. In vitro study of poly(lactic acid) pin degradation. **Polymer**, n.40, p. 6465–73, 1999.

FERREIRA, A. M. et al. Collagen for bone tissue regeneration. **Acta Biomater.**, v. 8, n. 9, p. 3191-200, Sep. 2012.

FORTUNATI, E. et al. PLGA/Ag nanocomposites: in vitro degradation study and silver ion release. **J Mater Sci Mater Med.**, v. 22, n. 12, p. 2735-44, Dec. 2011.

GÓMEZ, G. et al. Effect of FGF and polylactide scaffolds on calvarial bone healing with growth factor on biodegradable polymer scaffolds. **J Craniofac Surg.**, v. 17, n. 5, p. 935-42, Sep. 2006.

GOSHEGER, G. et al. Silver-coated megaendoprostheses in a rabbit model - an analysis of the infection rate and toxicological side effects. **Biomaterials**, v. 25, n. 24, p. 5547-56, Nov. 2004.

GOTTLOW J. Guided tissue regeneration using bioresorbable and non-resorbable devices: Initial healing and long-term results. **J Periodontol**, v. 64, p. 1157–1165, 1993.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nat Rev Microbiol.**, v. 2, n. 2, p. 95-108, Feb. 2004.

HÄMMERLE, C. H.; JUNG, R. E. Bone augmentation by means of barrier membranes. **Periodontol 2000**, v. 33, p. 36-53, 2003.

HÄMMERLE, C. H.; KARRING, T. Guided bone regeneration at oral implant sites. **Periodontol 2000**, v.17, p.151-75, 1998.

HE, Z. et al. Use of the quorum sensing inhibitor furanone C-30 to interfere with biofilm formation by *Streptococcus mutans* and its luxS mutant strain. **Int J Antimicrob Agents**, v. 40, n. 1, p. 30-5, Jul. 2012.

HENTZER, M. et al. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. **Microbiology**, v. 148 (Pt 1), p. 87-102, Jan. 2002.

HENTZER, M. et al. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. **EMBO J.**, v. 22, n. 15, p. 3803-15, Aug. 2003.

HÜRZELER, M. B. et al. Evaluation of a new bioresorbable barrier to facilitate guided bone regeneration around exposed implant threads. An experimental study in the monkey. **Int J Oral Maxillofac Surg.**, v. 27, n. 4, p. 315-20, Aug. 1998.

HUTMACHER, D.; HÜRZELER, M. B.; SCHLIEPHAKE, H. A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for GTR and GBR applications. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 11, n. 5, p. 667-78, Sep-Oct. 1996.

IGNATIUS, A. A.; CLAES, L. E. In vitro biocompatibility of bioresorbable polymers: poly(L, DL-lactide) and poly(L-lactide-co-glycolide). **Biomaterials**, v. 17, n. 8, p. 831-9, Apr. 1996.

KOZLOVSKY, A.; ABOODI, G.; MOSES, O.; TAL, H.; ARTZI, Z.; WEINREB, M.; NEMCOVSKY, C.E. Bio-degradation of a resorbable collagen membrane (Bio-Gide) applied in a double-layer technique in rats. **Clin Oral Implants Res**, v. 20, n. 10, p. 1116-23, Oct. 2009.

LEE, J. -Y. et al. Effect of metal nanoparticles on thermal stabilization of polymer/metal nanocomposites prepared by a one-step dry process. **Polymer**, v. 47, p. 7970-9, 2006.

LISTGARTEN, M. A. Dental plaque: its structure and prevention. **ASDC J Dent Child.**, v. 39, n. 5, p. 347-52, Sep./Oct. 1972.

LISTGARTEN, M. A. Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. A light and electron microscopic study. **J Periodontol.**, v. 47, n. 1, p. 1-18, Jan. 1976.

LISTGARTEN, M. A.; MAYO, H. E.; TREMBLAY, R. Development of dental plaque on epoxy resin crowns in man. A light and electron microscopic study. **J Periodontol.**, v. 46, n. 1, p. 10-26, Jan. 1975.

LUNDGREN, D.; SENNERBY, L.; FALK, H.; FRIBERG, B. & NYMAN, S. The use of a new bioresorbable barrier for guided bone regeneration in connection with implant installation. **Clinical Oral Implants Research**, v. 5, p. 177–184, 1994.

LUNDGREN, D. et al. The Influence of the Design of Two Different Bioresorbable Barriers on the Results of Guided Tissue Regeneration Therapy. An Intra-Individual Comparative Study in the Monkey. **J Periodontol.**, v. 66, n. 7, p. 605-12, 1995.

MANEFIELD, M. et al. Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. **Microbiology**, v. 148 (Pt 4), p. 1119-27, Apr. 2002.

MARTINEZ-GUTIERREZ, F. et al. Synthesis, characterization, and evaluation of antimicrobial and cytotoxic effect of silver and titanium nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 6, n. 5, p. 681-8, Oct. 2010.

MCALLISTER, B. S.; HAGHIGHAT, K. Bone augmentation techniques. **J Periodontol.**, v. 78, n. 3, p. 377–396, Mar. 2007.

MOMBELLI, A. Microbiology and antimicrobial therapy of peri-implantitis. **Periodontol 2000**, v. 28, p. 177-89, 2002.

MUSK, D. J. Jr.; HERGENROTHER, P. J. Chemical countermeasures for the control of bacterial biofilms: effective compounds and promising targets. **Curr Med Chem.**, v. 13, n. 18, p. 2163-77, 2006.

OWEN, G. R. et al. An in vitro study of plasticized poly (lactic-co-glycolic acid) films as possible guided tissue regeneration membranes: Material properties and drug release kinetics. **J Biomed Mater Res A.**, v. 95, n. 3, p. 857-69, Dec. 2010.

PARK, H.-J. et al. Biofilm-inactivating activity of silver nanoparticles: A comparison with silver ions. **J Ind Eng Chem.**, v. 19, n. 2, p. 614-9, Mar. 2013.

PARK, M. V. et al. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, n. 36, p. 9810-7, Dec. 2011.

PEREIRA, KARLA REGINA. **Avaliação da biocompatibilidade “in vitro” e “in vivo” de ligas metálicas de titânio para aplicação odontológica.** 2008. 81f. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais) – Escola de Engenharia de São Carlos/Instituto de Física de São Carlos/Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2008.

PEREIRA, U. A. et al. γ -Alkylidene- γ -lactones and isobutylpyrrol-2(5H)-ones analogues to rubrolides as inhibitors of biofilm formation by gram-

positive and gram-negative bacteria. **Bioorg Med Chem Lett.**, v. 24, n. 4, p. 1052-6, Feb. 2014.

PEREIRA-NETO, ARMANDO RODRIGUES LOPES. **Lactamas e Nanopartículas de prata como potenciais agentes antibiofilme e antimicrobianos: estudo in vitro**. 2013. 75f. Tese (Doutorado em Odontologia – Área de concentração Implantodontia) – Curso de Pós Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

PIMENTA, A. L. et al. Synthetic organic compounds with potential for bacterial biofilm inhibition, a path for the identification of compounds interfering with quorum sensing. **Int J Antimicrob Agents.**, v. 42, p. 519–523, 2013.

REN, D.; SIMS, J. J.; WOOD, T. K. Inhibition of biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. **Environ Microbiol.**, v. 3, n. 11, p. 731-6, Nov. 2001.

REN, D.; SIMS, J. J.; WOOD, T. K. Inhibition of biofilm formation and swarming of *Bacillus subtilis* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. **Lett Appl Microbiol.**, v. 34, n. 4, p. 293-9, 2002.

RETZEPI, M.; DONOS, N.; Guided Bone Regeneration: biological principle and therapeutic applications. **Clin Oral Implants Res.**, v. 21, n. 6, p. 567-76, Jun. 2010.

RICHARDS, J. J.; MELANDER, C. Controlling bacterial biofilms. **Chembiochem**, v. 10, n. 14, p. 2287-94, Sep. 2009.

ROTHAMEL, D. et al. Biocompatibility of various collagen membranes in cultures of human PDL fibroblasts and human osteoblast-like cells. **Clin Oral Implants Res.**, v. 15, n. 4, p. 443-9, Aug. 2004.

SALONEN, J. I.; PERSSON, G. R. Migration of epithelial cells on materials used in guided tissue regeneration. **J Periodontal Res.**, v. 25, n. 4, p. 215-21, Jul. 1990.

SAMUEL, U.; GUGGENBICHLER, J. P. Prevention of catheter-related infections: the potential of a new nano-silver impregnated catheter. **Int J Antimicrob Agents**, v. 23, Suppl 1, p. S75-8, Mar. 2004.

SCHLEGEL, A. K. et al. Preclinical and clinical studies of a collagen membrane (Bio-Gide). **Biomaterials**, v. 18, n. 7, p. 535-8, Apr. 1997.

SECINTI, K. D. et al. Nanoparticle silver ion coatings inhibit biofilm formation on titanium implants. **J Clin Neurosci.**, v. 18, n. 3, p. 391-5, Mar. 2011.

SELA, M. N. et al. Degradation of collagen-guided tissue regeneration membranes by proteolytic enzymes of *Porphyromonas gingivalis* and its inhibition by antibacterial agents. **Clin Oral Implants Res.**, n. 20, v. 5, p. 496-502, May 2009.

SILVEIRA, ELCIA MARIA VARIZE. **Mecanismos envolvidos na resposta imune e inflamatória frente à implantação de membrana de**

cortical óssea bovina no tecido subcutâneo de camundongos: caracterização histomorfométrica, imunoenzimática e molecular. 2012. 138p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo. 2012

STEVENS, K.N. et al. The relationship between the antimicrobial effect of catheter coatings containing silver nanoparticles and the coagulation of contacting blood. **Biomaterials**, v. 30, n. 22, p. 3682-90, Aug. 2009.

TATAKIS, D. N., PROMSUDTHI, A., WIKESJÖ, U. M. Devices for periodontal regeneration. **Periodontol 2000**, v. 19, p. 59-73, 1999.

TAYLOR, M.S.; DANIELS, A.U.; ANDRIANO, K.P.; HELLER J. Six bioabsorbable polymers: In vitro acute toxicity of accumulated degradation products. **J Appl Biomater**, v. 5, p. 151-157, 1994.

ULKÜR, E. et al. Comparison of silver-coated dressing (Acticoat™), chlorhexidine acetate 0.5% (Bactigrass®), and fusidic acid 2% (Fucidin®) for topical antibacterial effect in methicillin-resistant Staphylococci-contaminated, full-skin thickness rat burn wounds. **Burns.**, v. 31, n. 7, p. 874-7, Jul. 2005.

VAN DER WEIJDEN, F.; DELL'ACQUA, F.; SLOT, D. E. Alveolar bone dimensional changes of post-extraction sockets in humans: a systematic review. **J Clin Periodontol.**, v. 36, n. 12, p. 1048–58, Dec. 2009.

VIGNESHWARAN, N. et al. Functional finishing of cotton fabrics using silver nanoparticles. **J Nanosci Nanotechnol.**, v. 7, n. 6, p. 1893-7, Jun. 2007.

WILLIAMS, D.F. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**, v. 29, n. 20, p. 2941-53, Jul. 2008.

WILLIAMS, D.F. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, v. 30, n. 30, p. 5897-909, Oct. 2009.

YALTIRIK, M. Reactions of connective tissue to Mineral Trioxide Aggregate and Amalgam. **J Endod.**, v. 30, n. 2, p. 95-99, Feb. 2004.

YU F, ZHUO R. Synthesis, characterization, and degradation behaviors of end-group-functionalized poly(trimethylene carbonate)s. **Polym J**; v. 3, n. 8, p. 671–6, 2003.

7 ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA - UFSC).

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo

PP00920

Título

AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DAS MEMBRANAS ABSORVÍVEIS DE PLGA+LACTAMAS E PLGA+ NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS - ESTUDO IN VIVO

Data de Entrada

20/03/2014

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

15/08/2014

Considerações

Ofício nº 166/CEUA/PROPESQ/2014

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Ricardo de Souza Magini, Departamento de Odontologia - CCS

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por doze meses, para a utilização de quarenta e cinco *Rattus norvegicus albinus*.

- Procedência do animal: Biotério Central.

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 15/11/2015

Data 15/08/2014

Parecer(es):



**Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE**