

Trabalho de Conclusão de Curso

AVALIAÇÃO DA BIOCAMPATIBILIDADE DE MEMBRANAS ABSORVÍVEIS DE PLGA + LACTAMAS E PLGA + NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS

Emiliana Antunes Menegazzo



Universidade Federal de Santa Catarina

Curso de Graduação em Odontologia

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA**

Emiliana Antunes Menegazzo

**AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DE MEMBRANAS ABSORVÍVEIS
DE PLGA + LACTAMAS E PLGA + NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM
TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS**

Trabalho apresentado à Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a conclusão do Curso de Graduação em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
Coorientador: Prof. Dr. Cesar Augusto Magalhães Benfatti

Florianópolis

2015

Emiliana Antunes Menegazzo

**AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DAS MEMBRANAS ABSORVÍVEIS
DE PLGA + LACTAMAS E PLGA + NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM
TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Cirurgião-Dentista e aprovado em sua forma final pelo Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 19 de Outubro de 2015.

Banca Examinadora:

Prof., Dr. Ricardo de Souza Magini
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Águedo Aragonés

Prof.^a, Dr.^a. Andréa de Lima Pimenta
Université de Cergy-Pontoise
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho aos meus pais, **Vilson** e **Vera**, por todo o esforço, dedicação e amor; pela preocupação com a minha educação e formação como profissional e ser humano.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela bênção da vida, por guiar meus passos e iluminar meus caminhos. Agradeço pelos bons momentos que me fizeram celebrar a vida, e pelos obstáculos, que a todo o momento me fazem evoluir.

À minha amada mãe, **Vera**, minha melhor amiga, meu maior exemplo de determinação, meu porto seguro! Muito obrigada pela paciência, cuidado, amor, proteção e por todo o apoio perante minhas escolhas e nas dificuldades, me dando forças para continuar!

Ao meu amado pai, **Vilson**, pelo exemplo de homem trabalhador, responsável e honesto. Muito obrigada por contribuir com a formação da minha essência, do meu caráter e oportunizar a realização deste sonho.

Ao meu orientador Professor **Ricardo de Souza Magini**, agradeço imensamente pela oportunidade de iniciar no meio científico; pela confiança em mim depositada para a execução deste trabalho; pelo constante incentivo à pesquisa e busca por novos aprendizados. Serei eternamente grata pela tua amizade, pelos conselhos nos momentos de tribulação, por toda a preocupação e ajuda nos momentos mais difíceis. Muito obrigada!

À querida **Débora Amgarten Ribeiro**, pela parceria e companheirismo em cada uma das etapas de execução deste trabalho. Muito obrigada por tornar nossas manhãs, tardes e noites de trabalho mais leves e tranquilas; por amenizar minhas angústias nos momentos de tensão; pela tua disposição em ajudar sempre. Tua presença e amizade foram essenciais para esta conquista!

Ao Dr. **Águedo Aragones** e à Professora **Andréa de Lima Pimenta**, que viabilizaram a execução deste trabalho através da junção de seus conhecimentos e descobertas. Muito obrigada por dividirem comigo tanto aprendizado!

À Professora **Elena Riet Correa Rivero**, que sem hesitar, aceitou ajudar em importantes etapas deste trabalho. Agradeço pela paciência, disponibilidade, dedicação e por todos os ensinamentos transmitidos. Seu amor pela profissão que exerce é nítido e inspirador. Muito obrigada por tudo!

À **Isis Carvalho Encarnação**, que dividiu alegremente comigo suas experiências laboratoriais. Tua presença foi imprescindível para o início deste trabalho. Muito obrigada por toda a ajuda, pelas instruções e pela paciência!

Ao **Clessius Xavier**, agradeço pela ajuda com as fotografias na intervenção cirúrgica e por transmitir tanta calma e tranquilidade.

Ao **Renan Dias**, por todo o auxílio e colaboração durante a execução do experimento. Muito obrigada pelo apoio! Seu bom-humor e alegria são contagiantes!

Ao Professor coorientador, **Cesar Augusto Magalhães Benfatti**, agradeço por todo o conhecimento compartilhado, pela disponibilidade em ajudar e pelas sugestões para a melhor execução do trabalho.

Ao Professor **Eduardo Antunes Bortoluzzi**, muito obrigada por compartilhar comigo suas experiências e conhecimentos adquiridos ao longo da sua vida profissional!

Ao Professor **Júlio César Matias de Souza**, obrigada pela ajuda com os detalhes que fazem toda a diferença!

Ao Professor **Adair Roberto Soares dos Santos**, pelo acolhimento e por abrir portas do LANDI, muito obrigada!

Ao Professor **Alexandre Onofre** e à **Elaine Borsatto**, agradeço pela receptividade no laboratório e por disponibilizar a utilização do microscópio multiobservador, possibilitando a execução de uma importante etapa deste trabalho.

“Cada novo conhecimento importante que se faz decompõe-nos e volta a compor-nos. Se esse conhecimento for da maior importância, passamos por uma regeneração.”

(Hugo Hofmannsthal)

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vivo* a biocompatibilidade das membranas bioabsorvíveis fabricadas a partir do ácido polilático co-glicólico (PLGA), associadas a antibiofilmes bacterianos. Foram utilizados 45 ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) adultos machos e 08 tipos de discos de membranas (grupos experimentais), sendo 02 tipos controles (colágeno e PLGA) e 06 tipos testes de membranas de PLGA contendo antibiofilmes bacterianos (lactamas ou nanopartículas de prata). Distribuídos aleatoriamente nos períodos experimentais de 02, 07 e 30 dias, cada animal recebeu, randomicamente, 04 discos de membranas implantados na região dorsal e subcutânea: 02 discos controles e 02 discos testes. Decorridos os períodos experimentais, os animais foram anestesiados para a realização de biópsias excisionais das áreas dos implantes e para coleta de amostras sanguíneas através de punção cardíaca (eutanásia). As amostras removidas da região subcutânea foram fixadas, destinadas ao processamento histológico e incluídas em parafina. Os cortes de 5 µm de espessura foram corados com Hematoxilina-Eosina e as lâminas histológicas foram analisadas descritivamente através da microscopia de luz. Foram avaliados para todos os grupos e períodos experimentais: a presença de processo inflamatório, sua classificação, magnitude e tipo(s) celular(es) predominante(s); a presença de cápsula de tecido conjuntivo (área reacional adjacente ao material implantado), seu tipo e sua espessura; a presença ou ausência de células gigantes multinucleadas, macrófagos, necrose e neoformação de vasos sanguíneos. Os resultados obtidos sugerem a biocompatibilidade das membranas de PLGA associadas às lactamas e nanopartículas de prata.

Palavras-chave: Teste de biocompatibilidade; biofilmes; PLGA; Lactamas.

ABSTRACT

The main aim of this study was to evaluate the *in vivo* biocompatibility of bioabsorbable membranes composed of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) embedding bacterial anti-biofilms. Eight different groups of membranes were placed in 45 male adult Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*). Six test groups of PLGA membranes were embedded with bacterial anti-biofilms (lactams or silver nanoparticles). Collagen and PLGA membranes were used as control groups. Each animal randomly received 04 membrane disks placed in subcutaneous dorsal area: 02 control and 02 test disks. After 02, 07 and 30 days of implantation, the animals were anaesthetized for the excisional biopsy of the implant areas and for blood sample collections through cardiac puncture (euthanasia). The retrieved membranes were prepared by histological processing and embedded in paraffin. Then 5µm cross-sectioned samples were stained using Hematoxylin-Eosin and descriptively analyzed by light microscopy. All groups and experimental periods were evaluated concerning: the magnitude, composition, pathways and classification of inflammatory processes. Results suggest the biocompatibility on PLGA membranes containing lactams and silver nanoparticles.

Keywords: Biocompatibility testing; biofilms; PLGA; Lactams

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Esquema demonstrativo das membranas controle e membranas testes utilizadas no experimento.29
- Figura 2** - A) Diluição do PLGA em clorofórmio (solvente) sob constante agitação; B) Membranas nas placas de vidro devidamente identificadas após a completa evaporação do solvente à temperatura ambiente; C e D) Discos de membranas cortados com 6 mm de diâmetro.31
- Figura 3** - A) Região dorsal após a tricotomia e antissepsia; B) Guia de acetato posicionada para a padronização das incisões; C) Delimitação das lojas cirúrgicas; D) Incisão; E) Divulsão; F) Inserção do disco de membrana na região subcutânea; G e H) Sutura.....33
- Figura 4** – Amostra coletada e armazenada em cassete histológico para a imersão em formol a 10% tamponado.....33
- Figura 5** – Parâmetros adotados quanto à magnitude do infiltrado inflamatório presente na área de tecido conjuntivo reacional (HE - 40X). A) Escasso; B) Leve; C) Moderado e D) Intenso.....35
- Figura 6** – Parâmetros adotados quanto à espessura de cápsula (HE – 10X). A) Espessa; B) Fina; C) Intermediária.36
- Figura 7** – Membrana controle de colágeno no período experimental de 02 dias (HE)..37
- Figura 8** – Membrana controle de colágeno no período experimental de 07 dias (HE).38
- Figura 9** - Membrana controle de colágeno no período experimental de 30 dias (HE)..39

Figura 10 - Membrana controle de PLGA no período experimental de 02 dias (HE).....	40
Figura 11 - Membrana controle de PLGA no período experimental de 07 dias (HE).....	41
Figura 12 - Membrana controle de PLGA no período experimental de 30 dias (HE).....	42
Figura 13 – Membranas testes de PLGA + LACTAMAS nos períodos experimentais de 02 dias (A e B), 07 dias (C, D, E e F) e 30 dias (G e H) - (HE)..	49
Figura 14 - Membranas testes de PLGA + NPAG nos períodos experimentais de 02 dias (A, B e C), 07 dias (D, E e F) e 30 dias (G e H) - (HE).... ..	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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
CHCl₃ - Clorofórmio
DMSO - Dimetilsulfóxido
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
h - Hora(s)
HA - Hidroxiapatita
HE - Hematoxilina-Eosina
LANDI - Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação
Ltda. - Limitada
m/v - Massa por volume
mg/kg - Miligrama por quilograma
mm - Milímetros
NPAg - Nanopartículas de prata
PA - ACS - Para Análise - *American Chemical Society*
PGA - Ácido Poliglicólico
pH - potencial Hidrogeniônico
PLA - Ácido Polilático
PLGA - Ácido polilático co-glicólico
PTFE-d - Politetrafluoretileno denso
PTFE-e - Politetrafluoretileno expandido
ROG - Regeneração Óssea Guiada
RTG - Regeneração Tecidual Guiada
UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

LISTA DE SÍMBOLOS

® - Marca registrada

°C - Grau Celsius

± - Mais ou menos

% - Por cento

nº - Número

µm - Micrômetros

X - Vezes

+ - Mais

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
	2.1 BASES BIOLÓGICAS DA REGENERAÇÃO TECIDUAL GUIADA (RTG).....	21
	2.2 REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA (ROG).....	22
	2.3 BARREIRAS FÍSICAS	23
	2.4 BIOFILMES E O CONTROLE BACTERIANO	25
3	OBJETIVOS	28
	3.1 OBJETIVO GERAL	28
	3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	29
	4.1 OBTENÇÃO E PREPARO DOS DISCOS DE MEMBRANA	30
	4.2 INTERVENÇÃO CIRÚRGICA.....	31
	4.3 COLETA DAS AMOSTRAS	32
	4.4 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....	34
	4.5 ANÁLISE MICROSCÓPICA	34
5	RESULTADOS	37
	5.1 MEMBRANA CONTROLE DE COLÁGENO	37
	5.1.1 Análise Microscópica Descritiva no Período de 02 dias	37
	5.1.2 Análise Microscópica Descritiva no Período de 07 dias	38
	5.1.3 Análise Microscópica Descritiva no Período de 30 dias	39
	5.2 MEMBRANA CONTROLE DE PLGA	39
	5.2.1 Análise Microscópica Descritiva no Período de 02 dias	39
	5.2.2 Análise Microscópica Descritiva no Período de 07 dias	40
	5.2.3 Análise Microscópica Descritiva no Período de 30 dias	41
	5.3 MEMBRANA TESTE DE PLGA + LACTAMA TIPO I	42

5.3.1	Análise Microscópica Descritiva no Período de 02 dias	42
5.3.2	Análise Microscópica Descritiva no Período de 07 dias	43
5.3.3	Análise Microscópica Descritiva no Período de 30 dias	43
5.4	MEMBRANA TESTE DE PLGA + LACTAMATIPO II	44
5.4.1	Análise Microscópica Descritiva no Período de 02 dias	44
5.4.2	Análise Microscópica Descritiva no Período de 07 dias	44
5.4.3	Análise Microscópica Descritiva no Período de 30 dias	45
5.5	MEMBRANA TESTE DE PLGA + LACTAMA TIPO III	45
5.5.1	Análise Microscópica Descritiva no Período de 02 dias	45
5.5.2	Análise Microscópica Descritiva no Período de 07 dias	46
5.5.3	Análise Microscópica Descritiva no Período de 30 dias	46
5.6	MEMBRANA TESTE DE PLGA + LACTAMA TIPO IV	47
5.6.1	Análise Microscópica Descritiva no Período de 02 dias	47
5.6.2	Análise Microscópica Descritiva no Período de 07 dias	47
5.6.3	Análise Microscópica Descritiva no Período de 30 dias	48
5.7	MEMBRANA TESTE DE PLGA + NPAg TIPO 1	50
5.7.1	Análise Microscópica Descritiva no Período de 02 dias	50
5.7.2	Análise Microscópica Descritiva no Período de 07 dias	50
5.7.3	Análise Microscópica Descritiva no Período de 30 dias	51
5.8	MEMBRANA TESTE DE PLGA + NPAg TIPO 2	51
5.8.1	Análise Microscópica Descritiva no Período de 02 dias	51
5.8.2	Análise Microscópica Descritiva no Período de 07 dias	51
5.8.3	Análise Microscópica Descritiva no Período de 30 dias	52
6	DISCUSSÃO	54
7	CONCLUSÃO	60
	REFERÊNCIAS.....	61
	ANEXO A	66

1 INTRODUÇÃO

O sucesso de um tratamento reabilitador através de próteses implantossuportadas depende de variáveis diversas, dentre elas destaca-se a quantidade óssea existente nos sítios de instalação dos implantes. Todavia, em uma grande parcela dos casos são observadas condições desfavoráveis do rebordo alveolar, devido à atrofia, reabsorções, perda óssea em decorrência de injúrias ou sequelas de trauma na região (CHIAPASCO, 2009). Sendo assim, procedimentos reconstrutivos são utilizados com o intuito de se obter tecido ósseo, viabilizando a instalação de implantes dentários pelo profissional (BUSER; WARRER; KARRING, 1990; BUSER et al., 1996).

A técnica reconstrutiva da Regeneração Óssea Guiada (ROG) aplica os princípios da exclusão tecidual e do repovoamento celular seletivo, que preconiza a utilização de barreiras físicas, assim como na Regeneração Tecidual Guiada (RTG), evitando a invasão de células provenientes do tecido epitelial e do tecido conjuntivo gengival nos sítios onde se deseja a formação óssea (DAHLIN et al., 1988; DAHLIN et al., 1990; SALONEN; PERSSON, 1990).

Algumas características ideais são requisitadas para as membranas utilizadas como barreira física tecidual nas técnicas reconstrutivas: a biocompatibilidade, que é a capacidade de exercer funções específicas e interagir com respostas apropriadas dos hospedeiros, sem lhes causar danos ou prejuízo (BLACK, 2005; COSTA; HEBLING; SOUZA, 2005); adaptação adequada à raiz, ao implante dentário ou ao tecido ósseo (vedamento); rigidez apropriada para atuar como mantenedora de espaço; permeabilidade para moléculas; oclusivas para células (migração celular seletiva); estabilidade; biodegradação controlada, para um tempo de atuação apropriado; permitir a incorporação de aditivos como antimicrobianos e bioestimuladores (RETZEPI; DONOS, 2010). Além disso, a facilidade de manejo clínico das membranas durante os procedimentos cirúrgicos deve ser avaliada na escolha do material a ser utilizado.

Existem dois tipos básicos de membranas que podem ser utilizadas na RTG e ROG: as absorvíveis e as não absorvíveis. As membranas também são classificadas de acordo com o tipo de material com os quais são fabricadas: sintéticas, derivadas de polímeros, ou de origem animal.

As membranas de colágeno atualmente comercializadas são do tipo absorvíveis, e geradas a partir de colágeno tipo I, um componente predominante no tecido conjuntivo, ou de uma combinação de colágenos tipo I e III (BUNYARATAVEJ; WANG, 2001). Dentre as vantagens das membranas de colágeno destacam-se: hemostasia, quimiotaxia para fibroblastos do ligamento periodontal, baixa imunogenicidade e fácil manipulação. Entretanto, apesar de serem amplamente utilizadas e consideradas “padrão-ouro” para diversos procedimentos, possuem propriedades mecânicas desfavoráveis e não funcionam de forma totalmente adequada como barreira devido à sua rápida biodegradação (LOCCI et al., 1997; ROTHAMEL et al., 2004; SCHLEGEL et al., 1997; TATAKIS; PROMSUDTHI; WIKESJÖ, 1999).

As membranas derivadas de polímeros podem ser classificadas em absorvíveis, quando produzidas a partir dos ácidos polilático (PLA) e poliglicólico (PGA), e não absorvíveis quando produzida em politetrafluoretileno expandido (PTFE-e) ou denso (PTFE-d). A introdução de barreiras absorvíveis nos procedimentos reconstrutivos tem como principal objetivo evitar uma segunda cirurgia para a remoção da membrana, diminuindo a morbidade associada ao procedimento cirúrgico e o custo para o paciente. Os polímeros derivados do PLA possuem vantagens como a biocompatibilidade, alta resistência, comportamento termoplástico e degradação lenta. Os polímeros derivados do PGA exibem boas propriedades mecânicas, porém sofrem rápida absorção pelo organismo. Sabendo-se que a combinação de polímeros permite melhorar as propriedades físicas e químicas das membranas, o ácido polilático co-glicólico (PLGA), uma combinação do PLA e PGA, torna-se uma factível opção para o uso em procedimentos reconstrutivos (FILHO et al., 2006). Adicionalmente, o PLGA possui bioatividade, pois permite a incorporação de substâncias como antimicrobianos, imunoestimulantes e anti-inflamatórios, com liberação local e controlada (OWEN et al., 2010; CHEN et al., 2012).

A seleção de qual o tipo membrana será utilizada em procedimentos reconstrutivos é de extrema importância para a obtenção dos resultados desejados e para a conclusão adequada do tratamento. Porém, outro fator determinante neste processo é o equilíbrio das interações entre bactérias, presentes no biofilme da cavidade bucal, e o hospedeiro. Um desequilíbrio desta interação provoca injúrias aos tecidos circunjacentes com potencial prejuízo à neoformação óssea (MOMBELLI, 2002).

O processo inicial de aderência bacteriana na formação do biofilme oral ocorre de forma organizada: imediatamente após a higiene bucal ocorre a formação da chamada película adquirida nas superfícies do meio bucal. De natureza glicoproteica, esta película é constituída por componentes salivares e do fluido gengival, produtos celulares do hospedeiro e bactérias (LISTGARTEN, 1972; LISTGARTEN, 1976). A maturação do biofilme ocorre a partir da colonização destas bactérias, e também pela adesão e crescimento de outras espécies. A maioria das bactérias patogênicas constituem biofilmes (CARNIOL; GILMORE, 2004) e possuem uma série de vantagens sobre as bactérias planctônicas, como a aquisição de resistência aos antibióticos (COSTERTON et al., 1987).

Neste contexto, o desenvolvimento de compostos capazes de inibir a formação de biofilmes tornou-se evidente como alternativa frente aos antibióticos convencionais, muitas vezes ineficazes. Os compostos inibidores da formação e manutenção dos biofilmes visam um efetivo combate às infecções microbianas, sem promover a morte dos patógenos e diminuindo a possibilidade de desenvolvimento de resistência por parte das bactérias (MUSK; HERGENROTHER, 2006).

Uma classe de compostos que desempenha esta função é o grupo das furanonas halogenadas naturais. Estes compostos são provenientes da alga vermelha *Delisea pulchra* e apresentaram atividade inibitória contra a formação do biofilme (HENTZER et al., 2002; HENTZER et al., 2003; MANEFIELD et al., 2002; REN; SIMS; WOOD, 2001; REN; SIMS; WOOD, 2002;). A dificuldade na obtenção das furanonas naturais estimulou o desenvolvimento de compostos análogos sintéticos, com estrutura química semelhante, e que atuam como potenciais inibidores de biofilme (HE et al., 2012). Dentre estes compostos estão as lactamas (PEREIRA et al., 2014).

Também como alternativa frente aos antibióticos, as nanopartículas de prata (NPAg) vêm sendo utilizadas na nanoquímica e nanoengenharia médica e farmacêutica, bem como nas indústrias alimentícia e têxtil, com o objetivo de limitar o crescimento bacteriano (CHAU; WU; YEN, 2007; VIGNESHWARAN et al., 2007). As NPAg mostraram-se capazes de reduzir infecções microbianas na pele e em feridas (PADDLE-LEDINEK; NASA; CLELAND, 2006; ULKUR et al., 2005); de 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).

A incorporação de agentes antibiofilmes às membranas absorvíveis e sintéticas possui relevância clínica inquestionável na Odontologia para a utilização em técnicas reconstrutivas, tendo em vista que as membranas por ventura expostas ao ambiente bucal estão suscetíveis à colonização de bactérias patogênicas e formação de um biofilme capaz de comprometer o tratamento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O diagnóstico apropriado da doença periodontal compreende a identificação do tipo, extensão, distribuição e gravidade da doença. Deve proporcionar também, o entendimento dos processos patológicos subjacentes e suas causas. Desta maneira, torna-se possível a estruturação e execução de um plano de tratamento inteligente e efetivo (CARRANZA; TAKEI, 2007a). Neste contexto surge a terapia periodontal cirúrgica, que abrange técnicas periodontais reconstrutivas, visando os procedimentos regenerativos. Para o melhor entendimento de suas bases biológicas e aplicações clínicas é importante fazer a distinção entre reparo e regeneração.

Segundo a *American Academy of Periodontology* (2001), a regeneração é a reprodução ou reconstituição do mesmo tecido existente previamente à injúria. Em contrapartida, o reparo é a formação de um tecido que não é capaz de restaurar completamente a arquitetura e a função do tecido destruído. Portanto, a regeneração tecidual periodontal ocorre quando há formação de um novo cemento com fibras colágenas inseridas (nova inserção) em uma superfície radicular desprovida de seus tecidos do ligamento periodontal, e também quando há formação de novo osso alveolar (CORTELLINI; TONETTI, 2010). O reparo simplesmente restaura a continuidade da gengiva marginal doente e restabelece o sulco gengival normal ao mesmo nível radicular da base da bolsa periodontal preexistente, detendo a destruição óssea, mas sem resultar em ganho de inserção gengival ou altura óssea (CARRANZA; TAKEI, 2007b).

A doença periodontal, em sua maioria, compreende processos inflamatórios crônicos. As bactérias e os produtos bacterianos que mantêm o processo da doença, juntamente com o exsudato inflamatório presente, são prejudiciais às células e tecidos em regeneração. Portanto, removendo-se o biofilme oral bacteriano e prevenindo sua nova formação, o tratamento periodontal possibilita ao paciente se beneficiar da capacidade regenerativa inerente aos tecidos (CARRANZA; TAKEI, 2007b).

2.1 BASES BIOLÓGICAS DA REGENERAÇÃO TECIDUAL GUIADA (RTG)

Segundo Melcher (1976), o reestabelecimento dos tecidos perdidos devido à doença periodontal, pode ocorrer pelo repovoamento de quatro tipos celulares distintos para a superfície radicular, após a terapia periodontal: 1-Células epiteliais; 2- Células do tecido conjuntivo gengival; 3- Células do tecido ósseo e 4- Células do ligamento periodontal. Sugeriu, então, que o tipo celular que repovoasse primeiro a região do defeito periodontal, determinaria a natureza da inserção a ser formada. Apoiado nisto, iniciaram-se estudos na década de 1980 visando elucidar a dinâmica de cura dos tecidos periodontais e a possibilidade de se obter, idealmente, a completa reconstrução do periodonto, com a regeneração dos tecidos periodontais previamente existentes à doença.

Estudos em humanos (LISTGARTEN; ROSENBERG, 1979) e macacos (CATON; NYMAN; ZANDER, 1980) demonstraram, frente a diversas modalidades de terapias regenerativas para os defeitos periodontais induzidos, que o reparo das lesões ocorreu através da migração apical das células epiteliais gengivais. As células epiteliais sabidamente possuem alta capacidade mitótica, e a inibição da divisão celular ocorre pelo contato com estruturas teciduais organizadas como, por exemplo, as fibras de Sharpey, presentes no ligamento periodontal. Desta forma, as células epiteliais multiplicam-se rapidamente ao longo da superfície radicular em direção apical, originando um epitélio juncional longo. Este processo interfere no ganho de inserção coronal, pois a altura na qual as fibras periodontais podem se inserir ao cimento é limitada.

Sequencialmente, estudos em animais (AUKHIL et al., 1986; NYMAN et al., 1980) demonstraram que o tecido conjuntivo gengival, em contato com a superfície radicular desprovida de sua inserção, não possui células com a capacidade de produzir nova inserção de tecido conjuntivo, além de promover reabsorção radicular. Karring, Nyman e Lindhe (1980) avaliaram, através de um estudo em cães, o potencial regenerador das células do tecido ósseo. Os resultados evidenciaram anquilose e reabsorção radicular, indicando que o estabelecimento de nova inserção periodontal não provém de células do tecido ósseo.

Por fim, estudos sugeriram que a capacidade de regeneração dos tecidos periodontais perdidos está contida nas células provenientes do ligamento periodontal (AUKHIL et al., 1986; BOYKO; MELCHER; BRUNETTE, 1981). Nyman et al. (1982)

num estudo em humanos, utilizaram pela primeira vez uma barreira tecidual (filtros Millipore®), para impedir que as células epiteliais e do tecido conjuntivo gengival povoassem a superfície radicular. Logo, comprovaram a formação de novo cemento com fibras colágenas inseridas e novo osso alveolar pelas células do ligamento periodontal.

A finalidade da regeneração periodontal é a obtenção de novo cemento, novo osso e ligamento periodontal biodinâmico (com as fibras de Sharpey inseridas no novo cemento e no novo osso). Alguns fatores são imprescindíveis para isto: A biocompatibilidade da superfície radicular, pois a degeneração das fibras de Sharpey, o acúmulo de bactérias e seus produtos e a desintegração de cemento e dentina interferem com a nova inserção (CARRANZA; TAKEI, 2007b); impedir a migração apical do epitélio juncional e excluir fibroblastos gengivais, pela incapacidade de promoverem nova inserção; estabilizar e proteger o coágulo resultante da intervenção terapêutica, considerado um fator adicional na inibição da migração apical do epitélio juncional; estimular a proliferação, migração e expressão fenotípica das células do ligamento periodontal, onde se concentra o potencial regenerativo do aparato periodontal conforme estudos anteriormente evidenciados. Neste contexto, os princípios e aplicações da RTG tornam-se inteligíveis.

A RTG consiste na utilização de barreiras físicas de diferentes tipos, com o propósito de excluir o epitélio e o tecido conjuntivo gengival, a fim de favorecer a repopulação da superfície radicular, previamente acometida pela doença, por células do ligamento periodontal (CARRANZA; TAKEI; COCHRAN, 2007; CORTELLINI; TONETTI, 2010). Portanto, os princípios da RTG baseiam-se na exclusão tecidual e repovoamento celular seletivo.

2.2 REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA (ROG)

A partir das Bases Biológicas da RTG, a ROG foi introduzida pelo estudo de Dahlin et al. (1988), que obtiveram regeneração óssea em defeitos criados na mandíbula de ratos, através da utilização de uma barreira física (membrana de Teflon). Conceitualmente a ROG aplica os princípios da RTG da exclusão tecidual e do repovoamento celular seletivo, que preconiza a utilização de barreiras físicas para evitar a invasão de células provenientes do tecido epitelial e do tecido conjuntivo

gengival (fibroblastos), nos sítios de cicatrização onde se deseja a formação óssea (DAHLIN et al., 1988; DAHLIN et al., 1990; SALONEN; PERSSON, 1990).

A aplicação clínica da ROG visa a neoformação óssea como, por exemplo, na reconstrução de defeitos ósseos periimplantares, e na preservação do volume e contorno do rebordo alveolar pós-exodontia (RETZEPI; DONOS, 2010), para que uma posterior reabilitação com implantes dentários seja exequível. Inserido neste contexto, diversos estudos demonstram a aplicação da ROG em procedimentos para aumento de rebordo previamente a instalação de implantes (BUSER et al., 1995; DONOS; MARDAS; CHADHA, 2008; SEIBERT; NYMAN, 1990;); para possibilitar a instalação de implante imediato em alvéolos pós-exodontia (HÄMMERLE; KARRING, 1998; WARRER et al., 1991) e também, para o aumento vertical ou horizontal do rebordo com instalação de implante imediato (CHIAPASCO; ZANIBONI, 2009; ESPOSITO et al., 2006; MAYFIELD et al. 1998; TINTI; PARMA-BENFENATI, 1998;).

2.3 BARREIRAS FÍSICAS

O primeiro dispositivo de exclusão tecidual utilizado foi um filtro de acetato de celulose (Millipore®) na década de 80 (NYMAN et al., 1982), que apesar de cumprir o objetivo proposto, não possuía indicação para aplicação clínica. As primeiras membranas desenvolvidas especialmente para a regeneração periodontal, devido à sua natureza não absorvível, persistiam no interior dos tecidos, havendo a necessidade de uma segunda cirurgia para removê-las. Isto envolve a aceitação do paciente, o tempo, o custo e a morbidade associada a qualquer procedimento cirúrgico (TATAKIS; PROMSUDTHI; WIKESJÖ, 1999). Além disso, a exposição prematura e espontânea destas membranas ao ambiente bucal, com subsequente colonização bacteriana mostrou-se um problema comum, comprometendo o tratamento por infecção (RETZEPI; DONOS, 2010; ROTHAMEL et al., 2004). Dentre estas membranas não absorvíveis destacam-se as poliméricas de politetrafluoroetileno expandido (PTFE-e) ou denso (PTFE-d). Com o intuito de superar os problemas evidentes com as membranas não absorvíveis, a utilização de membranas absorvíveis, naturais e sintéticas, ganhou espaço na RTG e ROG. As membranas absorvíveis de colágeno são classificadas como naturais e compostas principalmente de colágeno tipo I (componente predominante no tecido conjuntivo),

ou pela combinação de colágeno tipo I e III. As fontes de colágeno são variáveis e incluem tendão e derme de bovinos, derme de suínos e pele de ovinos (BUNYARATAVEJ; WANG, 2001). Dentre as vantagens das membranas de colágeno destacam-se: hemostasia, quimiotaxia para fibroblastos do ligamento periodontal, baixa imunogenicidade e fácil manipulação. Apesar de serem amplamente utilizadas e consideradas “padrão-ouro” para diversos procedimentos, possuem propriedades mecânicas desfavoráveis e não funcionam de forma totalmente adequada como barreira devido à sua rápida degradação pela atividade enzimática de macrófagos e leucócitos polimorfonucleares (LOCCI et al., 1997; ROTHAMEL et al., 2004; SCHLEGEL et al., 1997; TATAKIS; PROMSUDTHI; WIKESJÖ, 1999).

As membranas absorvíveis classificadas como sintéticas são produzidas a partir de polímeros. Os mais comumente utilizados são o ácido polilático (PLA), o ácido poliglicólico (PGA) e o copolímero ácido polilático co-glicólico (PLGA) (TATAKIS; PROMSUDTHI; WIKESJÖ, 1999). A biodegradação destes biomateriais ocorre por hidrólise e os produtos de decomposição gerados nesta reação são incorporados ao ciclo de Krebs, e então eliminados do organismo (ATHANASIOU; NIEDERAUER; AGRAWAL, 1996). Os polímeros derivados do PLA possuem vantagens como a biocompatibilidade, alta resistência, comportamento termoplástico e degradação lenta. Os polímeros derivados do PGA exibem boas propriedades mecânicas, porém sofrem rápida absorção pelo organismo. Sua copolimerização com o PLA, por exemplo, visa diminuir a dureza de suas fibras e ajustar seu tempo de degradação (FILHO et al., 2006). O PLGA, copolímero originário da combinação do PLA com o PGA é quimicamente estável, biocompatível, não tóxico, biodegradável e possui ótimas propriedades mecânicas, como alto módulo de elasticidade, alta resistência à tração, baixa ductilidade e baixa dureza (OWEN et al., 2010). Estes copolímeros comercialmente disponíveis possuem diferentes pesos moleculares e proporções distintas de cada polímero que os compõe, variações estas que determinam o tempo de degradação do material. (DANHIER et al., 2012). Portanto, de acordo com a finalidade de sua aplicação, o tempo de degradação do polímero pode ser pré-estabelecido. Outra importante característica do PLGA é sua bioatividade, pois permite a incorporação de substâncias como antimicrobianos, imunoestimulantes e anti-inflamatórios, com liberação local e controlada (CHEN et al., 2012; DANHIER et al., 2012; OWEN et al., 2010;).

As membranas utilizadas na RTG e na ROG devem, idealmente, conter algumas características: biocompatibilidade, ou seja, capazes de exercer funções específicas e interagir com respostas apropriadas dos hospedeiros, sem lhes causar danos ou prejuízo (BLACK, 2005; COSTA; HEBLING; SOUZA, 2005); adaptação adequada à raiz, ao implante dentário ou ao tecido ósseo (vedamento); rigidez apropriada para atuar como mantenedora de espaço; permeabilidade para moléculas; oclusivas para células; estabilidade; biodegradação controlada, para um tempo de atuação apropriado e permitir a incorporação de aditivos como antimicrobianos e bioestimuladores (RETZEPI; DONOS, 2010).

2.4 BIOFILMES E O CONTROLE BACTERIANO

Os biofilmes têm sido muito estudados na microbiologia ambiental e das doenças infecciosas. Eles consistem em uma ou mais comunidades de microrganismos, embebidas numa matriz extracelular, e que colonizam um conjunto diversificado de superfícies, como as sólidas e úmidas, incluindo a cavidade bucal (COSTERTON et al., 1987; COSTERTON, 1999; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2002). Além disso, são apontados como o método preferido de crescimento para a maioria das espécies bacterianas (ROBERTS et al., 1999). A formação do biofilme bacteriano é um processo dinâmico e contínuo, que envolve interações moleculares e etapas específicas (MARSH; MUSK; HERGENROTHER, 2006). Inicia-se imediatamente após a higiene bucal, com a formação da chamada película adquirida nas superfícies do meio bucal. De natureza glicoproteica, esta película é constituída por componentes salivares e do fluido gengival, produtos celulares do hospedeiro e bactérias (LISTGARTEN, 1972; LISTGARTEN, 1976). A maturação do biofilme ocorre a partir da colonização destas bactérias, e também pela adesão e crescimento de outras espécies bacterianas.

A maioria das bactérias patogênicas existe na forma de comunidades que constituem os biofilmes (CARNIOL; GILMORE, 2004). Bactérias aderidas (sésseis), que crescem em um biofilme, exibem características que proporcionam uma série de vantagens sobre as bactérias unicelulares dispersas (planctônicas) (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2002). Estas características incluem: a expressão aumentada e trocas de genes benéficos para a manutenção do biofilme; alterações fenotípicas na morfologia da colônia; aquisição de resistência aos antibióticos; 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).

Um dos fatores relacionados à aquisição de resistência aos antibióticos é a incapacidade de penetração do fármaco em todas as áreas do biofilme. Estas comunidades bacterianas organizadas em biofilmes possuem mecanismos de percepção da densidade populacional, conhecido como “*Quorum Sensing*”. Portanto, agem de forma comunitária e tornam-se capazes de resistir aos antibióticos convencionais, permitindo a evolução de espécies resistentes (DAVIES, 2003).

Neste contexto, o desenvolvimento de compostos capazes de inibir a formação de biofilmes tornou-se evidente como alternativa frente aos antibióticos convencionais, muitas vezes ineficazes. Os compostos inibidores da formação e manutenção dos biofilmes visam um efetivo combate às infecções microbianas, sem promover a morte dos patógenos e diminuindo a possibilidade de desenvolvimento de resistência por parte das bactérias (MUSK; HERGENROTHER, 2006).

Uma classe de compostos que desempenha esta função é o grupo das furanonas halogenadas naturais. Estes compostos são provenientes da alga vermelha *Delisea pulchra* e apresentaram atividade inibitória na formação de biofilme, por diferentes mecanismos, em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (HENTZER et al., 2002; HENTZER et al., 2003; MANEFIELD et al., 2002; REN; SIMS; WOOD, 2001; REN; SIMS; WOOD, 2002). A dificuldade na obtenção das furanonas naturais estimulou o desenvolvimento de compostos análogos sintéticos, com estrutura química semelhante, e que atuam como potenciais inibidores de biofilme (HE et al., 2012). Dentre estes compostos estão as lactamas (PEREIRA et al., 2014).

Outra considerável alternativa frente aos antibióticos são as nanopartículas de prata (NPAg), que vêm sendo amplamente utilizadas com sucesso na nanoquímica e nanoengenharia médica e farmacêutica, bem como nas indústrias alimentícia e têxtil, com o objetivo de limitar o crescimento bacteriano (CHAU; WU; YEN, 2007; VIGNESHWARAN et al., 2007). As NPAg mostraram-se capazes de reduzir infecções microbianas na pele e em feridas (CLELAND, 2006; PADDLE-LEDINEK; NASA; ULKUR et al., 2005); 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;).

Embora os efeitos antimicrobianos e antifúngicos da prata estejam bem documentados, os mecanismos de ação através dos quais exerce a sua bioatividade 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. (MARTINEZ-GUTIERREZ et al., 2010; PARK et al., 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a biocompatibilidade das membranas de PLGA associadas às lactamas ou nanopartículas de prata (antibiofilmes).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar nos períodos de 02, 07 e 30 dias, em microscopia de luz, os tecidos subcutâneos adjacentes às regiões de implantação dos discos de membranas, os seguintes eventos histológicos: a presença de processo inflamatório, sua classificação (agudo, crônico ou misto), magnitude (escasso, leve, moderado ou intenso) e tipo(s) celular(es) predominante(s); a presença de cápsula de tecido conjuntivo (área reacional adjacente ao material implantado), seu tipo (tecido de granulação, fibrosa densa ou intermediária) e, quando bem definida, sua espessura (espessa, fina ou intermediária); a presença ou ausência de células gigantes multinucleadas, macrófagos, necrose e neoformação de vasos sanguíneos;

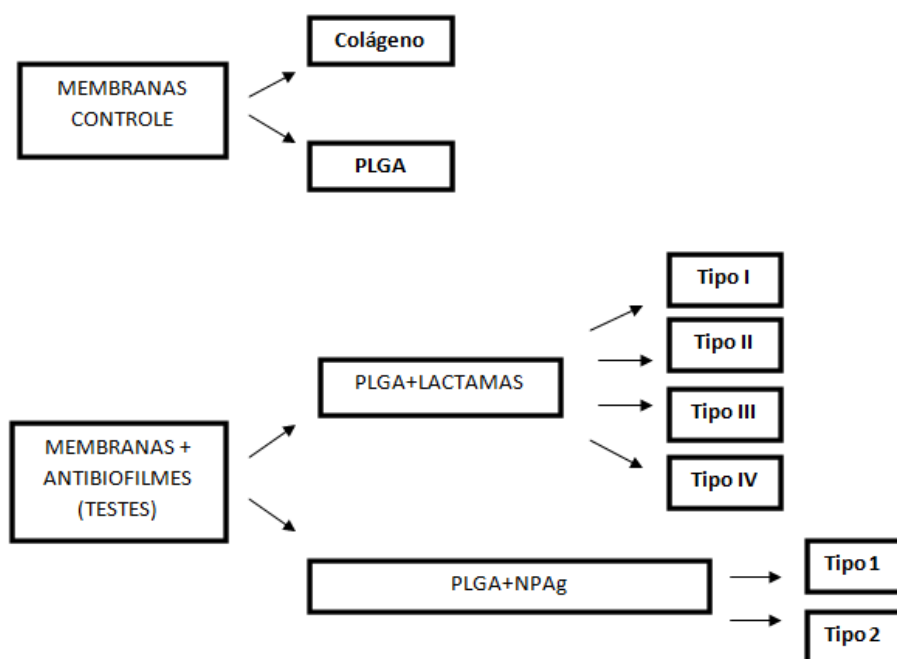
Observar histologicamente as características de integridade das membranas implantadas nos períodos experimentais de 02, 07 e 30 dias.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto referente a esta pesquisa possui aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA - UFSC), sob o protocolo PP00920 (ANEXO A).

Para a realização do experimento foram utilizados 45 ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), adultos jovens (08 semanas) e machos, com peso entre 200 e 300 gramas, provenientes do Biotério Central da UFSC, e também, 08 tipos distintos de membranas (grupos experimentais) conforme a Figura 1:

Figura 1 - Esquema demonstrativo das membranas controle e membranas testes utilizadas no experimento.



Distribuídos aleatoriamente nos períodos experimentais de 02, 07 e 30 dias (15 animais por período), cada animal recebeu 04 discos de membranas implantados na região dorsal e subcutânea, dividida em 04 lojas cirúrgicas para a implantação individual dos discos: Loja A (superior lado esquerdo); loja B (superior lado direito); loja C (inferior lado esquerdo); loja D (inferior lado direito) (Figuras 3B e 3C). Em todos os animais, 02 destes discos eram das membranas controle, ou seja, um disco de membrana de PLGA e outro disco de membrana de colágeno. Os outros 02

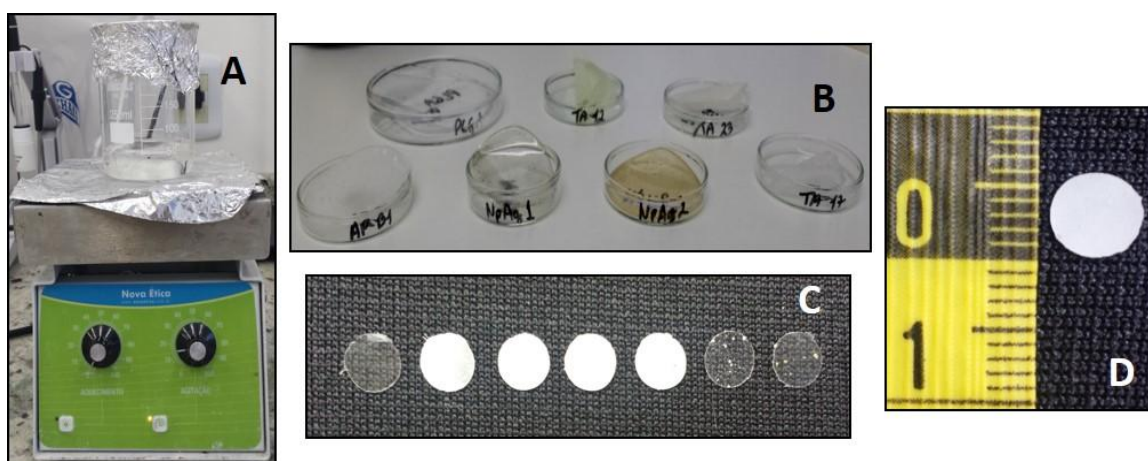
discos de membranas foram definidos randomicamente envolvendo os 06 grupos experimentais restantes (discos de membranas de PLGA contendo antibiofilmes bacterianos). Definidos os tipos de membrana para cada animal, a implantação foi realizada em sistema de rodízio (sentido horário) entre as lojas cirúrgicas, de um animal para o outro. Desta maneira, foram obtidas 05 amostras de cada tipo de membrana de PLGA contendo antibiofilme bacteriano, em cada período experimental, e em todos os animais, os grupos controles estavam presentes, totalizando 15 amostras de cada membrana controle para cada período experimental. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (05 animais por gaiola), higienizadas periodicamente, em ambiente com temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade de $60\% \pm 5\%$ e em ciclo claro/escuro de 12/12h. A alimentação foi oferecida *ad libitum*, composta de ração balanceada padrão e água.

4.1 OBTENÇÃO E PREPARO DOS DISCOS DE MEMBRANA

As membranas de colágeno (Bio-Gide[®], Geistlich - Wolhusen, Suíça) necessárias para o experimento foram obtidas através de compra. Todos os outros tipos de membranas utilizadas foram fabricados no Núcleo de Pesquisa em Materiais Cerâmicos e Compósitos (CERMAT), localizado na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), utilizando o copolímero PLGA (Purasorb[®], Corbion Purac – Amsterdam, Holanda), pela técnica de evaporação do solvente. Concluída a completa dissolução da quantidade pré-determinada (em gramas) de polímero em clorofórmio PA-ACS (CHCl_3 , LabSynth - Diadema, Brasil) (10% m/v), sob constante agitação à temperatura ambiente (Figura 2A), a solução obtida foi depositada numa placa de vidro circular, e armazenada à temperatura ambiente até a completa evaporação do solvente (Figura 2B). Os grupos experimentais de membranas de PLGA contendo agentes antibiofilme (lactamas e NPAg) seguiram a mesma sequência de produção, porém as substâncias foram adicionadas em concentrações pré-determinadas (concentração inibitória mínima para a formação de biofilme), após a completa diluição do PLGA em clorofórmio. Foram, então, depositadas em placas de vidro separadamente e armazenadas à temperatura ambiente. As lactamas utilizadas neste experimento foram sintetizadas no Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, enquanto as NPAg, foram fornecidas pela TNS Nanotecnologia Ltda. (Florianópolis, Brasil).

Finalizado o processo de evaporação do solvente, todas as membranas produzidas foram padronizadas através do corte em discos de 6 mm de diâmetro, com auxílio de um perfurador metálico (CiS[®], Sertic – São Paulo, Brasil) (Figuras 2C e 2D). Os discos foram embalados e enviados para a esterilização com radiação gama na CBE – Unidade de Esterilização Cotia Ltda. (Cotia, Brasil). As membranas de colágeno de dimensões 30 x 40 mm adquiridas já estéreis, foram cortadas em discos no momento da intervenção cirúrgica, com auxílio de um *Punch* de 6 mm de diâmetro em sua ponta ativa (ABC Instrumentos cirúrgicos Ltda. – São Paulo, Brasil) previamente esterilizado em autoclave.

Figura 2 - A) Diluição do PLGA em clorofórmio (solvente) sob constante agitação; B) Membranas nas placas de vidro devidamente identificadas após a completa evaporação do solvente à temperatura ambiente; C e D) Discos de membranas cortados com 6 mm de diâmetro. Salienta-se que os discos de membranas opacos (figura C) correspondem aos diferentes tipos de membranas de PLGA + Lactamas.



4.2 INTERVENÇÃO CIRÚRGICA

Os procedimentos operatórios, após um período de 03 dias de aclimatação dos animais, foram realizados no Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação (LANDI), pertencente ao Centro de Ciências Biológicas (CCB) da UFSC. Em ambiente asséptico, todo o material cirúrgico necessário e previamente esterilizado foi posicionado na mesa operatória preparada para a realização do experimento.

Após a pesagem, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com uma combinação de 90 mg/kg de cloridrato de cetamina 10% (quetamina[®], Vetecia -

São Paulo, Brasil) e 10 mg/kg cloridrato de xilazina 2% (Dopaser[®], Calier S.A. - Barcelona, Espanha). Com o animal posicionado sobre a mesa cirúrgica em decúbito ventral, procedeu-se a tricotomia da região dorsal, seguida pela antisepsia com algodão embebido em solução de iodopovidona (Povidine[®], Johnson&Johnson - São Paulo, Brasil) (Figura 3A). Para a obtenção das lojas cirúrgicas individuais, com auxílio de bisturi e lâmina nº15 (Swann-Morton[®], SurgicalBlades - Inglaterra), 04 incisões cutâneas no sentido longitudinal, 02 superiores e 02 inferiores, foram realizadas no dorso do animal utilizando-se uma guia de acetato. Esta guia promoveu a padronização das lojas para todos os animais (Figuras 3B e 3C); cada incisão foi realizada com 20 mm de comprimento e afastadas 20 mm umas das outras (Figura 3D). Feitas as incisões, o tecido subcutâneo foi divulsionado com auxílio de uma tesoura de ponta romba, para um dos lados de cada uma das incisões (distanciando-se da linha medial dorsal), de maneira a atingir uma profundidade de 18 mm (Figura 3E). Com auxílio de uma pinça clínica nº 03, os discos de membrana foram introduzidos nas lojas cirúrgicas (Figura 3F). A sutura foi realizada com fio de Nylon 5-0 (Ethicon[®], Johnson&Johnson- São Paulo, Brasil) (Figuras 3G e 3H). Os animais foram monitorados individualmente até a recuperação da anestesia e então, novamente agrupados nas gaiolas. Realizou-se acompanhamento diário, com a finalidade de evitar intercorrências, preservando o experimento.

4.3 COLETA DAS AMOSTRAS

Decorridos os períodos experimentais de 02, 07 e 30 dias, os animais foram pesados, anestesiados e a região dorsal tricotomizada. A seguir, biópsias excisionais das regiões de implantação dos discos de membrana foram realizadas, abrangendo suficiente tecido normal circunjacente. Isto preservou a reação tecidual em contato com o material, área principal de análise, durante o procedimento cirúrgico. As amostras coletadas foram individualmente armazenadas em cassetes histológicos unitários, devidamente identificados (Figura 4), e estes foram imersos em solução de formol a 10% tamponado para a fixação. Por fim, amostras sanguíneas foram coletadas para análise laboratorial, através de punção cardíaca, ocorrendo, assim, a morte dos animais.

Figura 3 - A) Região dorsal após a tricotomia e antissepsia; B) Guia de acetato posicionada para a padronização das incisões; C) Delimitação das lojas cirúrgicas; D) Incisão; E) Divulsão; F) Inserção do disco de membrana na região subcutânea; G e H) Sutura.

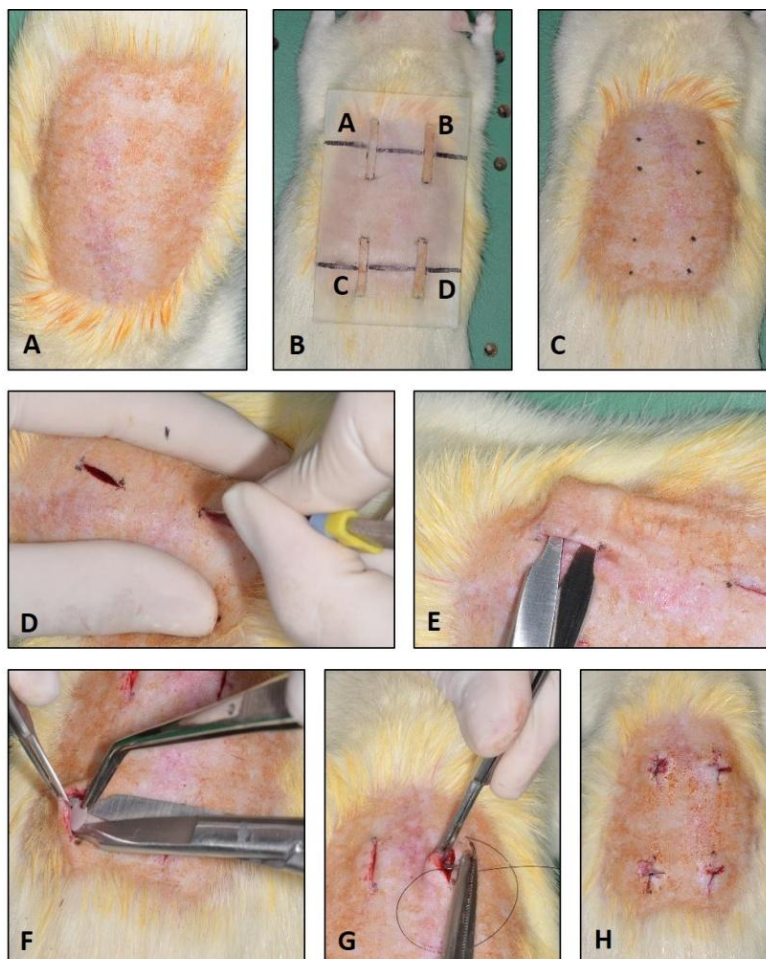
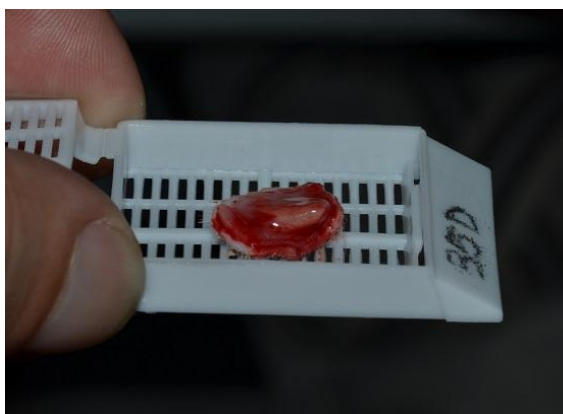


Figura 4 – Amostra coletada e armazenada em cassete histológico para a imersão em formol a 10% tamponado.



4.4 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Após 48h de fixação, a desidratação e diafanização das peças foram executadas através do aparelho histotécnico, um processador automático de tecidos (OMA DM-20, OMA Equipamentos para Laboratórios Ltda. - São Paulo, Brasil). Concluído o ciclo de processamento, cada peça foi seccionada ao meio, obtendo-se duas partes que foram incluídas manualmente em parafina, permanecendo no mesmo bloco. Empregou-se, então, um micrótomo para a realização dos cortes histológicos transversais semi-seriados de 5 µm de espessura. Os cortes adquiridos foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE), permitindo a análise histológica.

4.5 ANÁLISE MICROSCÓPICA

As lâminas contendo os tecidos corados por HE foram examinadas com auxílio de um microscópio de luz (5X, 10X e 40X), percorrendo toda a extensão do corte com a finalidade de localizar o tecido adjacente à região da implantação dos discos de membranas. A avaliação das respostas do tecido conjuntivo em contato com os discos de membranas testados foi realizada de forma descritiva, para todas as amostras de todos os grupos nos 03 períodos experimentais, simultaneamente por dois examinadores distintos (microscópio multiobservador). As análises consideraram a presença de processo inflamatório, sua classificação (agudo, crônico ou misto), magnitude (escasso, leve, moderado ou intenso) e tipo(s) celular(es) predominante(s); a presença de cápsula de tecido conjuntivo (área reacional adjacente ao material implantado), seu tipo (tecido de granulação, fibrosa densa ou intermediária) e, quando bem definida, sua espessura (espessa, fina ou intermediária); a presença ou ausência de células gigantes multinucleadas, macrófagos, necrose e a neoformação de vasos sanguíneos.

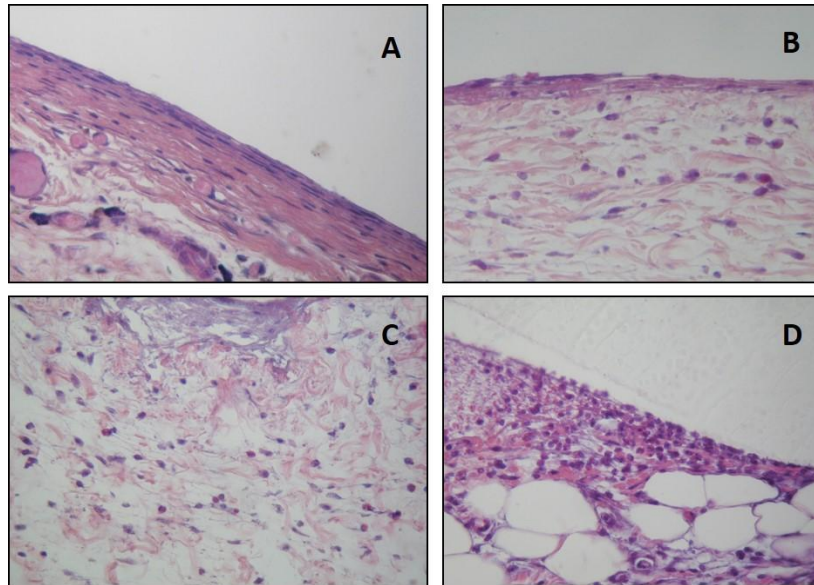
4.5.1 Parâmetros Microscópicos Adotados

4.5.1.1 Quanto à Magnitude do Infiltrado Inflamatório:

a) Escasso: 0 a 10 células inflamatórias por campo (Figura 5A);

- b) Leve: 11 a 25 células inflamatórias por campo (Figura 5B);
- c) Moderado: 26 a 50 células inflamatórias por campo (Figura 5C);
- d) Intenso: acima de 50 células inflamatórias por campo (Figura 5D).

Figura 5 – Parâmetros adotados quanto à magnitude do infiltrado inflamatório presente na área de tecido conjuntivo reacional (HE - 40X). A) Escasso; B) Leve; C) Moderado e D) Intenso.



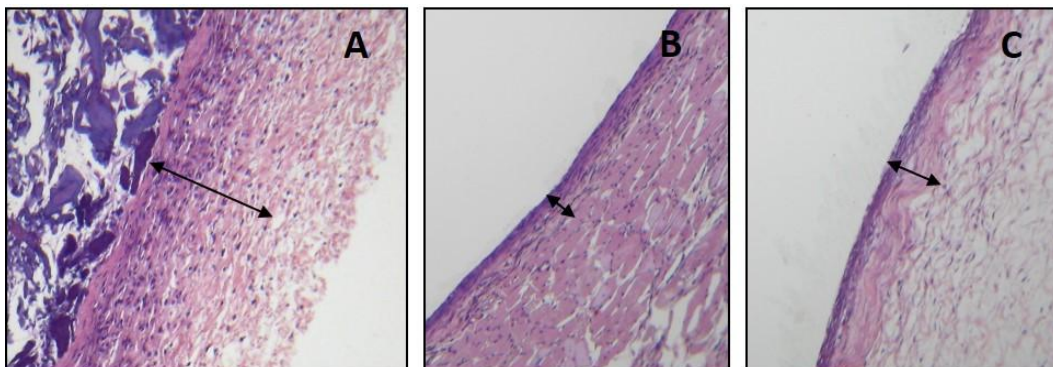
4.5.1.2 Quanto ao Tipo de Cápsula (Tecido Conjuntivo Reacional)

- a) Tecido de Granulação: Tecido conjuntivo com predomínio de celularidade (proliferação fibroblástica e células inflamatórias);
- b) Fibrosa Densa: Tecido conjuntivo com predomínio de fibras colágenas bem organizadas e ausência de celularidade;
- c) Intermediária: Tecido conjuntivo com presença de fibras colágenas e também com celularidade, principalmente fibroblastos.

4.5.1.3 Quanto à espessura da Cápsula

- a) Espessa (Figura 6A)
- b) Fina (Figura 6B)
- c) Intermediária (Figura 6C)

Figura 6 – Parâmetros adotados quanto à espessura de cápsula (HE – 10X).
A) Espessa; B) Fina; C) Intermediária.



5 RESULTADOS

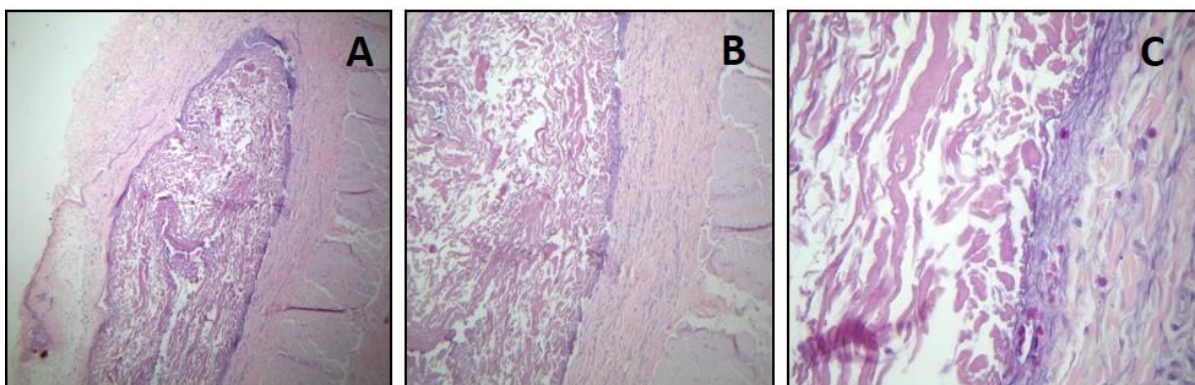
Após a análise descritiva de cada uma das amostras, os resultados serão expostos de acordo com os grupos e períodos experimentais.

5.1 MEMBRANA CONTROLE DE COLÁGENO

5.1.1 Análise Microscópica Descritiva no Período de 02 dias

Nas amostras deste período experimental foi possível visualizar as membranas implantadas íntegras e envoltas por um tecido conjuntivo reacional adjacente sem organização e bem celularizado (tecido de granulação) (Figura 7A). A distinção entre as fibras colágenas das membranas e das fibras do sítio receptor foi possível devido à sua morfologia (maiores e mais espessas quando comparadas às dos animais) e pela coloração (Figura 7B). O processo inflamatório misto presente no tecido de granulação apresentou-se leve/moderado (Figura 7C), composto predominantemente por plasmócitos e leucócitos polimorfonucleares (eosinófilos e neutrófilos). Houve neoformação de vasos sanguíneos em toda a extensão do tecido conjuntivo reacional. Nenhuma amostra apresentou macrófagos e células gigantes multinucleadas, nem sinais de necrose tecidual.

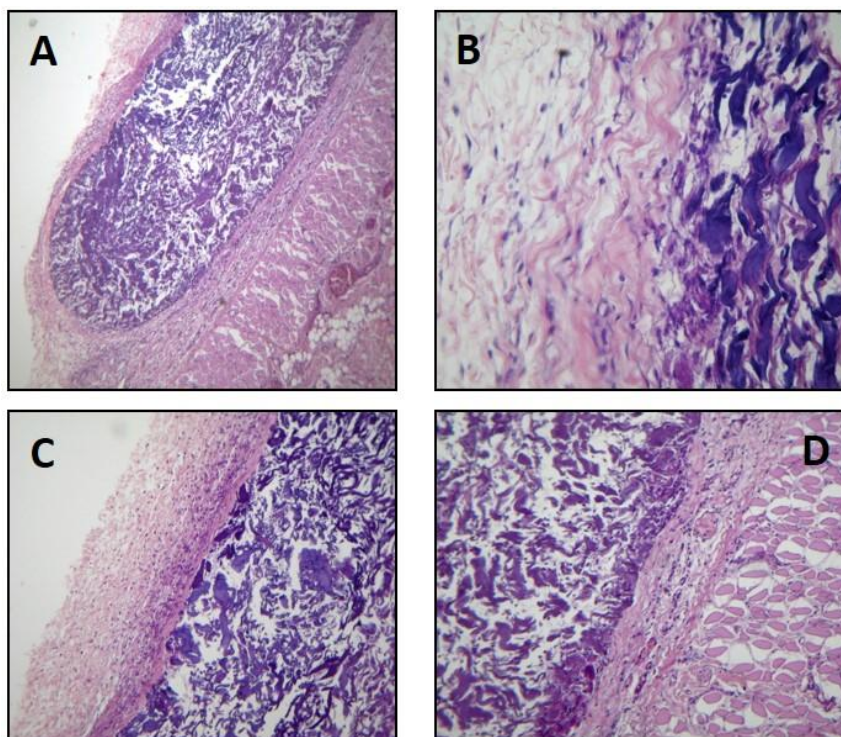
Figura 7 – Membrana controle de colágeno no período experimental de 02 dias (HE). A) Membrana íntegra envolta por tecido reacional (5X); B) Distinção entre as fibras colágenas da membrana e do tecido reacional (10X); C) Processo inflamatório misto leve presente no tecido de granulação circunjacente e neoformação de vasos sanguíneos (40X).



5.1.2 Análise Microscópica Descritiva no Período de 07 dias

A análise microscópica das amostras correspondentes a este período experimental permitiu a identificação das membranas implantadas com aparente integridade envoltas por um tecido conjuntivo reacional em processo de organização (Figura 8A). Na porção em contato com o músculo, as fibras colágenas estavam justapostas e organizadas (Figura 8D) em comparação com o restante do tecido conjuntivo reacional (Figura 8C). O processo inflamatório crônico presente mostrou-se escasso na grande maioria dos espécimes, ou leve com predominância de plasmócitos e linfócitos. A celularidade observada também ocorreu em razão da presença de um maior número de fibroblastos dispersos nas cápsulas (Figura 8B). Houve a neoformação de vasos sanguíneos distribuídos pelo tecido capsular. Não foram identificados macrófagos, células gigantes multinucleadas e quaisquer sinais de necrose tecidual.

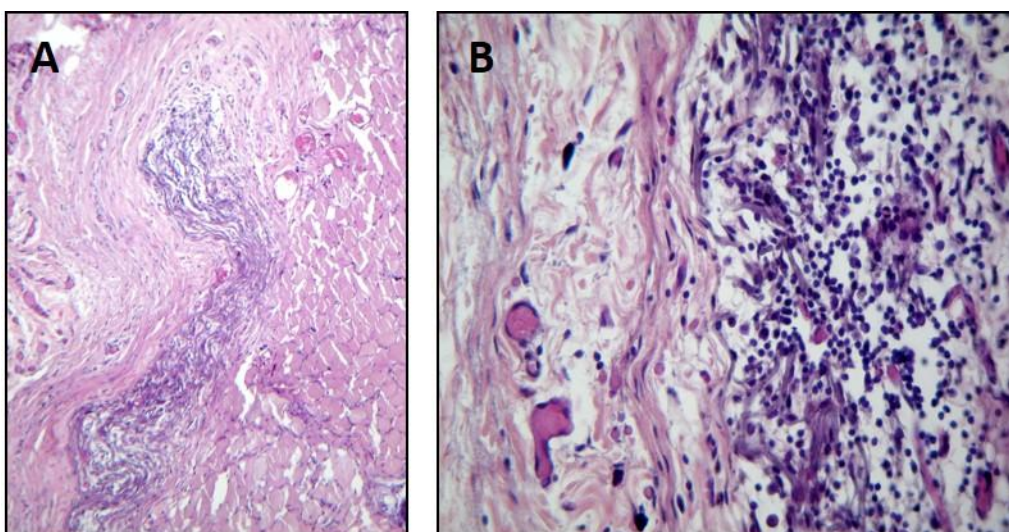
Figura 8 – Membrana controle de colágeno no período experimental de 07 dias (HE). A) Membrana envolta por tecido conjuntivo reacional (5X); B) Processo inflamatório crônico escasso, fibroblastos e tecido reacional em processo de organização: notar a formação e disposição das fibras colágenas adjacentes à membrana (40X); C) Tecido conjuntivo reacional externo (10X); D) Tecido conjuntivo reacional em contato com o tecido muscular (10X)



5.1.3 Análise Microscópica Descritiva no Período de 30 dias

Neste período experimental foi possível identificar nas amostras a presença das membranas implantadas com redução de tamanho e alterações de forma (Figura 9A), e com um tecido conjuntivo reacional integrando-se ao material implantado. Este tecido apresentou celularidade e fibras colágenas em organização; de modo que na porção em contato com o tecido muscular, mostrou-se fino, e na porção externa (contralateral ao músculo) com maior espessura. O processo inflamatório crônico presente, predominantemente composto por linfócitos, apresentou-se leve no tecido reacional e intenso sobre a membrana implantada (Figura 9B). Foram identificados macrófagos, células gigantes multinucleadas e neoformação de vasos sanguíneos. Nenhum sinal de necrose tecidual foi identificado.

Figura 9 - Membrana controle de colágeno no período experimental de 30 dias (HE). A) Membrana com redução de tamanho e alteração de forma (10X); B) Processo inflamatório crônico leve no tecido reacional e intenso sobre a membrana; possível identificar a neoformação de vasos sanguíneos (40X).



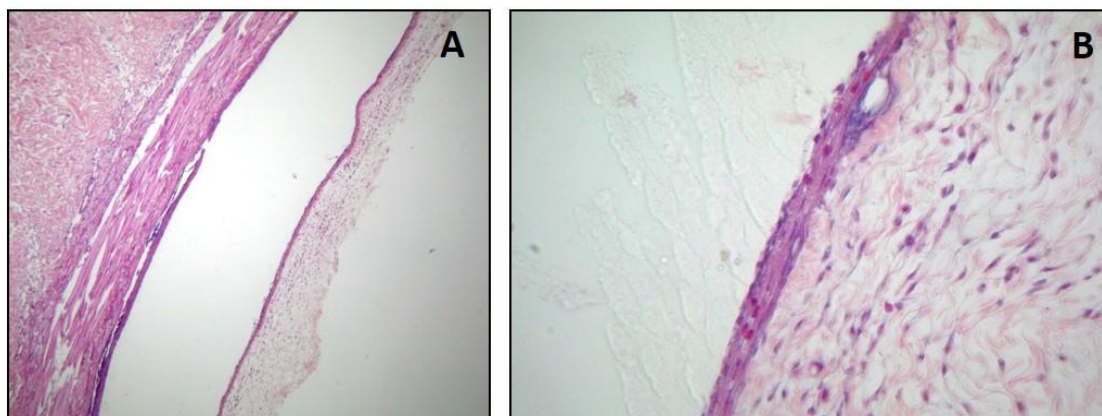
5.2 MEMBRANA CONTROLE DE PLGA

5.2.1 Análise Microscópica Descritiva no Período de 02 dias

Ao analisar microscopicamente as amostras deste grupo e período experimental, foram observadas cápsulas em processo de organização, circunscrevendo a região de implantação da membrana (Figura 10A). Estes tecidos capsulares compostos por

fibras colágenas curtas e descontínuas apresentaram um processo inflamatório misto, leve/moderado, e com predomínio de plasmócitos, linfócitos e eosinófilos (Figura 10B). Dentre as fibras colágenas e células inflamatórias presentes no tecido conjuntivo reacional, fibroblastos também foram identificados. O tecido em íntimo contato com a membrana íntegra ou fragmentada, condição esta observada na maioria das amostras, exibiu uma fina margem corada por hematoxilina e, logo abaixo, o tecido conjuntivo mostrou-se sugestivamente edemaciado (Figura 10B). Foram identificados macrófagos e neoformação de vasos sanguíneos em diferentes localidades dos tecidos capsulares, em contrapartida, a presença de células gigantes multinucleadas e necrose tecidual não foram verificadas.

Figura 10 - Membrana controle de PLGA no período experimental de 02 dias (HE). A) Região de implantação de membrana circunscrita por cápsula em processo de organização (10X); B) Cápsula com fibroblastos, fibras colágenas curtas e descontínuas e processo inflamatório misto moderado; possível identificar a presença da membrana fragmentada e em íntimo contato com a margem capsular corada por hematoxilina (40X).

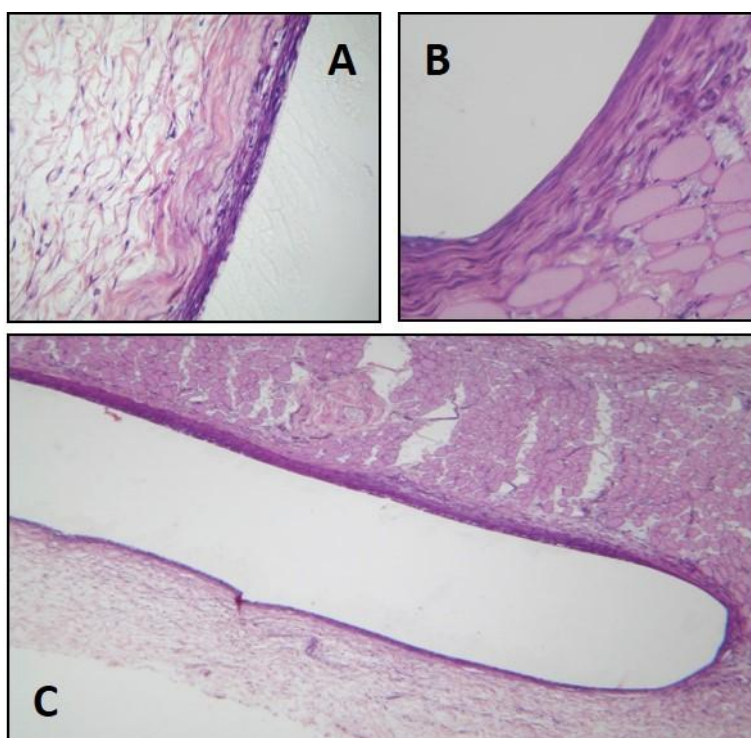


5.2.2 Análise Microscópica Descritiva no Período de 07 dias

Os resultados deste período experimental demonstraram a presença de cápsulas bem definidas e organizadas circunscrevendo a região de implantação das membranas (Figura 11C). As cápsulas de espessura intermediária à fina apresentaram-se, quanto ao tipo, “intermediárias”, exibindo fibras colágenas longas, justapostas e também fibroblastos (Figuras 11A e 11B). O tecido capsular em íntimo contato com a região de implantação ou com os fragmentos de membrana presentes, demonstrou uma margem corada por hematoxilina. O processo inflamatório evidente apenas em algumas amostras apresentou-se crônico e leve. A

neoformação de vasos sanguíneos ocorreu de forma discreta em regiões aleatórias dos tecidos capsulares. Células gigantes multinucleadas e macrófagos não foram identificados, bem como quaisquer sinais de necrose tecidual.

Figura 11 - Membrana controle de PLGA no período experimental de 07 dias (HE). A e B) Cápsula bem definida e organizada circunscrevendo a região de implantação das membranas com ausência de processo inflamatório (40X). C) Região de implantação da membrana envolta por cápsula (5X).

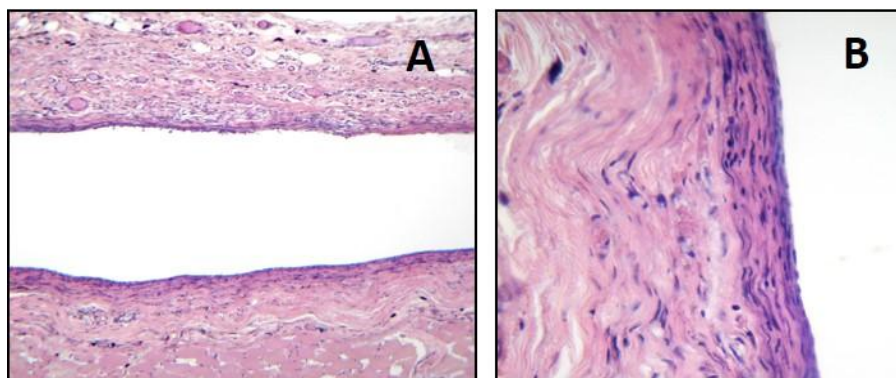


5.2.3 Análise Microscópica Descritiva no Período de 30 dias

Neste período experimental, as membranas implantadas apresentaram-se fragmentadas e dispersas na região de implantação ou com apenas algumas porções presentes em íntimo contato com o tecido capsular formado. Estas cápsulas de espessura intermediária à fina exibiram definição e organização, principalmente na região em contato com o tecido muscular (Figura 12A). Quanto ao tipo, mostraram-se “intermediárias” na maioria de sua extensão enquanto suas extremidades, em geral, apresentaram-se “fibrosas densas” (Figura 12B). O processo inflamatório crônico presente nas regiões capsulares manifestou-se de forma escassa ou leve, com predominância de linfócitos, principalmente nas porções

capsulares externas (lado contralateral ao músculo). Em algumas amostras, verificou-se a presença de macrófagos dispersos na cápsula, porém células gigantes multinucleadas não foram identificadas. Houve a neoformação de vasos sanguíneos e sinais de necrose tecidual não estavam presentes.

Figura 12 - Membrana controle de PLGA no período experimental de 30 dias (HE). A) Região de implantação da membrana com tecido capsular adjacente (10X); B) Porção capsular com fibras colágenas organizadas e bem dispostas; presença de celularidade por fibroblastos e processo inflamatório crônico escasso (40X).



5.3 MEMBRANA TESTE DE PLGA + LACTAMA TIPO I

5.3.1 Análise Microscópica Descritiva no Período de 02 dias

Nestas amostras, as membranas implantadas apresentaram-se fragmentadas e em íntimo contato com tecidos capsulares ainda em processo de definição. Estes tecidos evidenciaram um processo inflamatório misto, leve/moderado, com um infiltrado composto por linfócitos, plasmócitos e eosinófilos. Observou-se que as regiões capsulares em contato com o tecido muscular apresentaram fibras colágenas dispostas de forma mais organizada e com maior expressividade de fibroblastos que a porção externa da cápsula, com suas fibras colágenas fragmentadas e descontínuas e maior quantidade de células inflamatórias (tecido de granulação). A presença de margens coradas mais intensamente por hematoxilina, presentes nos tecidos capsulares adjacentes à região de implantação das membranas também foram observadas. Houve discreta neoformação de vasos sanguíneos no tecido reacional e a presença de macrófagos, células gigantes multinucleadas e sinais de necrose tecidual não foram constatados.

5.3.2 Análise Microscópica Descritiva no Período de 07 dias

Observou-se neste período experimental que, em algumas amostras, as membranas não se mantiveram no formato em que foram inicialmente implantadas. No momento das biópsias, notou-se que os discos de membrana adquiriram um formato cilíndrico, traduzindo-se em tecidos capsulares reacionais de formato circular. Independentemente do formato, as cápsulas mostraram-se definidas e bem organizadas, com espessura intermediária, ou em processo de definição e relativa organização. Quanto ao tipo, as cápsulas apresentaram-se “intermediárias”, com fibras colágenas justapostas e presença de fibroblastos, e em algumas regiões, como nas extremidades, “fibrosas densas”. O processo inflamatório crônico, leve e com predominância de linfócitos e plasmócitos, foi principalmente identificado nas amostras que apresentaram cápsulas ainda em processo de definição. A presença de uma matriz proteica amorfa foi constatada em alguns espécimes, geralmente em íntimo contato com a cápsula adjacente à região de implantação da membrana, na presença desta ou não, ou entre os fragmentos do material e a cápsula. Nos espécimes em que houve a mudança de conformação da membrana para o formato cilíndrico, a invaginação tecidual foi verificada, e este tecido apresentou-se como tecido de granulação. A neoformação de vasos sanguíneos foi observada principalmente no tecido conjuntivo adjacente a cápsula. Duas das amostras apresentaram macrófagos, enquanto células gigantes multinucleadas e sinais de necrose tecidual não estavam presentes.

5.3.3 Análise Microscópica Descritiva no Período de 30 dias

Neste período experimental, houve a formação de cápsulas definidas e bem organizadas em todas as amostras e apenas uma não apresentou a conformação circular. Os tecidos capsulares de espessura intermediária à fina, quanto ao seu tipo, mostraram-se “intermediárias”. Algumas regiões deste tecido conjuntivo reacional, principalmente próximo à invaginação tecidual (tecido de granulação), apresentaram um processo inflamatório crônico, leve e com predomínio de linfócitos. Apenas fragmentos das membranas implantadas foram verificados nas amostras, alguns dispersos na região de implantação e outros em íntimo contato com as cápsulas. A presença da matriz proteica amorfa foi identificada em alguns espécimes, ora em

íntimo contato com a cápsula, ora com os fragmentos da membrana. Houve a neoformação de vasos sanguíneos nas proximidades da cápsula e não foi constatada a presença de macrófagos, células gigantes multinucleadas e quaisquer sinais de necrose tecidual.

5.4 MEMBRANA TESTE DE PLGA + LACTAMA TIPO II

5.4.1 Análise Microscópica Descritiva no Período de 02 dias

A análise microscópica expôs que todas as membranas implantadas sofreram alterações de forma no tecido subcutâneo dos animais, o que resultou na conformação arredondada das cápsulas ainda em definição (Figura 13A). Este tecido capsular apresentou-se como tecido de granulação com um processo inflamatório misto, moderado e com predominância de linfócitos, plasmócitos e leucócitos polimorfonucleares (eosinófilos e neutrófilos), principalmente na porção externa das cápsulas (Figura 13B). Um intenso infiltrado inflamatório e edema tecidual foram observados nas proximidades da invaginação tecidual presente em algumas amostras. As membranas apresentaram-se em íntimo contato com a cápsula adjacente (Figura 13B). Houve neoformação de vasos sanguíneos no tecido reacional e não foram identificados macrófagos, células gigantes multinucleadas e quaisquer sinais de necrose tecidual.

5.4.2 Análise Microscópica Descritiva no Período de 07 dias

As amostras deste período experimental apresentaram alterações de forma das membranas, e como consequência, os tecidos reacionais capsulares formados adquiriram diferentes formatos, conforme as membranas. Em apenas uma amostra, o material se manteve como inicialmente implantado. Nos espécimes em que as membranas implantadas foram constatadas, estas se mostraram fragmentadas e em íntimo contato com as cápsulas adjacentes ou com o tecido invaginado, devido à mudança de conformação do material. As cápsulas presentes e definidas exibiram maior organização tecidual, espessuras intermediárias à finas e quanto ao tipo mostraram-se “intermediárias” e, em algumas regiões, “fibrosas densas”. Verificou-

se a presença da matriz proteica amorfa nas porções das cápsulas em contato com as regiões de implantação das membranas. O tecido que sofreu invaginação tecidual, caracterizou-se como tecido de granulação e, em uma amostra, verificou-se maior organização tecidual, com a presença de fibroblastos e fibras colágenas justapostas. O processo inflamatório, quando presente, apresentou-se crônico e leve. A neoformação de vasos sanguíneos ocorreu em três amostras, e estavam localizados no tecido conjuntivo adjacente às cápsulas. Macrófagos, células gigantes multinucleadas e sinais de necrose tecidual não foram identificados.

5.4.3 Análise Microscópica Descritiva no Período de 30 dias

Neste período experimental, as membranas implantadas mostraram-se fragmentadas e em íntimo contato com os tecidos capsulares, ou dispersas na região de implantação. Em apenas uma amostra não houve mudança conformacional da membrana. As cápsulas formadas apresentaram-se todas definidas e algumas mais organizadas que outras. Exibiram fina espessura e, quanto ao tipo, mostraram-se “intermediárias”, com fibroblastos e fibras colágenas justapostas, e algumas regiões com “fibras densas”, sem a presença de fibroblastos. Verificou-se a presença da matriz proteica amorfa na porção capsular voltada para a região de implantação do material. O processo inflamatório crônico composto principalmente por linfócitos foi constatado apenas em algumas amostras nas porções de invaginação tecidual (tecido de granulação). Houve a neoformação de vasos sanguíneos nos espécimes, e em apenas uma delas, células gigantes multinucleadas foram identificadas. Macrófagos e necrose tecidual não estavam presentes.

5.5 MEMBRANA TESTE DE PLGA + LACTAMA TIPO III

5.5.1 Análise Microscópica Descritiva no Período de 02 dias

Através da análise microscópica das amostras neste período experimental, observou-se que em apenas uma delas não houve alteração conformacional da membrana implantada. As membranas presentes mostraram-se, na maioria dos

espécimes, íntegras e em íntimo contato com o tecido reacional ou então, fragmentadas. As cápsulas adjacentes em processo de definição apresentaram fibras colágenas dispostas de forma mais organizada na porção em contato com o músculo em comparação com a porção externa da cápsula, que evidenciou um tecido de granulação. O processo inflamatório misto identificado principalmente no tecido de granulação apresentou-se leve/moderado, com quantidades equilibradas de plasmócitos, linfócitos e leucócitos polimorfonucleares (eosinófilos e neutrófilos). Houve a neoformação de vasos sanguíneos nas proximidades do tecido reacional. A presença de macrófagos, células gigantes multinucleadas e necrose tecidual não foram constatadas.

5.5.2 Análise Microscópica Descritiva no Período de 07 dias

Neste período experimental as amostras apresentaram alterações de forma da membrana implantada e cápsulas de formato circular (Figura 13C). As membranas, íntegras ou fragmentadas, estavam em íntimo contato com a cápsula e também com o tecido invaginado na região de implantação de algumas amostras, caracterizado como tecido de granulação. As cápsulas circunjacentes, definidas, de espessuras intermediárias à finas exibiram-se, quanto ao tipo, “intermediárias”, com regiões “fibrosas densas” e organização tecidual (Figuras 13D e 13F). Observou-se a presença da matriz proteica amorfa na porção das cápsulas em contato com a região de implantação da membrana (Figura 13E). O processo inflamatório crônico mostrou-se leve/moderado. Houve a neoformação de vasos sanguíneos em todas as amostras enquanto, macrófagos, células gigantes multinucleadas e sinais de necrose tecidual não foram identificados.

5.5.3 Análise Microscópica Descritiva no Período de 30 dias

Notou-se, neste período experimental, que apenas algumas amostras apresentaram mudanças conformacionais das membranas implantadas. Estas, por sua vez, estavam fragmentadas e em íntimo contato com a cápsula adjacente, ou dispersas na região de implantação. As cápsulas de espessuras intermediárias à finas acompanharam as mudanças conformacionais das membranas, e mostraram-se definidas e bem organizadas, principalmente nas porções em contato com o

tecido muscular. Quanto ao tipo, mostraram-se “intermediárias”, com fibras colágenas justapostas e fibroblastos. A presença de processo inflamatório crônico, leve e predominantemente composto por linfócitos foi identificado. Em uma das amostras não havia processo inflamatório. A neoformação de vasos sanguíneos ocorreu em todos os espécimes. Macrófagos estavam presentes em uma amostra enquanto células gigantes multinucleadas não foram identificadas, bem como quaisquer sinais de necrose tecidual.

5.6 MEMBRANA TESTE DE PLGA + LACTAMA TIPO IV

5.6.1 Análise Microscópica Descritiva no Período de 02 dias

As amostras deste período experimental, em sua maioria, evidenciaram a mudança conformacional das membranas implantadas e como consequência, a formação de cápsulas circulares. A invaginação tecidual de algumas amostras gerou um infiltrado inflamatório intenso nesta região, principalmente de leucócitos polimorfonucleares (eosinófilos e neutrófilos). As membranas íntegras ou em fragmentos, estavam em íntimo contato com o tecido conjuntivo reacional adjacente. Estas cápsulas em processos de definição caracterizaram-se como tecido de granulação, porém, em algumas áreas, notou-se a organização de fibras colágenas. Os espécimes apresentaram um processo inflamatório misto composto por infiltrado de intensidade moderada. Houve a neoformação de vasos sanguíneos no tecido reacional. Macrófagos, células gigantes multinucleadas e sinais de necrose tecidual não foram identificados.

5.6.2 Análise Microscópica Descritiva no Período de 07 dias

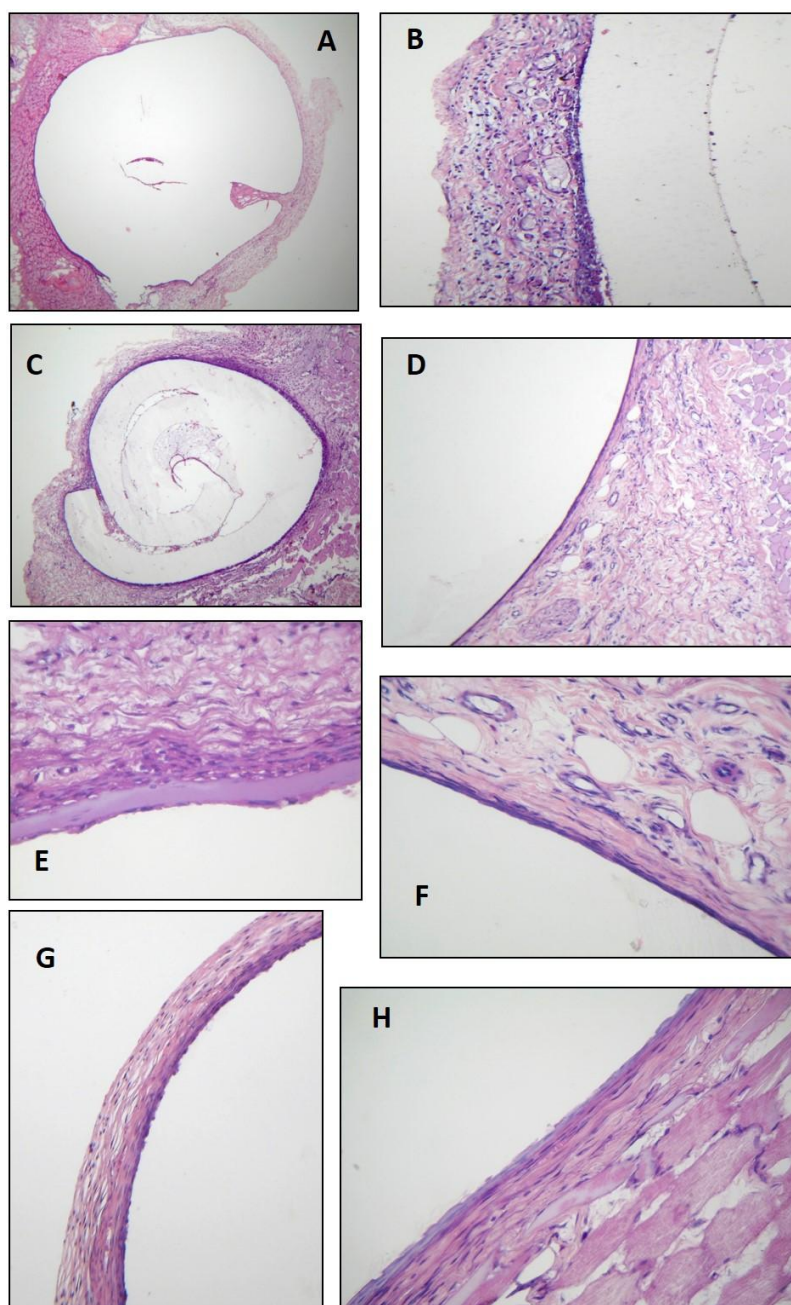
Neste período experimental, apenas uma das amostras não evidenciou a alteração conformacional da membrana implantada. As cápsulas estruturadas de acordo com a forma adquirida nos tecidos subcutâneos dos animais mostraram-se definidas, de espessuras intermediárias à finas e, quanto ao tipo, apresentaram-se “intermediárias”. Notou-se a presença de uma matriz proteica amorfa em contato com os tecidos capsulares e com o tecido que sofreu invaginação em alguns

espécimes. As membranas estavam fragmentadas e em íntimo contato com a cápsula ou dispersas na região de implantação. O processo inflamatório crônico apresentou-se leve. Houve a identificação de macrófagos em duas amostras e neoformação de vasos sanguíneos em todas. A presença células gigantes multinucleadas não foi constatada bem como, quaisquer sinais de necrose tecidual.

5.6.3 Análise Microscópica Descritiva no Período de 30 dias

A análise microscópica destes espécimes evidenciou a formação de cápsulas circulares, devido às mudanças conformacionais das membranas implantadas, estas, por sua vez, fragmentadas e localizadas em íntimo contato com as cápsulas, ou dispersas na região de implantação. As cápsulas formadas, bem definidas e organizadas, de espessuras intermediárias à finas, apresentaram-se “intermediárias”, com fibras colágenas justapostas e fibroblastos (Figura 13G), e também porções “fibrosas densas” (Figura 13H). Notou-se um processo inflamatório crônico, leve e composto principalmente por linfócitos. Houve invaginação tecidual em todas as amostras e matriz proteica amorfa localizada em suas proximidades. A neoformação de vasos sanguíneos ocorreu em todas as amostras e macrófagos foram identificados em duas. Sinais de necrose e células gigantes multinucleadas não estavam presentes.

Figura 13 – Membranas testes de PLGA + LACTAMAS nos períodos experimentais de 02 dias (A e B), 07 dias (C, D, E e F) e 30 dias (G e H) - (HE). A) Formação de cápsula arredondada devido à mudança conformacional da membrana no tecido subcutâneo do animal (Lactama tipo II – 5X); B) Tecido capsular caracterizado como de granulação; presença de processo inflamatório misto moderado. É possível observar a membrana em íntimo contato com o tecido capsular adjacente (Lactama tipo II – 10X); C) Mudança conformacional da membrana com fragmentos ainda presentes (Lactama tipo III – 5X); D) Maior aumento (10X) demonstrando cápsula de fina espessura; E) Matriz proteica amorfa em contato com a cápsula (40X); F) Aumento de 40X relativo à figura D, que exhibe a organização das fibras colágenas da cápsula fina; G) Padrão intermediário demonstrado na cápsula fina (Lactama tipo IV – 40X); H) Região da cápsula adquirindo o padrão fibrosa densa (escassos fibroblastos) (40X).



5.7 MEMBRANA TESTE DE PLGA + NPAg TIPO 1

5.7.1 Análise Microscópica Descritiva no Período de 02 dias

Ao analisar microscopicamente as amostras deste período experimental, nos espécimes em que a presença das membranas foi constatada, mostraram-se dispersas na região de implantação ou em íntimo contato com os tecidos conjuntivos reacionais adjacentes. Estas cápsulas em processo de definição (Figura 14A), apenas com algumas áreas de tecido organizado (Figura 14B), apresentaram um processo inflamatório misto, moderado/intenso e com predominância de linfócitos e leucócitos polimorfonucleares (eosinófilos e neutrófilos) (Figura 14C). As cápsulas caracterizaram-se como tecido de granulação, principalmente nas porções externas, exibindo um tecido frouxo e sugestivo edema tecidual. Nas porções em contato com o tecido muscular, apresentaram um tecido mais organizado com fibras colágenas justapostas. Houve discreta neoformação de vasos sanguíneos na região de tecido reacional. Macrófagos, células gigantes multinucleadas e sinais de necrose tecidual não foram identificados.

5.7.2 Análise Microscópica Descritiva no Período de 07 dias

Observou-se neste período experimental que as membranas implantadas estavam fragmentadas, dispersas na região de implantação ou em íntimo contato com as cápsulas adjacentes. As cápsulas formadas de modo a circunscrever o material, apresentaram definição e organização tecidual tendo em vista que, quanto ao tipo, exibiram-se “intermediárias”, com porções teciduais (extremidades) “fibrosas densas”. A espessura destes tecidos conjuntivos reacionais variou de intermediária à fina. Notou-se a presença de um processo inflamatório crônico leve/moderado. Apenas uma das amostras apresentou macrófagos e células gigantes multinucleadas. Houve a neoformação de vasos sanguíneos geralmente no tecido conjuntivo adjacente às cápsulas e não foram observados sinais de necrose tecidual.

5.7.3 Análise Microscópica Descritiva no Período de 30 dias

Nestas amostras, as membranas implantadas evidenciaram fragmentação, localizadas em íntimo contato com os tecidos capsulares adjacentes ou dispersas nas regiões de implantação. As cápsulas presentes, definidas e bem organizadas, exibiram espessura intermediária à fina e quanto ao tipo, mostraram-se “intermediárias” (Figura 14G). Verificou-se que as porções capsulares em contato com o tecido muscular apresentaram-se “fibrosas densas”. O infiltrado de células, provenientes de um processo inflamatório crônico, reduziu-se a escasso ou apresentou-se leve, com o predomínio de linfócitos (Figura 14H). A neoformação de vasos sanguíneos foi constatada nas amostras (Figura 14H) e em dois espécimes, identificou-se a presença de células gigantes multinucleadas nas proximidades dos tecidos capsulares (Figura 14G). Macrófagos e necrose tecidual não estavam presentes.

5.8 MEMBRANA TESTE DE PLGA + NPAg TIPO 2

5.8.1 Análise Microscópica Descritiva no Período de 02 dias

Neste período experimental, a análise microscópica evidenciou a presença das membranas implantadas fragmentadas e dispersas nas regiões de implantação, ou em íntimo contato com os tecidos reacionais adjacentes. As cápsulas em processo de definição e ainda desorganizadas caracterizaram-se como tecido de granulação e apresentaram-se sugestivamente edemaciadas. Notou-se um processo inflamatório misto, moderado/intenso e com predominância de plasmócitos e eosinófilos. A neoformação de vasos sanguíneos verificada apenas em algumas amostras foi discreta. Macrófagos, células gigantes multinucleadas e sinais de necrose tecidual não foram identificados.

5.8.2 Análise Microscópica Descritiva no Período de 07 dias

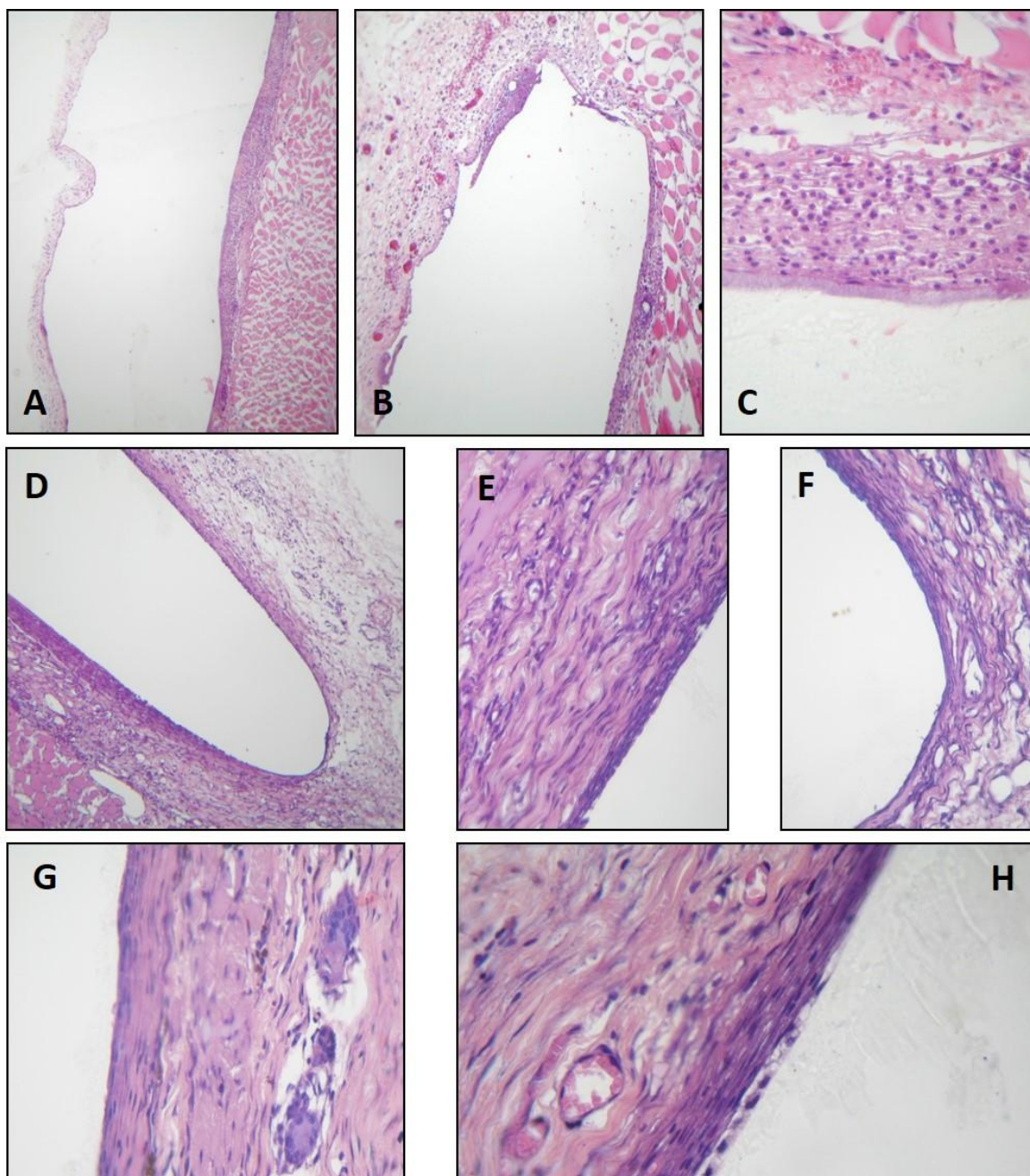
Notou-se, nas amostras deste período experimental, que as membranas implantadas apresentaram-se em fragmentos dispersos na região de implantação ou

em íntimo contato com as cápsulas circunjacentes. As cápsulas formadas, definidas e mais organizadas na porção tecidual em contato com o músculo, exibiram espessura intermediária, tornando-se mais finas nas extremidades (Figuras 14D). Quanto ao tipo, mostraram-se “intermediárias”, com fibras colágenas justapostas e presença abundante de fibroblastos (Figura 14E). Porções teciduais capsulares “fibrosas densas” também estavam presentes (Figura 14F). O processo inflamatório crônico, quando presente, apresentou-se leve. Houve a neoformação de vasos sanguíneos e a presença de macrófagos foi constatada em apenas uma amostra. Necrose tecidual e células gigantes multinucleadas não foram identificadas.

5.8.3 Análise Microscópica Descritiva no Período de 30 dias

As amostras deste período experimental apresentaram fragmentos das membranas implantadas em íntimo contato com os tecidos capsulares adjacentes, ou dispersos na região de implantação. As cápsulas formadas, definidas e bem organizadas, exibiram espessura intermediária à fina, e quanto ao tipo, mostraram-se “intermediárias”. Verificou-se que diversas porções capsulares em todas as amostras apresentaram-se “fibrosas densas”, principalmente nas extremidades. O processo inflamatório não foi identificado em nenhum dos espécimes. Houve discreta neoformação de vasos sanguíneos. Macrófagos, células gigantes multinucleadas e sinais de necrose tecidual não estavam presentes.

Figura 14 - Membranas testes de PLGA + NPAg nos períodos experimentais de 02 dias (A, B e C), 07 dias (D, E e F) e 30 dias (G e H) - (HE). A) Região de implantação da membrana e cápsula adjacente (NPAg tipo 1 – 5X); B) Maior aumento (10X) exibindo cápsula em processo de organização (sem definição precisa); C) Membrana em íntimo contato com a cápsula composta por tecido de granulação. É possível observar processo inflamatório misto intenso (40X). D) Região de implantação da membrana e cápsula adjacente: notar a diminuição da espessura capsular em direção à extremidade (NPAg tipo 2 - 10X); E) Porção capsular padrão intermediário (40X); F) Extremidade da cápsula padrão fibrosa densa. G) Cápsula com padrão tecidual intermediário e presença de células gigantes multinucleadas no tecido conjuntivo adjacente (NPAg tipo 1 – 40X); H) Processo inflamatório crônico leve na porção capsular de padrão intermediário e neoformação de vasos sanguíneos (40X).



6 DISCUSSÃO

Existem inúmeros tipos de membranas que são utilizadas nas técnicas de RTG e ROG como barreiras físicas e com o intuito de reconstrução tecidual. Neste cenário, as características ideais das membranas são: biocompatibilidade (BLACK, 2005; COSTA; HEBLING; SOUZA, 2005); adaptação adequada à raiz, ao implante dentário ou ao tecido ósseo (vedamento); rigidez apropriada para atuar como mantenedora de espaço; permeabilidade para moléculas; oclusivas para células; estabilidade; biodegradação controlada, para um tempo de atuação apropriado; permitir a incorporação de aditivos como antimicrobianos e bioestimuladores (RETZEPI; DONOS, 2010), e facilidade de manejo clínico pelo profissional.

Apesar de não possuir todas as características ideais (apresentam propriedades mecânicas desfavoráveis para manutenção do espaço, rápida biodegradação e impossibilidade de exposição ao meio bucal) as membranas de colágeno tipo I e tipo I e III, são consideradas padrão-ouro para utilização clínica. Assim, buscou-se uma membrana biocompatível, bioativa (que permita a incorporação de antibiofilmes), possuidora de melhores propriedades mecânicas e com biodegradação mais lenta, para a utilização em técnicas reconstrutivas teciduais.

Primordialmente a membrana, quando em contato com os tecidos vivos, deve exercer suas funções específicas e interagir com respostas apropriadas dos hospedeiros, sem lhes causar danos ou prejuízo (BLACK, 2005; COSTA; HEBLING; SOUZA, 2005). Corroborando com tais conceitos de biocompatibilidade, no presente estudo foram avaliados os seguintes eventos histológicos, perante a implantação das membranas (colágeno, PLGA e PLGA associada a antibiofilmes) em tecido subcutâneo de ratos: a presença de processo inflamatório, sua classificação (agudo, crônico ou misto), magnitude (escasso, leve, moderado ou intenso) e tipo(s) celular(es) predominante(s); a presença de cápsula de tecido conjuntivo (área reacional adjacente ao material implantado), seu tipo (tecido de granulação, fibrosa densa ou intermediária) e, quando bem definida, sua espessura (espessa, fina ou intermediária); a presença ou ausência de células gigantes multinucleadas, macrófagos, necrose e neoformação de vasos sanguíneos.

Neste contexto, um estudo prévio deste grupo de pesquisa avaliou *in vitro* a

capacidade de inibição de biofilme, a viabilidade e adesão celular nas membranas de PLGA associadas à hidroxiapatita (HA) incorporadas com lactamas e NPAG (PEREIRA NETO, 2013). Os testes de toxicidade em presença de células humanas mostraram que as lactamas e as NPAG apresentaram alto índice de viabilidade celular, para os principais tipos celulares que compõem o periodonto de sustentação. Estes índices foram superiores ao preconizado para a aprovação em uso clínico, indicando que as membranas de PLGA + HA incorporadas com lactamas e NPAG apresentam potencial compatível para a reconstrução tecidual. Sugeriu-se, então, o desenvolvimento de mais estudos a fim de avaliar seu benefício clínico.

Perante o ineditismo da incorporação de lactamas e NPAG às membranas de PLGA para RTG e ROG em estudos *in vivo*, impossibilitou-se a confrontação dos resultados obtidos com os da literatura correlata. Portanto, realizar-se-á uma comparação das membranas testes com as membranas controle (padrão-ouro de colágeno e PLGA sem antibiofilmes incorporados) nos decorridos períodos experimentais. Para tais comparações, optou-se por agrupar os 04 tipos de membranas testes contendo lactamas pela não observância de diferenças relevantes entre um tipo e outro nas análises descritivas realizadas. Devido ao mesmo motivo, os 02 tipos de NPAG também foram agrupados.

O número de amostras analisadas descritivamente pertencentes aos períodos experimentais de alguns grupos não foi o mesmo proposto inicialmente, devido à impossibilidade de análise histológica destes espécimes. Do total de 180 amostras envolvendo todos os períodos e grupos experimentais (controles e testes), 11 não foram consideradas para compor os resultados.

Dentro dos critérios de biocompatibilidade adotados (BORTOLUZZI, 2005; COSTA; HEBLING; SOUZA, 2005) foram definidos como parâmetros de excelência: redução ou ausência de processo inflamatório no decorrer dos períodos experimentais; proliferação e maturação de fibroblastos e formação de cápsula fibrosa densa e fina; e ausência de necrose tecidual. Salienta-se que em nenhuma das amostras dos grupos controles e testes, nos períodos experimentais avaliados, foram verificados quaisquer sinais de necrose tecidual.

Nas membranas controle de colágeno (padrão-ouro), foi observada microscopicamente a presença do material implantado nos 03 tempos experimentais, porém no período de 30 dias as membranas apresentaram-se com redução de tamanho e alterações de forma, mas com todo o local de implantação

preenchido pela mesma. Este fato justifica-se pela reconhecida rápida biodegradação do material (BUNYARATAVEJ; WANG, 2001). No período experimental de 02 dias, o tecido reacional adjacente caracterizou-se como de granulação (sem organização capsular), com presença de processo inflamatório leve/moderado e misto. No decorrer de 07 dias, evidenciou-se tecido conjuntivo reacional em processo de organização (maior número de fibroblastos e fibras colágenas), enquanto o processo inflamatório apresentou-se leve/escasso e crônico. No período experimental de 30 dias o tecido conjuntivo apresentou-se mais definido e organizado, com parte de suas fibras colágenas permeando a membrana. O processo inflamatório crônico (composto predominantemente por linfócitos) foi leve no tecido reacional e intenso sobre a membrana implantada, onde também foi possível observar a maior presença de macrófagos, células gigantes multinucleadas e neoformação de vasos sanguíneos. Uma plausível explicação para o intenso processo inflamatório sobre a membrana é uma reação imunológica antígeno-anticorpo, pela implantação do material xenógeno.

As membranas controle de PLGA, nos 03 períodos experimentais, apresentavam-se ainda macroscopicamente visíveis e com sua conformação estrutural mantida, mas microscopicamente fragmentadas e dispersas na região de implantação ou com apenas algumas porções presentes em íntimo contato com o tecido reacional capsular formado. O mesmo ocorreu com as membranas de PLGA associadas aos antibiofilmes, possivelmente devido à ação de solventes orgânicos durante o processamento histológico ou artefato de técnica. Em todos os períodos experimentais o tecido reacional em íntimo contato com a região de implantação da membrana exibiu uma fina margem corada por hematoxilina. Esta coloração acidofílica fundamenta-se pelo ambiente ácido promovido pela degradação via hidrólise do PLGA (queda do pH). No período de 02 dias, foram observadas cápsulas compostas por tecido de granulação, com um processo inflamatório leve/moderado, misto, e presença de fibroblastos. Foram identificados macrófagos e neoformação de vasos sanguíneos em diferentes localidades dos tecidos capsulares. Em 07 dias, as cápsulas exibiram-se bem definidas e organizadas, com espessura intermediária à fina. Evidenciou-se processo inflamatório em apenas algumas amostras e este se apresentou leve e crônico. No decorrer de 30 dias, de forma semelhante às membranas do período experimental de 07 dias, as cápsulas exibiram definição e organização, com porções fibrosas densas e espessura

intermediária a fina, característica de uma resposta favorável quanto à biocompatibilidade.

O processo inflamatório crônico presente nas regiões capsulares manifestou-se de forma escassa ou leve, contido principalmente nas porções capsulares externas (lado contralateral ao músculo). Em algumas amostras, verificou-se a presença de macrófagos dispersos na cápsula. Tanto nas membranas de colágeno quanto nas de PLGA, observou-se que a porção capsular em contato com o tecido muscular mostrou maior ou mais rápida organização tecidual (presença de fibroblastos e justaposição de fibras colágenas) e diminuição da resposta inflamatória, em comparação com a porção contralateral.

Na maioria das amostras correspondentes às membranas testes de PLGA associadas às lactamas, em todos os períodos experimentais, as membranas não se mantiveram no formato em que foram inicialmente implantadas. No momento das biópsias, notou-se que os discos de membrana (inicialmente circulares e planos) adquiriram um formato cilíndrico no tecido subcutâneo dos animais, traduzindo-se em tecidos capsulares reacionais de formato arredondado. Esta peculiaridade 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). Devido a esta mudança conformacional, em diversas amostras, observou-se uma invaginação tecidual para o interior deste cilindro, caracterizando-se histologicamente como um tecido de granulação. No período experimental de 02 dias, observou-se que a cápsula em contato com o tecido muscular apresentou fibras colágenas dispostas de forma mais organizada e com maior expressividade de fibroblastos que a porção externa, que exibiu um tecido de granulação, com um processo inflamatório leve/moderado e misto. Aos 07 dias, as cápsulas apresentaram-se definidas e bem organizadas, com espessura intermediária. O processo inflamatório crônico, quando presente, mostrou-se leve e a neoformação de vasos sanguíneos foi observada principalmente no tecido conjuntivo adjacente a cápsula. A presença de uma matriz proteica amorfa foi constatada em alguns espécimes, geralmente em íntimo contato com a cápsula adjacente à região de implantação da membrana. Quatro das amostras apresentaram macrófagos; sua identificação, considerando-se também os outros grupos e períodos experimentais, foi dificultada em decorrência da espessura dos cortes histológicos, apesar da padronização para a coloração HE (5 µm). Em 30 dias, identificou-se cápsulas

definidas e bem organizadas em todas as amostras. Os tecidos capsulares de espessura intermediária à fina mostraram-se fibrosos densos em algumas regiões da cápsula e o processo inflamatório crônico presente reduziu-se a escasso, com neoformação de vasos sanguíneos nas proximidades da cápsula. Notou-se a presença da matriz proteica amorfa em algumas amostras. Apenas uma delas apresentou células gigantes multinucleadas e macrófagos estavam presentes em três.

No período experimental de 02 dias, as membranas testes de PLGA associadas às NPAg apresentaram um tecido de granulação adjacente à região de implantação da membrana. As porções em contato com o tecido muscular apresentaram um tecido mais organizado com fibras colágenas justapostas. Observou-se um processo inflamatório moderado/intenso e misto, com discreta neoformação de vasos sanguíneos na região de tecido reacional. Aos 07 dias, as cápsulas se apresentaram definidas, organizadas e de espessura intermediária, com as extremidades mais finas e fibrosas densas. O processo inflamatório crônico, quando presente, apresentou-se leve, com neoformação de vasos sanguíneos. Apenas uma das amostras apresentou macrófagos e células gigantes multinucleadas. Com 30 dias, as cápsulas presentes, definidas e bem organizadas, exibiram espessura intermediária à fina e com porções mais fibrosas densas, quando em contato com o tecido muscular. O processo inflamatório crônico apresentou-se leve ou reduziu-se a escasso, com neoformação de vasos sanguíneos. Foram identificadas células gigantes multinucleadas nas proximidades dos tecidos capsulares em duas amostras.

Em síntese, as membranas controle de colágeno apresentaram integração tecidual precoce, sem sinais de uma cápsula fibrosa bem definida como nas amostras de PLGA; fato que, assim como a evidência de um infiltrado inflamatório mais intenso, leva a crer que a reação imunológica mais exacerbada pode estar relacionada à absorção acelerada deste material clinicamente, já que aos 30 dias não foi possível visualizar macroscopicamente as membranas íntegras no sítio de implantação, na grande maioria das amostras.

As membranas teste de PLGA contendo antibiofilmes não apresentaram respostas teciduais muito divergentes em comparação com a membrana controle de PLGA. Houve atenuação da resposta inflamatória ao longo dos períodos experimentais; não ocorreu necrose tecidual em nenhuma das amostras e os tecidos

dos animais responderam de forma apropriada à implantação do material (formação de cápsula de tecido conjuntivo gradativamente mais organizada e fina ao longo dos períodos experimentais). Em sua maioria, a resposta inflamatória foi bastante branda, no entanto os períodos experimentais adotados não demonstraram uma completa degradação do material implantado, o que sugere que períodos experimentais mais longos são necessários para uma melhor elucidação do processo de biodegradação/absorção das membranas de PLGA, incorporadas ou não com antibiofilmes. Um ponto de divergência foi nas membranas de PLGA associadas às lactamas, que sofreram alteração na sua conformação já no primeiro período experimental. Estudos mais aprofundados das lactamas utilizadas quanto às características apresentadas em meio biológico, ou propriedades físico-químicas e térmicas do material são sugeridos para melhorar seu comportamento clínico e viabilizar sua utilização.

Pelo exposto, a utilização/aplicação clínica das membranas de PLGA incorporadas com lactamas e NPAG são biologicamente passíveis de serem utilizadas nas técnicas de RTG e ROG. O PLGA apresenta notórias vantagens em relação a membranas padrão-ouro, tais como um maior tempo de biodegradação e maior rigidez (manutenção de espaço); e, com o aditivo de inibidores de biofilme, especula-se a possibilidade da sua manutenção *in situ* em caso de deiscência. Entretanto, conforme discutido, são necessários ainda estudos adicionais quanto à concentração e propriedades físicas e químicas ideais dos antibiofilmes utilizados para concretizar sua utilização clínica.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos e considerando as limitações metodológicas, é possível concluir que as membranas absorvíveis associadas aos antibiofilmes testados (lactamas e nanopartículas de prata) sugerem biocompatibilidade. Estudos adicionais são necessários para a utilização clínica destas membranas em procedimentos reconstrutivos.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. Glossary of periodontal terms. 4. ed. Chicago, 2001. p. 44.
- 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.
- AUKHIL, I. et al. Root resorption potentials of granulation tissue from bone and flap connective tissue. **J Periodontal Res.**, v. 21, n. 5, p. 531-542, sep. 1986.
- BLACK, J. Biocompatibility: Definitions and Issues. In: BLACK, J. **Biological Performance of Materials: Fundamentals of Biocompatibility**. 4. ed. Florida: Crc Press, 2005. Cap. 1. p. 1-15.
- 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.
- BÖSTMAN, O. et al. Foreign body reactions to fracture fixation implants of biodegradable synthetic polymers. **I Bone Joint Surg.**, v. 72, n. 4, p. 592-596, jul, 1990.
- BOYKO, G.A.; MELCHER, A.H.; BRUNETTE, D.M. Formation of new periodontal ligament by periodontal ligament cells implanted in vivo after culture in vitro A preliminary study of transplanted roots in the dog. **J Periodontal Res.**, v. 16, n. 1, p. 73-88, jan. 1981.
- BUNYARATAVEJ, P.; WANG, H. L. Collagen membranes: a review. **J Periodontol.**, v. 72, n. 2, p. 215-229, feb. 2001.
- BUSER, D. et al. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. II. Surgical procedure in the mandible. **Int J Periodontics Restorative Dent.**, v. 15, n. 1, p. 10-29, feb. 1995.
- BUSER, D.; WARRER, K.; KARRING, T. Formation of a Periodontal Ligament Around Titanium Implants. **J Periodontol.**, v. 61, n. 9, p. 597-601, sep. 1990.
- 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. 420-432, apr. 1996.
- 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.8161-8163, dec. 2004.

CARRANZA, F.A.; TAKEI, H.H. Diagnóstico Clínico. In: CARRANZA, F.A. et al. **Periodontia Clínica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007a. Cap. 35. p. 540-560. Tradução de: Carranza's clinical periodontology, 10th ed.

CARRANZA, F.A.; TAKEI, H.H. Fundamentos Básicos para o tratamento Periodontal. In: CARRANZA, F.A. et al. **Periodontia Clínica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007b. Cap. 42. p. 630-635. Tradução de: Carranza's clinical periodontology, 10th ed.

CARRANZA, F.A.; TAKEI, H.H.; COCHRAN, D.L. Cirurgia Periodontal Reconstructiva. In: CARRANZA, F.A. et al. **Periodontia Clínica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. Cap. 67. p. 968-990. Tradução de: Carranza's clinical periodontology, 10th ed.

CATON, J.; NYMAN, S.; ZANDER, H. Histometric evaluation of periodontal surgery II. Connective tissue attachment levels after four regenerative procedures. **J Clin Periodontol.**, v. 7, n. 3, p. 224-231, jun. 1980.

CHAU, C.F.; WU, S.H.; YEN, G.C. The development of regulations for food nanotechnology. **Trends in Food Sci Technol.**, v. 18, n. 5, p. 269-280, may 2007.

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, may 2012.

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

CHIAPASCO, M.; ZANIBONI, M. Clinical outcomes of GBR procedures to correct peri-implant dehiscences and fenestrations: a systematic review. **Clin Oral Implants Res.**, V. 20, P. 113-123. Sep. 2009.

CORTELLINI, P.; TONETTI, M.S. Terapia Periodontal Regenerativa. In: LINDHE, J.; LANG, N.P.; KARRING, T. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. Cap. 43. p. 865-916. Tradução de: Clinical Periodontology and Implant Dentistry 5th ed.

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

COSTERTON, J.W. Introduction to biofilm. **Int J Antimicrob Agents.**, v. 11, n. 3-4, p. 217-221, may 1999.

DAHLIN, C. et al. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. **Plast Reconstr Surg.**, v. 81, n.5, p.672-676, 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.**, v. 24, n. 1, p. 13-19, 1990.

DANHIER, F. et al. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. **J Control Release**, v. 161, n. 2, p. 505-522, jul. 2012.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nat Rev Drug Discov.**, v. 2, n. 2, p. 114-122, feb. 2003.

DONOS, N.; MARDAS, N.; CHADHA, V. Clinical outcomes of implants following lateral bone augmentation: systematic assessment of available options (barrier membranes, bone grafts, split osteotomy). **J Clin Periodontol.**, v. 35, p. 173-202, sep. 2008.

ESPOSITO, M. et al. The efficacy of various bone augmentation procedures for dental implants: a Cochrane systematic review of randomized controlled clinical trials. **Int J Oral Maxillofac Implants.**, v. 12, n. 5, p. 696-710, sep. 2006.

FILHO, H.N. et al. Engenharia tecidual dos biomateriais. **Innov. Implant J.**, v. 1, n. 1, p. 55-62, maio 2006.

HÄMMERLE, C.H.; KARRING, T. Guided bone regeneration at oral implant sites. **Periodontol.**, v. 17, p. 151-75, jun. 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. 30-35, jul. 2012.

HENTZER, M. et al. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. **EMBO J.**, v. 22, n. 15, p. 3803-3815, aug. 2003.

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

KARRING, T.; NYMAN, S.; LINDHE, J. Healing following implantation of periodontitis affected roots into bone tissue. **J Clin Periodontol.**, v. 7, n. 2, p. 96-105, apr. 1980.

LISTGARTEN, M. A. Dental plaque: its structure and prevention. **ASDC J Dent Child.**, v. 39, n. 5, p. 347-352, 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.; ROSENBERG, M.M. Histological study of repair following new attachment procedures in human periodontal lesions. **J Periodontol.**, v. 50, n. 7, p. 333-344, jul. 1979.
- LOCCI, P. et al. Phenotype expression of gingival fibroblasts cultured on membranes used in guided tissue regeneration. **J. Periodontol.**, v. 68, n. 9, p. 857-863, sep. 1997.
- MANEFIELD, M. et al. Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. **Microbiology**, v. 148, n. 4, p. 1119-1127, apr. 2002.
- MARSH, P.D.; BRADSHAW, D.J. Dental plaque as a biofilm. **J Ind Microbiol.**, v. 15, n. 3, p. 169-175, sep. 1995.
- MARTINEZ-GUTIERREZ, F. et al. Synthesis, characterization, and evaluation of antimicrobial and cytotoxic effect of silver and titanium nanoparticles. **Nanomed-Nanotechnol.**, v. 6, n. 5, p. 681-688, out. 2010.
- MELCHER, A.H. On the repair potential of periodontal tissues. **J Periodontol.** , v. 47, n. 5, p. 256-260, may 1976.
- MAYFIELD, L. et al. Guided tissue regeneration for the treatment of intraosseous defects using a biabsorbable membrane. A controlled clinical study. **J Clin Periodontol.**, v. 25, n. 7, p. 585-595, jul. 1998.
- MOMBELLI, A. Microbiology and antimicrobial therapy of peri-implantitis. **Periodontol 2000.**, v. 28, p. 177-189, 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. 2163-2177, 2006.
- NYMAN, S. et al. Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue. **J Clin Periodontol.**, v. 7, n. 5, p. 394-401, oct. 1980.
- NYMAN, S. et al. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. **J Clin Periodontol.**, v. 9, n. 4, p. 290-296, jul. 1982.
- 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. 857-869, dec. 2010.
- PADDLE-LEDINEK, J.E.; NASA, Z.; CLELAND, H.J. Effect of different wound dressings on cell viability and proliferation. **Plastic Reconstruct Surg.**, v. 117, n. 7, p. 110-120, jun. 2006.

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. 614-619, mar. 2013.

PEREIRA NETO, Armando Rodrigues Lopes. **Lactamas e Nanopartículas de prata como potenciais agentes antibiofilme e antimicrobianos: estudo in vitro**. 2013. 77f. Tese (Doutorado em Odontologia – Área de concentração Implantodontia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

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. 1052-1056, feb. 2014.

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. 731-736, 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. **Letts Appl Microbiol.**, v. 34, n. 4, p. 293-299, 2002.

RETZEPI, M.; DONOS, N.; Guided Bone Regeneration: biological principle and therapeutic applications. **Clin Oral Implants Res.**, v. 21, n. 6, p. 567-576, jun. 2010.

ROBERTS, S.K. et al. Biofilm information and structure: what's new? In: NEWMAN, H.N.; WILSON, M. **Dental Plaque Revisited: Oral biofilms in health and disease**. Cardiff: BioLine, 1999. p. 15–35.

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. 443-449, aug. 2004.

SALONEN, J. I.; PERSSON, R.G. Migration of epithelial cells on materials used in guided tissue regeneration. **J Periodontal Res.**, v. 25, n. 4, p. 215-221, jul 1990.

SCHLEGEL, A. K. et al. Preclinical and clinical studies of a collagen membrane (Bio-Gide). **Biomaterials**, v. 18, n. 7, p. 535-538, apr. 1997.

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, p. 75-78, mar. 2004.

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. 5547-5556, nov. 2004.

SECINTI, K.D. et al. Nanoparticle silver ion coatings inhibit biofilm formation on titanium implants. **J Clin Neurosci.**, v. 18, n. 3, p. 391-395, mar. 2011.

SEIBERT, J.; NYMAN, S. Localized ridge augmentation in dogs: a pilot study using membranes and hydroxyapatite. **J Periodontol.**, v. 61, n. 3, p. 157-165, mar. 1990.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A. D. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. **Periodontol 2000.**, v. 28, p. 12-55, 2002.

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

TINTI, C.; PARMA-BENFENATI, S. Vertical ridge augmentation: surgical protocol and retrospective evaluation of 48 consecutively inserted implants. **Int J Periodontics Restorative Dent.**, v.18, n. 5, p. 434-443. Oct. 1998.

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. 874-877, jul. 2005.

VIGNESHWARAN, N. et al. Functional finishing of cotton fabrics using silver nanoparticles. **J Nanosci Nanotechnol.**, v. 7, n. 6, p. 1893-1897, jun. 2007.

WARRER, L. et al. Guided tissue regeneration ensures osseointegration of dental implants placed into extraction sockets. An experimental study in monkeys. **Clin Oral Implants Res.**, v. 2, n. 4, p. 166-171, oct./dez. 1991.

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