

FELIPE DE OLIVEIRA FARIAS

**ANÁLISE HISTOLÓGICA DA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS
CIRÚRGICAS PADRONIZADAS EM RATOS UTILIZANDO TRÊS
BIOMATERIAIS**

CAMPO GRANDE
2014

FELIPE DE OLIVEIRA FARIAS

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS
CIRÚRGICAS PADRONIZADAS EM RATOS UTILIZANDO TRÊS
BIOMATERIAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia Prof. Albino Coimbra Filho da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. José Peixoto
Ferrão Júnior

CAMPO GRANDE
2014

FOLHA DE APROVAÇÃO

FELIPE DE OLIVEIRA FARIAS

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS
CIRÚRGICAS PADRONIZADAS EM RATOS UTILIZANDO TRÊS
BIOMATERIAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia Prof. Albino Coimbra Filho da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. José Peixoto Ferrão Júnior

Resultado Final:

Campo Grande (MS), _____ de _____ de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Peixoto Ferrão Júnior (Membro) - UFMS

Prof^a. Dr^a. Nára Rejane S. Pereira (Membro) - UFMS

Prof. Dr. José Luiz Guimarães Figueiredo (Membro) - UFMS

DEDICATÓRIA

Acima de tudo à **Deus**, o qual me presenteou com o dom da vida, e até aqui tem me ajudado em sustentado em tudo.

Aos meus pais **Robson e Célia**, pelo apoio, dedicação e companheirismo em todos os momentos de minha caminhada.

Aos meus irmãos **Alana e Pedro**, por fazerem parte da minha vida e sempre me apoiarem em todos os momentos.

A minha fiel companheira **Miriã**, por todo seu carinho, amor e dedicação; a qual me completa.

Ao meu sempre professor e orientador **Prof. Dr. José Peixoto Ferrão Júnior** pelos grandes ensinamentos e confiança.

Aos meus **companheiros de turma**, por esses anos de convívio e amizade, tornando a jornada uma fantástica e inesquecível fase de minha vida.

À **Prof.^a Dr.^a Márcia Gorish** pela leitura e interpretação das lâminas, além das suas grandes contribuições para o trabalho.

A todos os **funcionários da FAODO, do Biotério e do Laboratório de Histologia da UFMS** que ajudaram direta e indiretamente na realização desse trabalho.

Ao **Programa de Pós-graduação de Mestrado em Odontologia**, através de seus professores e funcionários, que possibilitaram essa grande conquista.

À **Capes** pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

EPÍGRAFE

**“Reconhece ao Senhor em todos os teus caminhos,
e Ele endireitará as tuas veredas”**

Provérbios 3.6

RESUMO

Farias, FO. Análise histológica da cicatrização de feridas cirúrgicas padronizadas em ratos utilizando três biomateriais. Campo Grande; 2014. [Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-graduação em Odontologia - Universidade Federal de Mato Grosso Sul].

A proteção de feridas ainda constitui um importante problema clínico, pois expõe o paciente a um quadro pós-operatório desagradável, com possibilidade de hemorragias tardias e dor pós-operatória. Este estudo propôs-se a pesquisar o efeito biológico de três biomateriais na reparação de feridas cruentas. Foram utilizados 30 ratos wistar, nos quais foi realizada uma lesão em calvária e foi utilizado um dos biomateriais estudados: biomembrana de látex com polilisina 0,1% (Biocure[®]); biomembrana com quitosana (HemCon Dental Dressing[®]); biomembrana biológica de origem bovina (GenDerm[®]); coágulo sanguíneo (controle). Os animais foram sacrificados nos 1, 7 e 11 dias após a cirurgia. Os resultados demonstraram que o grupo Biocure[®] apresentou infiltrado inflamatório significativamente menor que os demais grupos no 1º dia e maior atividade epitelial na comparação com os mesmos. No presente estudo, o grupo HemCon[®] não apresentou diferenças estatisticamente significantes que permitissem inferir que este pudesse estimular o processo de cicatrização. Por outro lado o grupo Genderm[®] pareceu interferir retardando o processo cicatricial.

Palavras chave: Cicatrização, Materiais biocompatíveis, Regeneração

ABSTRACT

Farias, FO. Histological analysis of standardized surgical wound healing in rats using three biomaterials. Campo Grande; 2014. [Dissertation - Federal University of Mato Grosso do Sul].

The protection of wounds remains an important clinical problem, because it exposes the patient to an unpleasant postoperative period, with the possibility of delayed bleeding and postoperative pain. This study was designed to investigate the biological effect of three biomaterials in the repair of skin wounds. 30 Wistar rats were used and an injury was performed in calvarias and which used one of the studied biomaterials: latex membrane with 0.1% polylysine (Biocure®); biomembrane chitosan (HemCon Dental Dressing®); biological biomembrane of bovine origin (GenDerm®); blood clot (control). The animals were sacrificed at 1, 7 and 11 days after surgery. The results showed that the Biocure® group had significantly less inflammatory infiltration than the other groups on day 1 and increased epithelial activity when compared to the same. In this study, the HemCon® group did not show statistically significant differences to allow infer that this would stimulate the healing process. On the other hand the Genderm® group seemed to interfere slowing the healing process.

Keywords: Wound healing, Biocompatible Materials, Regeneration

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UFMS – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

CEUA – Comitê de Ética em Uso de Animais

HE – Hematoxilina e Eosina

EGF – *Epidermal growth factor* (Fator de crescimento Epitelial)

PDGF – *Platelet-derived growth factor* (Fator de crescimento derivado de plaquetas)

TGF- β – *Transforming growth factor β* (Fator de crescimento transformador beta)

A – Biomembrana de látex com polilisina 0,1% (Biocure[®])

B – Biomembrana com quitosana (HemCon[®])

C – Biomembrana biológica de origem bovina (GenDerm[®])

D – Lesão inferior esquerda: Coágulo sanguíneo (controle)

LISTA DE SÍMBOLOS

% - percentual

h – hora

cm – centímetro

cm³ - centímetro cúbico

°C – grau Celsius

W – watts

ml – mililitros

g – grama

kg – quilograma

mg – miligrama

μm – micrômetro

T – tempo

G – grupo

pH – potencial hidrogeniônico

> – maior

< – menor

⊢ – conclusão

α – nível de significância

= – igual

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição dos Escores utilizados para avaliação qualitativa das lâminas histológicas	37
Tabela 2 – Níveis de significância e conclusão estatística da comparação dos grupos em relação às variáveis estudadas no período de 1 dia	41
Tabela 3 – Níveis de significância e conclusão estatística da comparação dos grupos em relação às variáveis estudadas no período de 7 dias	43
Tabela 4 – Níveis de significância e conclusão estatística da comparação dos grupos em relação às variáveis estudadas no período de 11 dias	44
Tabela 5 – Níveis de significância e conclusão estatística da comparação dos tempos (dias) em relação aos grupos (materiais) e as variáveis estudadas.	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estágios clássicos da cicatrização	18
Figura 2 - Deposição dos componentes da matriz da ferida ao longo do tempo..	20
Figura 3 – Estrutura química da biomembrana Biocure®	23
Figura 4: Gaiolas com os animais	29
Figura 5: Armazenamento das gaiolas	29
Figura 6: Contenção manual e anestesia intraperitoneal	30
Figura 7: Cloridrato de Cetamina (Dopalen®)	30
Figura 8: Cloridrato de Xilazina (Anasedan®)	30
Figura 9: Mesa para preparação dos animais	31
Figura 10: Solução de Clorhexidina a 2%	31
Figura 11: Tricotomia sendo realizada	31
Figura 12: Mesa para procedimentos cirúrgicos	31
Figura 13: A - Bisturi circular em operação realizando as lesões. B – Aspecto das lesões após a incisão com bisturi circular	32
Figura 14: A – Remoção do tecido excisionado com o bisturi circular, em algumas lesões foi utilizado um bisturi manual com lâmina 15 para auxiliar na remoção. B – Aspecto final e disposição das lesões na calvária	33
Figura 15 – Disposição das Lesões padronizadas em que serão posicionados os biomateriais. Legenda: (em sentido crânio-caudal) A - Lesão superior esquerda: Biomembrana de látex com polilisina 0,1% (Biocure®); Lesão superior direita: Biomembrana com quitosana (HemCon®); Lesão inferior direita: Biomembrana biológica de origem bovina (GenDerm®); Lesão inferior esquerda: Coágulo sanguíneo (controle)	33
Figura 16: Biomembrana de látex com polilisina 0,1% (Biocure)	34
Figura 17: Biomembrana com quitosana (HemCon®)	34
Figura 18: Biomembrana biológica de origem bovina (GenDerm®)	34

Figura 19: Aspecto final dos animais no pós-operatório imediato com a colocação de curativo com fita microporosa	35
Figura 20: Antimicrobiano de amplo espectro	35
Figura 21: Remoção do curativo e exposição das lesões	35
Figura 22: Aspecto das lesões de um animal após 7 dias	35
Figura 23: Incisões para remoção das peças	35
Figura 24: Peça da calvária removida	35
Figura 25: Acondicionamento das peças em frascos estéreis e identificados com formol 10 volumes	36
Figura 26 – Fotomicrografias das lesões no período de 1 (um) dia, coloração HE, aumento 10x. A – Grupo Biocure; B – Grupo HemCon; C – Grupo GenDerm; D – Grupo Coágulo (controle)	39
Figura 27 – Fotomicrografias das lesões no período de 7 (sete) dias, coloração HE, aumento 4x. A – Grupo Biocure; C – Grupo GenDerm	40
Figura 28 – Fotomicrografias das lesões no período de 11 (onze) dias, coloração HE. A – Grupo Biocure; B – Grupo HemCon; C – Grupo GenDerm; D – Grupo Coágulo (controle)	40

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Gráfico box-plot de medianas e quartis dos escores da avaliação histológica dos grupos experimentais após o período de 1 dia	42
Gráfico 2 - Gráfico box-plot de medianas e quartis dos escores da avaliação histológica dos grupos experimentais após o período de 7 dias	43
Gráfico 3 - Gráfico box-plot de medianas e quartis dos escores da avaliação histológica dos grupos experimentais após o período de 11 dias	45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Fases da cicatrização	18
2.1.1 Hemostasia e fase inflamatória	18
2.1.2 Fase proliferativa	19
2.1.3 Fase de maturação e remodelação	20
2.2 Biomateriais de origem biológica	21
2.2.1 Látex e cicatrização	21
2.2.2 Biomembrana de látex com polilisina 0,1% (Biocure®)	22
2.2.3 Quitina e quitosana	24
2.2.4 Biomembrana com quitosana (HemCom Dental Dressing®)	25
2.2.5 Membrana biológica derivada de bovinos (GenDerm®)	27
3 OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo Geral	28
3.2 Objetivo Específico	28
4 MATERIAIA E MÉTODO	29
4.1 Animais	29
4.2 Procedimentos cirúrgicos	30
4.2.1. Preparo dos animais	30
4.2.2. Confecção das lesões	32
4.2.3. Coleta das peças	35
4.3 Procedimentos histológicos	36
4.4 Procedimentos estatísticos	37
5 RESULTADOS	39
5.1 Análise histológica	39
5.2 Avaliação dos escores	41

5.2.1 1º Dia	41
5.2.2 7º Dia	42
5.2.3 11º Dia	44
5.2.4 Comparação entre tempos (dias)	45
6 DISCUSSÃO	47
7 CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS	50
ANEXOS A – Autorização da Comissão de Ética no uso de animais-CEUA	54

1 INTRODUÇÃO

A cicatrização é um dos mais complexos processos que ocorrem na vida do ser humano. Logo após uma injúria, múltiplas vias biológicas são imediatamente ativadas e sincronizam-se para responder no reparo tecidual (Gurtner et al., 2008).

Tradicionalmente, a cicatrização é dividida em três fases distintas: inflamação, proliferação, e remodelação. Entretanto, o entendimento da cicatrização envolve muito mais do que a compreensão dessas três fases. É uma complexa série de reações e interação celulares e mediadores. A cada ano, novos mediadores são descobertos e a compreensão acerca dos mediadores inflamatórios e interações celulares é expandida (Broughton II et al., 2006a).

Esse processo ainda representa um desafio clínico, com complicações iniciais e tardias apresentando uma frequente taxa de morbidade e mortalidade. Muitos esforços têm sido aplicados para reduzir o impacto das feridas, bem como para a compreensão da fisiologia e cuidados em torno da cicatrização, com ênfase nos em novas abordagens terapêuticas (Velnar et al., 2009).

Uma melhor compreensão do processo de cicatrização permite ao profissional avaliar criticamente e precisamente a utilização de uma série de métodos biológicos que procuram assistir a cicatrização modulando favoravelmente o microambiente da ferida (Miloró, 2004).

Embora o ritmo e os padrões de cicatrização dependam de fatores locais, sistêmicos e cirúrgicos do indivíduo, as fases de cicatrização da mucosa oral são muito semelhantes às fases de cicatrização cutânea (Bagheri et al., 2013).

Estudos têm demonstrado que alguns biomateriais têm a capacidade de estimular o processo de cicatrização (Andrade et al., 2011; Figueiredo et al., 2014). Estudos envolvendo biomateriais têm sido realizados utilizando a implantação subcutânea em modelos animais, e têm demonstrado que este é um modelo apropriado pra avaliação imunológica e de modificações teciduais durante o processo de cicatrização (Andrade et al., 2011).

O propósito deste trabalho é avaliar e discutir o estímulo à cicatrização que alguns biomateriais, em especial a Biomembrana de látex derivada da *Hevea brasiliensis*; uma biomembrana com quitosana e uma membrana biológica derivada de bovinos, exercem sobre tecidos lesados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fases da cicatrização

Em todos os sistemas de órgãos, a resposta normal dos mamíferos a lesão ocorre em três fases distintas, mas que se sobrepõem: inflamação, formação de novo tecido, e remodelação (Figura 1).

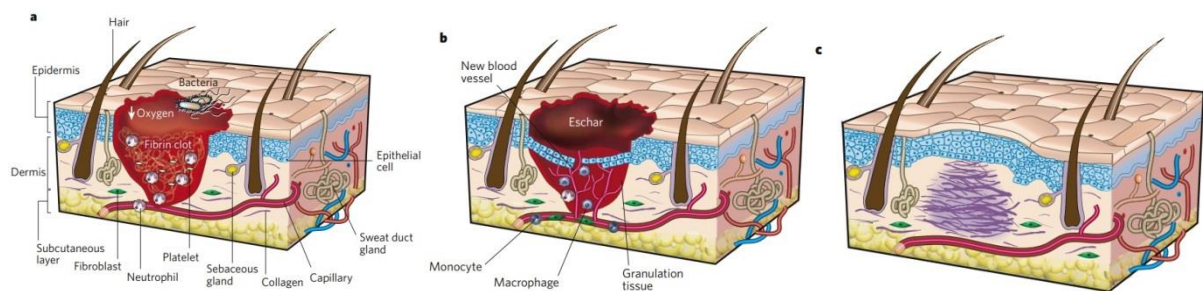


Figura 1 - Estágios clássicos da cicatrização. Há três estágios clássicos da cicatrização: inflamação (a), formação de tecido novo (b) e remodelação (c). **A - Inflamação.** Esta fase dura até cerca de 48 horas após a lesão. Representação de uma ferida de pele com cerca de 24-48h pós-lesão. A ferida é caracterizada por um ambiente hipóxico (isquêmico), em que um coágulo de fibrina se formou. As bactérias, os neutrófilos e as plaquetas são abundantes na ferida. Anexos da pele normal (tais como folículos pilosos e dutos de glândulas sudoríparas) ainda são presentes na pele fora da ferida. **B - Formação de novo tecido.** Este estágio ocorre cerca de 2-10 dias após a lesão. Representação de uma ferida em cerca de 5-10 dias pós-lesão. Uma escara foi formada sobre a superfície da ferida. A maioria das células do estágio anterior de reparação migraram da ferida, e novos vasos sanguíneos agora estão presentes na área. Pode ser observada a migração de células epiteliais sob a escara. **C - Remodelação.** Esta fase dura por um ano ou mais. Representação de uma ferida de pele cerca de 1-12 meses após o reparo. Colágeno desorganizado foi produzido pelos fibroblastos que migraram para dentro da ferida. A ferida foi contraída perto da sua superfície, e a porção mais larga é agora a mais profunda. A ferida re-epitelizada é ligeiramente maior do que a superfície adjacente, e a região reparada não contém apêndices de pele normais. Extraído e adaptado de Gurtner et al., 2008.

2.1.1 Hemostasia e fase inflamatória

As lesões teciduais severas levam ao rompimento de vasos sanguíneos e causam extravasamento dos componentes do sangue. A coagulação sanguínea e a agregação plaquetária levam à formação de um coágulo de fibrina dentro da luz do vaso e fornecem uma matriz provisória para a migração celular. Vários fatores procoagulantes que incluem o fibrogênio, a fibronectina e a trombospodina são secretados pelas células danificadas e iniciam a cascata de coagulação. O coágulo

e os tecidos que circundam a ferida secretam citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento, incluindo o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator de crescimento epitelial (EGF) e o fator de crescimento transformador beta (TGF- β).

Uma vez que o sangramento esteja controlado, células inflamatórias migram para dentro da ferida (quimiotaxia) e começam a remover células apoptóticas e bactérias da área danificada. Os sinais clínicos incluem edema localizado (inchaço), algia (dor), hiperemia (rubor) e aumento de temperatura local (calor) no local da ferida (Broughton II et al., 2006a; Gurtner et al., 2008; Bagheri et al., 2013). Os neutrófilos são células inflamatórias predominantes durante a fase inicial, mas são rapidamente suplantados por macrófagos derivados de monócitos e por linfócitos T durante a transição para a fase proliferativa (Bagheri et al., 2013).

2.1.2 Fase Proliferativa

A fase proliferativa é caracterizada pela proliferação epitelial e migração sobre a matriz provisória. No tecido dérmico de reparação, os fibroblastos e as células endoteliais proliferam e contribuem para o crescimento capilar, para a síntese de colágeno e para a formação de tecido de granulação.

Os fibroblastos são as principais células responsáveis pela produção de colágeno, glicosaminoglicanos e proteoglicanos, os quais são os principais componentes da matriz extracelular. Concomitante a esses eventos ocorre o processo de angiogênese através do qual novos vasos sanguíneos são formados e vasos linfáticos são recanalizados nos tecidos cicatriciais. Esse processo essencial restabelece o transporte adequado de nutrientes e de oxigênio para os locais danificados. Células epiteliais originárias das protuberâncias dos folículos pilosos, glândulas sebáceas e camada basal das margens epiteliais das bordas da ferida proliferam e revestem a ferida (Broughton II et al., 2006a; Gurtner et al., 2008; Bagheri et al., 2013). Em contraste com a pele, o processo de reepitelização progride mais rapidamente em uma ferida na mucosa oral. As células orais migram diretamente para a superfície úmida e exposta do coágulo de fibrina em vez de ir

profundamente ao exsudato seco (crosta) de uma ferida dérmica (Bagheri et al., 2013).

2.1.3 Fase de maturação e remodelação

A fase de remodelação é a etapa final da reparação tecidual e é diferente pelo contínuo processo de renovação (*turnover*) das fibras colágenas. A resistência tênsil da ferida é gradualmente restaurada à medida que as fibras colágenas são realinhadas e cada vez mais entrelaçadas em um padrão bem organizado. A máxima resistência tênsil de uma ferida é alcançada em 6-12 meses após a lesão, dependendo dos fatores do indivíduo, mas nunca alcança a resistência inicial do tecido intacto.

Eventualmente, a síntese de colágeno ativo pode ser retardada por uma desordem no processo, como insuficiência na perfusão de oxigênio, falta de nutrientes e infecção da ferida, favorecendo o rompimento do colágeno e deiscência da ferida (Broughton II et al., 2006a; Gurtner et al., 2008; Bagheri et al., 2013).

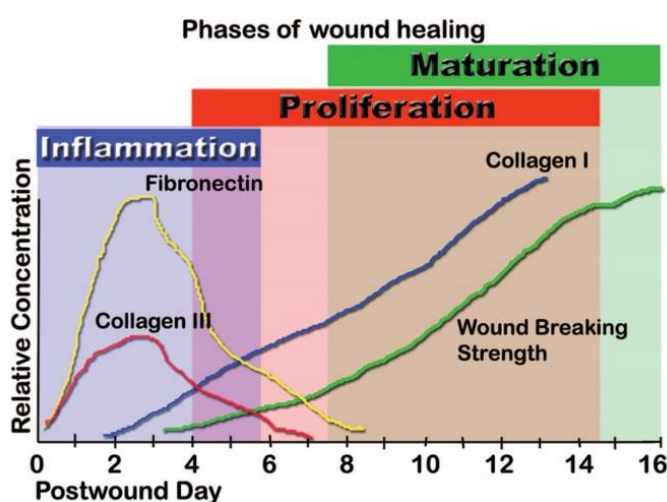


Figura 2. Deposição dos componentes da matriz da ferida ao longo do tempo. Embora a fibronectina e colágeno tipo III constituem a matriz inicial, colágeno tipo I acumula-se mais tarde, o que contribuiu para o aumento da resistência da ferida. Extraído e adaptado de Broughton II et al, 2006b.

2.2 Biomateriais de origem biológica

Os polímeros naturais podem ser obtidos a partir de fontes microbianas, animais ou vegetais, que são geralmente de uma proteína ou polissacarídeo natural (Tabata, 2009). Embora estes polímeros ocorram naturalmente, podem simular de perto os ambientes celulares originais e matriz extracelular.

Estes biomateriais são conhecidos por sofrerem naturalmente processos de degradação e, a sua grande heterogeneidade e variações de controle de lote para lote após seu isolamento são as principais limitações para suas aplicações (Malafaya et al., 2007; Sell et al., 2010). Outras preocupações incluem o custo relativamente alto de alguns destes materiais (ou seja, de materiais à base de proteínas) e o risco associado de transmissão de doenças infecciosas devido às origens alogênicas ou xenogênicas (Malafaya et al., 2007).

A pobre estabilidade e desempenho mecânico também representam inconvenientes que podem limitar a aplicação mais ampla destes biomateriais (Huang e Fu, 2010). No entanto, várias modificações químicas de síntese e/ou processamento podem ser realizadas de modo a ultrapassar algumas destas desvantagens (Jayakumar et al., 2011). Agregar estes materiais à outros materiais poliméricos (incluindo polímeros sintéticos) é uma outra alternativa viável para potencializar seu uso (Tessmar e Gopferich, 2007).

2.2.1 Látex e cicatrização

As plantas possuem um grande potencial no cuidado e tratamento de feridas devido à presença de vários constituintes bioativos sendo historicamente utilizadas em muitas culturas e povos (Thakur et al., 2011; Korpenwar, 2012). Esses componentes bioativos incluem vários metabólitos secundários, óleos essenciais e látex (Edeoga et al., 2005) que têm propriedades que podem aumentar e modular a resposta fisiológica do organismo para restaurar os tecidos lesados (Singh et al., 2006). Particularmente, os preparativos de látex de plantas laticíferas podem ser

aplicados topicamente sobre feridas recentes como hemostático e estimulante do processo cicatricial (Thankamma, 2003).

O trabalho de Andrade et al., (2011) avaliou o estímulo inflamatório da biomembrana de látex sobre a cicatrização em ratos e concluiu que o biomaterial induziu significativamente a fase inflamatória de cicatrização mediada pelo *stress* oxidativo, que pareceu influenciar também as fases subsequentes, tais como a angiogênese (com baixa expressão de VEGF) e fibroplasia (independentes do TGF- β 1) sem influenciar a collagenase.

Balabanian et al. (2006), avaliaram a biocompatibilidade do polímero derivado do látex da *Hevea Brasiliensis*, através da implantação do biomaterial em alvéolos imediatamente após a exodontia. Os grânulos observados na cervical dos alvéolos não apresentaram reação tipo corpo-estranho ou persistência da reação inflamatória aguda inicial. Observou-se também diminuição da espessura da cápsula fibrosa em torno dos materiais no osso reparado nas áreas adjacentes no 7º dia. A análise quantitativa evidenciou a aceleração de formação óssea, em paralelo com o decréscimo de tecido conjuntivo nas áreas ao redor dos implantes.

2.2.2 Biomembrana de látex com polilisina 0,1% (Biocure®)

A membrana de látex natural é extraída da seringueira *Hevea brasiliensis* e fabricada por um processo diferente da técnica convencional utilizada nas indústrias de borracha por ser o látex banhado após o processamento pela proteína de polilisina a 0,1% (Mrué et al., 2004).

O látex natural é coletado da seringueira, usando a amônia como único conservante, sendo depois centrifugado para reduzir o seu teor de proteína, particularmente as proteínas alergênicas. Uma composição de enxofre é então adicionada como o único agente de cura, após então o látex é polimerizado a baixas temperaturas em um molde de vidro, e o resultado desse processo é uma biomembrana. A biomembrana obtida é fina, elástica e fácil de manusear. A sua estrutura é composta por cadeias de poliisopreno ligado com pontes de enxofre e de proteínas e fosfolípidos do látex (figura 3). Finalmente, o produto é esterilizado por óxido de etileno (Mrué et al., 2004).

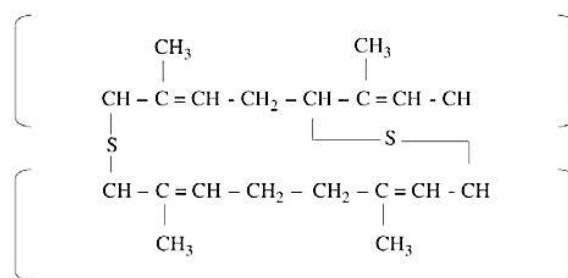


Figura 3 – Estrutura química da biomembrana Biocure®

A polilisina é uma poliamina sintética usada rotineiramente em histologia com a finalidade de facilitar a adesão celular sobre superfícies vítreas. Este produto é, carregado positivamente e as células normalmente não têm receptores específicos para ele. Acredita-se que a adsorção celular forçada pela polilisina seja promovida pelas interações eletrostáticas entre a membrana celular e a superfície da poliamina, mimetizando os eventos adesivos que ocorrem naturalmente entre as membranas celulares e seus receptores específicos. As alterações nas cargas elétricas superficiais vão assim alterar a estrutura e a função celular (Rainaldi, 1998; Singh, 1995).

Mrué et al. (2004) avaliaram a biocompatibilidade da biomembrana de látex *in vivo* utilizando diferentes espécies animais. Implantes subcutâneos de biomembrana de látex foram utilizados em paredes abdominais de cães e apresentaram reparo com tecido sem sinais de fibrose ou rejeição. O efeito da biomembrana também foi estudado em úlceras dérmicas em orelhas de coelho, onde promoveu uma resposta cicatricial melhor do que em comparação ao reparo fisiologicamente normal. Observou que quantidades moderadas de células inflamatórias foram visíveis na primeira semana após o implante, diminuindo gradualmente e desaparecendo completamente na quarta semana. Quantidades muito pequenas de células de Langherhans foram observadas, mesmo na quarta semana, compreendendo menos do que 5 células por campo (com ampliação de 40x). Ocorreu aumento gradual e ordenado de fibras colágenas, semelhantemente a uma reação natural, e ainda proliferações excessivas não foram observadas até a quarta semana.

Em um relato de caso clínico Xavier et al. (2008) avaliaram o uso de uma membrana de látex com polilisina a 0,1% como curativo. Foram realizadas duas cirurgias de enxerto gengival livre utilizando áreas doadoras palatinas, com intervalo

de um mês entre elas. Na primeira, foi colocada a membrana de látex sob o cimento cirúrgico de proteção em uma delas, enquanto na outra foi aplicado apenas o cimento cirúrgico. Houve aceleração na epitelização, associada a um aumento da hemostasia e diminuição da sensibilidade pós-operatória na área que recebeu a biomembrana.

Silva e Maniscalco (2013) provocaram um defeito no palato secundário de sete cães, dos quais, cinco foram recobertos com a biomembrana de látex com polilisina a 1%, e os outros (dois) foram escolhidos como controle e tiveram o fechamento por segunda intenção. No período pós-operatório foram realizadas observações clínicas e macroscópicas para avaliação dos resultados. A membrana foi um fator de aceleração do processo de reparação, visto que os animais do grupo controle demoraram mais tempo para ter o defeito totalmente fechado em relação aos outros.

2.2.3 Quitina e Quitosana

A quitina é um dos mais polissacarídeos abundantes na natureza. Pode ser encontrada no exoesqueleto de artrópodes, de crustáceos, de moluscos e, em algumas paredes celulares de fungos (Dai, 2011). Algumas fontes de quitina comuns (conchas de camarões e caranguejos, por exemplo) são muito acessíveis e de custo baixo, fazendo da quitina um biomaterial comercialmente atraente para várias aplicações (Khoushab, 2010; Madihally, 2011).

A quitina é um polissacarídeo linear de unidades de N-acetil-D-glicosamina (2-acetilamino-2-desoxi-D-glucose) unidas por ligações glicosídicas β -(1-4) (Koide, 1998; Kim, 2008; Jayakumar, 2010; Jayakumar, 2011; Dash, 2011). Como a quitina não é solúvel em solução aquosa, geralmente é convertida em quitosana por desacetilação termoquímica, na presença de uma solução alcalina (Dash, 2011; Rinaudo, 2006). Portanto, a quitosana é um copolímero linear de D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina. O termo quitosana também é geralmente empregado para descrever uma série de derivados de quitina de diferentes graus de desacetilação (definido em termos de composição de grupos amino primários na cadeia do polímero e dos seus pesos moleculares médios) (Rinaudo, 2006).

As propriedades químicas, físicas e biológicas da quitosana estão diretamente relacionadas com o seu grau de desacetilação e peso molecular (Chatelet et al., 2001). A quitosana é geralmente considerada biodegradável, biocompatível, não-alergênico, não-tóxico, bioadesivo, possui propriedades anti-microbianas, bioativas e com efeitos hemostáticos (Huang, Fu, 2010; Dai, 2011; Pérez, 2012). Ela também é facilmente degradada por hidrólise química, bem como por certas enzimas humanas, como a lisozima (Kim, 2008; Jayakumar, 2010).

Os materiais à base de quitosana geralmente exibem uma carga positiva (quando em valores de pH da ferida típica), capacidade de formação de película, características de gelificação suaves, forte propriedades adesivas ao tecido da ferida (Moura et al., 2013). Também foram encontrados propriedades na quitosana e seus derivados, para aumentar a coagulação e acelerar a cicatrização de feridas (Jayakumar, 2011; Kim, 2008).

Outros trabalhos também indicaram que biomateriais a base de quitosana podem melhorar as funções inflamatórias de leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e neutrófilos, promovendo tecido de granulação para uma resposta inflamatória adequada (Takei et al., 2012). Além disso, a quitosana pode estimular a proliferação de fibroblastos, angiogênese, síntese e deposição regular de fibras de colágeno, que promove melhor organização tecidual (Jayakumar, 2011; Kim, 2008; Muzzarelli, 2009).

2.2.4 Biomembrana com Quitosana (HemCom Dental Dressing®)

HemCon Dental Dressing® (HemCon Medical Technology Inc, Beaverton,OR) é fabricado a partir de quitosana, derivado de um biopolímero chamado quitina, que sofre um processo de secagem por congelamento e remodelação para formar um material altamente esponjoso (Burkatovskaya et al., 2006). É um dispositivo médico hemostático que pode ser usado em cirurgias orais para atingir a hemostasia precoce e melhorar o reparo pós-operatório, tendo a capacidade de selar cavidades pós-extrações. Na periodontia é utilizado na região doadora de enxerto gengival para que haja uma cicatrização mais rápida e com um maior conforto ao paciente, diminuindo a dor. Como ele adere na ferida, não há necessidade de sutura e será

reabsorvido num período de 48h, melhorando assim a cicatrização do leito doador, garantindo um maior conforto ao paciente (Malmquist et al., 2008).

Os curativos tornam-se aderentes ao entrar em contato com o meio da ferida oral e fornecem uma camada protetora, podendo ser cortado de tamanho personalizado para atender às necessidades do paciente. Proporciona uma barreira física para proteger a superfície da ferida, reduzindo a dor (CUI XU et al., 2009).

Um estudo em coelhos teve como objetivo avaliar o efeito hemostático do Hemcon e sulfato férrico nos locais das feridas ósseas e medir o potencial de cicatrização de feridas e porcentagem de formação de novo osso em criptas ósseas tratadas com HemCon e sulfato férrico. Os resultados mostraram que a hemorragia intermitente foi obtida com um valor médio de 1 minuto tanto para o HemCon como para o sulfato férrico, enquanto que a hemostase completa foi obtida em 2,17 min. para HemCon e 2,33 para sulfato férrico. A avaliação da neoformação óssea revelou que HemCon mostrou significativamente mais deposição óssea dentro das criptas ósseas em comparação ao controle (Azargoon et al., 2011).

Malmquist et al. (2008) avaliaram a eficácia da membrana de quitosana da HemCon na hemostasia de feridas orais. Participaram pacientes com idades entre 18 e 90 anos que faziam uso de anticoagulantes e que necessitavam de 2 ou mais sítios cirúrgicos. A administração de anticoagulantes não foi alterada durante a pesquisa. Os resultados demonstraram que os locais que receberam a membrana tiveram hemostasia com 1 minuto enquanto o grupo controle, onde não houve preenchimento, com 9,53 minutos. Os locais que receberam quitosana tiveram cicatrização significativamente melhor. Além disso, pode-se perceber melhora no quadro de dor e também menor incidência de osteíte. Os autores concluíram que a membrana apresentou-se estatisticamente significativa na promoção da hemostasia e cicatrização no pós-operatório.

Kale et al. (2012) realizaram um estudo com 40 pacientes dentre eles nove diabéticos e pacientes com distúrbios plaquetários, tomando medicações antiplaquetárias e anticoagulantes. Avaliaram o uso de HemCon em locais de extração e descobriram que todos esses sítios, incluindo os nove pacientes que tomam anticoagulantes orais tratados com o HemCon, alcançaram hemostasia em menos de 1 minuto versus controle feridas em 9,53 minutos. Comprovaram que a Hemcon facilita a hemostasia e reduz a dor, diminui os riscos de trombose, pois

permite ao paciente continuar com sua medicação, mostrando-se eficaz no combate a infecções e qualquer tipo de manifestação na ferida. A HemCon desempenha importante papel na hemostasia, porém de maneira independente do sistema clássico da cascata de coagulação.

2.2.5 Membrana biológica derivada de Bovinos (GenDerm®)

Disponível no mercado brasileiro, a GenDerm® (Baumer S.A., Mogi Mirim, SP) é uma membrana biológica liofilizada derivada da matriz orgânica desmineralizada da cortical óssea de bovinos, que se constitui basicamente de fibras colágenas. Sua principal indicação é na clínica odontológica, em casos de lesões ósseas periodontais ou associadas a implantes metálicos osteointegráveis. Apresenta entre as principais vantagens o custo acessível e eficácia comprovada através de estudos histológicos em modelos animais (Taga et al., 1997; Taga et al., 2000; Sanches et al., 2000; Herculani, 2000).

A GenDerm é utilizada dentro do conceito de regeneração tecidual guiada (GTR), apresentando bons resultados (Bernabé et al., 2010). Entretanto, faltam ainda informações básicas sobre a resposta celular desta membrana, como por exemplo, o seu tempo de permanência estruturalmente funcional, assim como os mecanismos biológicos locais e de estímulo aos tecidos (Taga et al., 2000).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliação histológica do processo de cicatrização de feridas cirúrgicas padronizadas em calvária de ratos, com a utilização de uma biomembrana de látex com polilisina 0,1% (Biocure[®]), uma biomembrana a base de quitosana (HemCon Dental Dressing[®]) e uma membrana biológica de origem bovina (GenDerm[®]).

3.2 Objetivo Específico

Avaliação do estímulo que os biomateriais exercem sobre os tecidos durante o processo de cicatrização, analisando qualitativamente a inflamação, a atividade fibroblástica, atividade epitelial e angiogênese, comparando os resultados com os encontrados nos processos cicatriciais controles.

4 MATERIAIS E MÉTODO

4.1 Animais

Foram utilizados 30 ratos Wistar machos com 10 semanas de idade, de procedência do biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campus Campo Grande, com peso de aproximadamente 300g. Os animais foram mantidos em gaiolas unitárias (Figura 4) de 25cm³ - 45x30x15cm de comprimento, largura e altura respectivamente, com tampa gradeada de metal e mantidos, a uma temperatura de 24°C e com iluminação artificial por lâmpada fluorescente (modelo luz do dia, 40W), possibilitando espaço suficiente para sua movimentação e descanso, sob higiene controlada; alimentados com ração balanceada (Nuvilab CR - 1[®]) e água a vontade durante todo o experimento. Os animais permaneceram isolados (Figura 5), para certificar que ficassem estáveis e saudáveis, mantendo contato apenas com as pessoas envolvidas no trabalho.



Figura 4: Gaiolas com os animais



Figura 5: Armazenamento das gaiolas

Os procedimentos foram realizados após aprovação pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da UFMS sob o protocolo de número 539/2013 (em anexo). Todo o procedimento cirúrgico foi realizado na sala de experimentação do biotério

da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, sob a supervisão de um veterinário responsável. Os cuidados e medicamentos usados nos animais, bem como sua posologia, foram indicados pelo médico veterinário responsável pelo Projeto, com base na literatura (Damy *et al*, 2010).

4.2 Procedimentos cirúrgicos

4.2.1. Preparo dos animais

Os animais foram contidos manualmente (figura 6) e anestesiados com associação de Cloridrato de Cetamina (Dopalen[®]) na dose de 58 mg/kg (figura 7) + Cloridrato de Xilazina (Anasedan[®]) na dose de 9,2 mg/Kg (figura 8).



Figura 6: Contenção manual e anestesia intraperitoneal.



Figura 7: Cloridrato de Cetamina (Dopalen[®]).



Figura 8: Cloridrato de Xilazina (Anasedan[®]).

Depois de verificada a anestesia, cada animal foi posicionado em uma mesa apropriada (figura 9) para a realização de antisepsia com solução de Clorhexidina a 2% (figura 10) e tricotomia da calvária com lâmina para tricotomia (figura 11).



Figura 9: Mesa para preparação dos animais.



Figura 10: Solução de Clorhexidina a 2%.



Figura 11: Tricotomia sendo realizada.



Figura 12: Mesa para procedimentos cirúrgicos.

4.2.2 Confecção das lesões

Na calvária de cada rato foram realizadas quatro lesões teciduais padronizadas em extensão, por diâmetro de bisturi circular “*punch*” (5mm), e profundidade, de 2 mm. Para a padronização das lesões, foi utilizado um contra-ângulo cirúrgico com redução 20:1 à 400rpm (Kavo[®]) e motor cirúrgico (figuras 13 e 14). Em cada lesão foi aplicado um biomaterial, conforme especificação a seguir (figura 15):

- a) Lesão superior esquerda: Biomembrana de látex com polilisina 0,1% (Biocure[®])
- b) Lesão superior direita: Biomembrana com quitosana (HemCon[®])
- c) Lesão inferior direita: Biomembrana biológica de origem bovina (GenDerm[®])
- d) Lesão inferior esquerda: Coágulo sanguíneo (controle)



Figura 13: A - Bisturi circular em operação realizando as lesões. B – Aspecto das lesões após a incisão com bisturi circular.



Figura 14: A – Remoção do tecido excisionado com o bisturi circular, em algumas lesões foi utilizado um bisturi manual com lâmina 15 para auxiliar na remoção. B – Aspecto final e disposição das lesões na calvária.

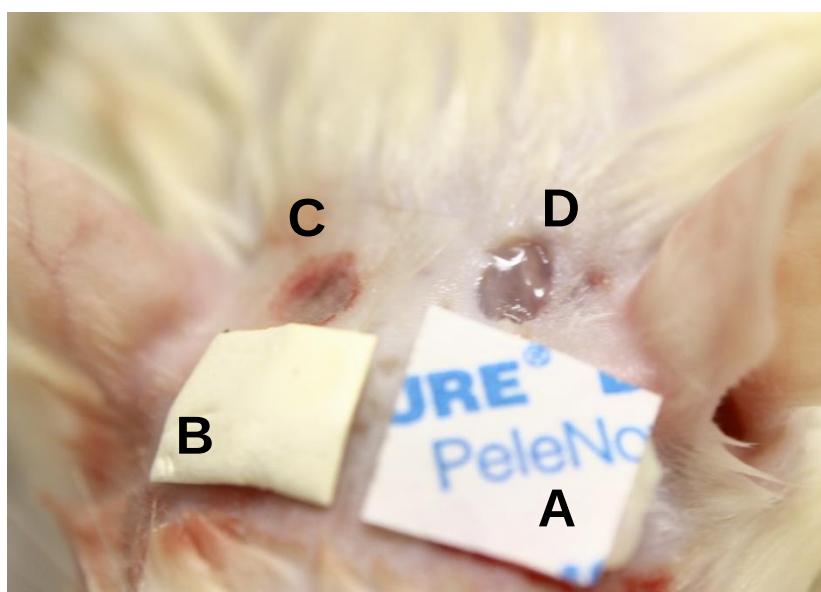


Figura 15 – Disposição das Lesões padronizadas em que serão posicionados os biomateriais. Legenda: (em sentido crânio-caudal) A - Lesão superior esquerda: Biomembrana de látex com polilisina 0,1% (Biocure®); Lesão superior direita: Biomembrana com quitosana (HemCon®); Lesão inferior direita: Biomembrana biológica de origem bovina (GenDerm®); Lesão inferior esquerda: Coágulo sanguíneo (controle).



Figura 16: Biomembrana de látex com polilisina 0,1% (Biocure)



Figura 17: Biomembrana com quitosana (HemCon®).



Figura 18: Biomembrana biológica de origem bovina (GenDerm®).

As membranas foram recortadas com diâmetro ligeiramente maior que as lesões, de modo que estas fossem inteiramente protegidas pelo biomaterial. Em seguida, foram fixadas com cola a base de cianoacrilato (Super-bonder®) e curativo com fita microporosa (Micropore). Ao final, aplicou-se uma dose de antimicrobiano

de amplo espectro (Calbiótico®), via parenteral, com posologia de 1ml/kg. Os animais foram recolocados em suas gaiolas de origem, em ambiente limpo até a recuperação anestésica e foram monitorados até a hora do sacrifício.



Figura 19: Aspecto final dos animais no pós-operatório imediato com a colocação de curativo com fita microporosa.



Figura 20: Antimicrobiano de amplo espectro

Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos, com dez animais cada, para serem sacrificados nos tempos de 1 dia, 7 dias e 11 dias após a cirurgia.

4.2.3. Coleta das peças

Foi realizado um segundo tempo cirúrgico, de maneira semelhante ao primeiro, para remoção total da calvária dos ratos (peças para análise), e em seguida, os mesmos foram sacrificados por superdosagem do anestésico. As peças foram armazenadas em frascos estéreis com volume de 5ml, contendo formol 10 volumes.



Figura 21: Remoção do curativo e exposição das lesões.

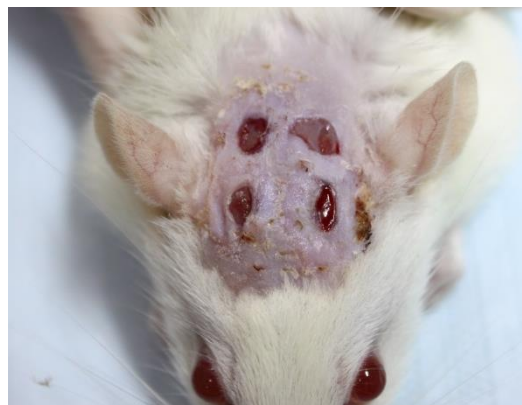


Figura 22: Aspecto das lesões de um animal após 7 dias.



Figura 23: Incisões para remoção das peças.



Figura 24: Peça da calvária removida.



Figura 25: Acondicionamento das peças em frascos estéreis e identificados com formol 10 volumes.

4.3 Procedimentos histológicos

O processo de confecção das lâminas foi por fixação dos tecidos com formaldeído tamponado a 10% (Fosfato de Sódio 0,1 molar) por 48 horas. Após, foi

realizada a desidratação das lesões com a série de álcoois (70%, 80%, 95% e absoluto), por 30 minutos em cada concentração. Em seguida, realizou-se a diafamaização pelo xylol, por 30 minutos e impregnação com parafina à 60°C, por 30 minutos para inclusão dos blocos.

A microtomia dos blocos foi realizada em um micrótomo rotativo (Micron HM 325-ZEIZZ- Brasil), com navalhas descartáveis (LEICA 818 perfil alto – Alemanha) com secção de 5µm de espessura, semi-seriada, com intervalo de 20µm.

Os cortes foram corados com hematoxilina (30 segundos) – eosina (1 minuto) (HE), e em seguida foi feita a montagem dos cortes com resina (Entelan – MERCK – Brasil) em lâminolas. A análise histológica das lâminas foi realizada por microscópio ótico.

4.4 Procedimentos estatísticos

Após a confecção das lâminas, as mesmas foram avaliadas por um histologista experiente, através de uma análise cega, seguindo um escore pré-definido para: Infiltrado inflamatório, Atividade fibroblástica, Atividade Epitelial e Angiogênese (tabela 1).

Tabela 1: Descrição dos Escores utilizados para avaliação qualitativa das lâminas histológicas.

Escores	Descrição	Preenchimento da lesão
0	Ausente	
1	Pequeno	Até 33%
2	Moderada	33 a 67%
3	Abundante	67 a 100%

O universo amostral foi composto por 4 grupos distintos (Biocure[®], HemCon[®], GenDerm[®] e Coágulo sanguíneo) sendo testados em 3 tempos experimentais (1, 7 e 11 dias) para 4 variáveis independentes (Infiltrado inflamatório, Atividade fibroblástica, Atividade Epitelial e Angiogênese). A avaliação por escores implica no uso de testes estatísticos não-paramétricos.

Para a análise entre materiais em um mesmo tempo experimental, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para comparações duas a duas. As comparações entre tempos diferentes de um mesmo biomaterial foram realizadas pelo teste de Wilcoxon. Todos os testes foram realizados com um nível de significância (α) igual a 5%. O programa estatístico utilizado foi o BioEstat 5.0.

5 RESULTADOS

5.1 Análise Histológica

Os cortes histológicos das feridas cirúrgicas revelaram exuberante presença de células inflamatórias mononucleares, representadas em sua maior parte por neutrófilos. Algumas amostras exibiram presença de células gigantes multinucleadas. As figuras 26, 27 e 28 representam exemplificações dos cortes histológicos de amostras com 1, 7 e 11 dias, respectivamente.

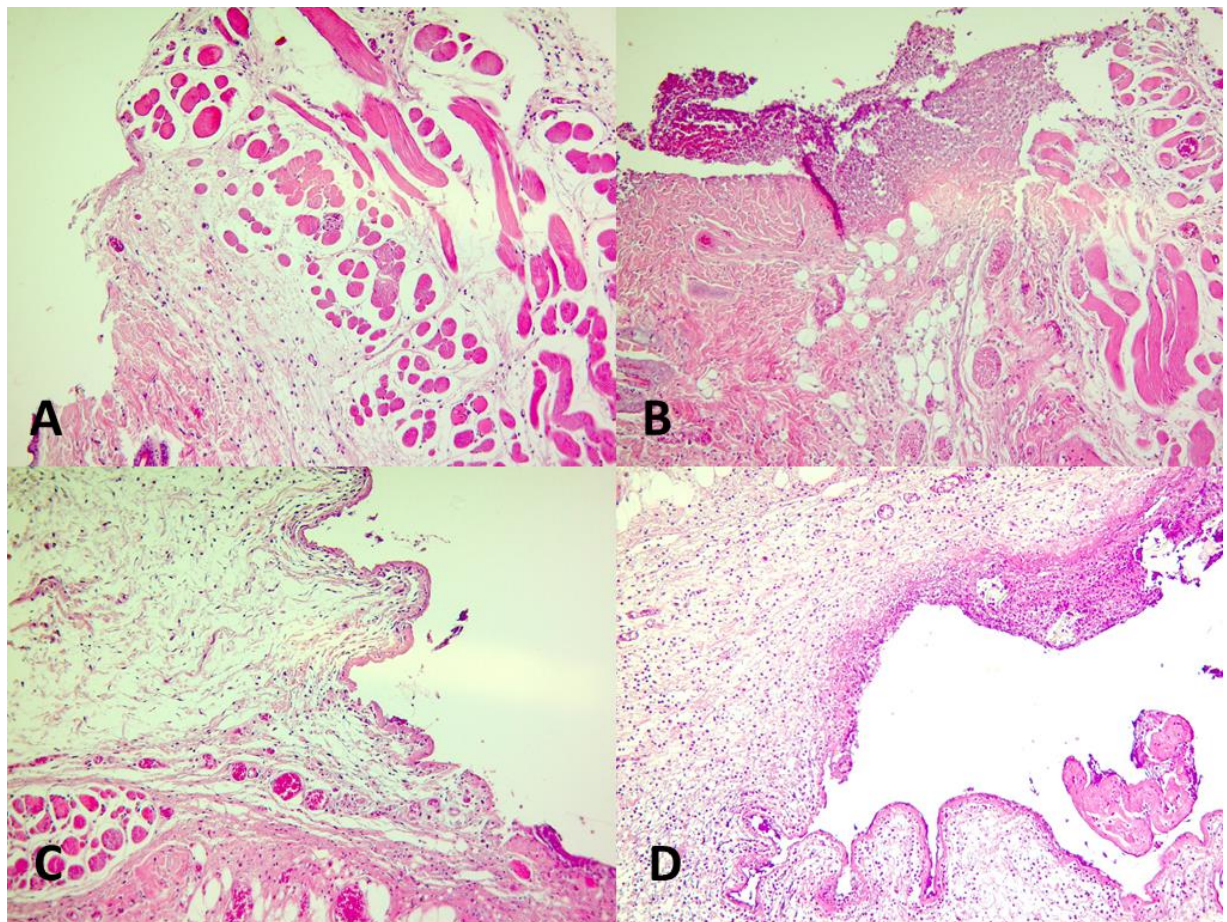


Figura 26 – Fotomicrografias das lesões no período de 1 (um) dia, coloração HE, aumento 10x. A – Grupo Biocure; B – Grupo HemCon; C – Grupo GenDerm; D – Grupo Coágulo (controle)

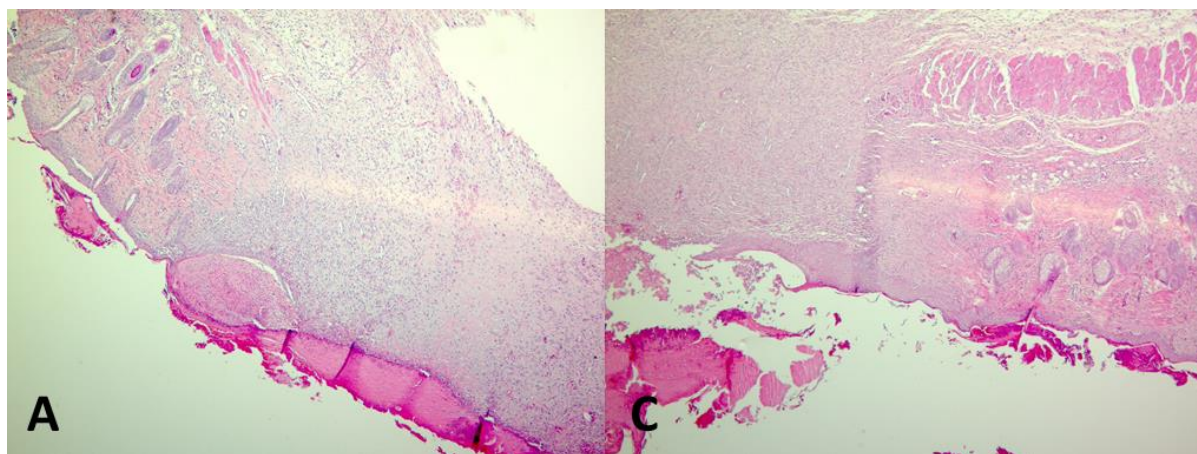


Figura 27 – Fotomicrografias das lesões no período de 7 (sete) dias, coloração HE, aumento 4x. A – Grupo Biocure; C – Grupo GenDerm.

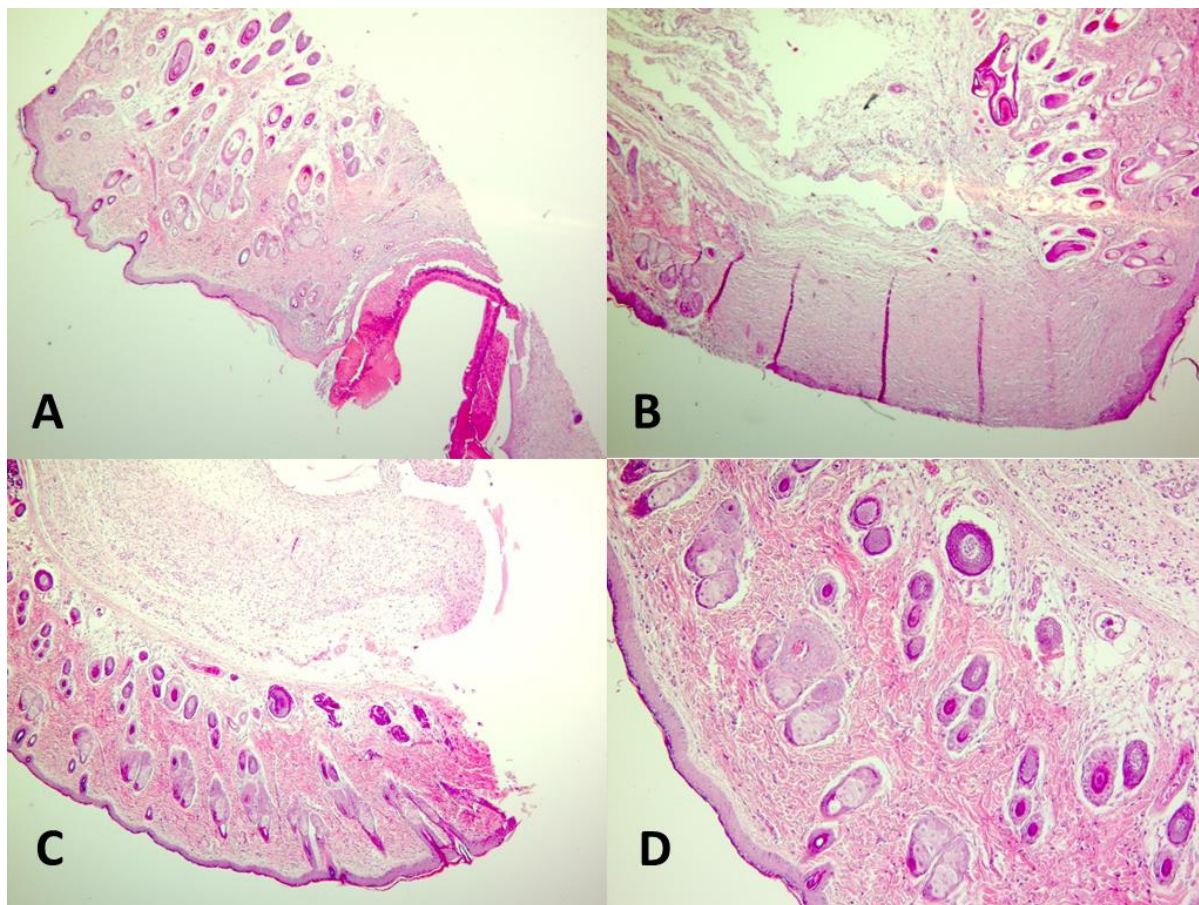


Figura 28 – Fotomicrografias das lesões no período de 11 (onze) dias, coloração HE. A – Grupo Biocure; B – Grupo HemCon; C – Grupo GenDerm; D – Grupo Coágulo (controle)

5.2 Avaliação dos escores

Os resultados da avaliação dos escores de cada variável foram agrupados em tabelas (tabelas 2, 3 e 4) referentes aos tempos experimentais (dias).

5.2.1 1º Dia

A avaliação dos escores ao 1º dia evidenciou que o Grupo Biocure® apresentou menor atividade inflamatória e maior atividade epitelial que os demais grupos. As informações detalhadas da avaliação de cada grupo ao 1º dia estão descritas na tabela 2, bem como a comparação entre eles pode ser visualizada através do gráfico 1.

Tabela 2 – Níveis de significância e conclusão estatística da comparação dos grupos em relação às variáveis estudadas no período de 1 dia.

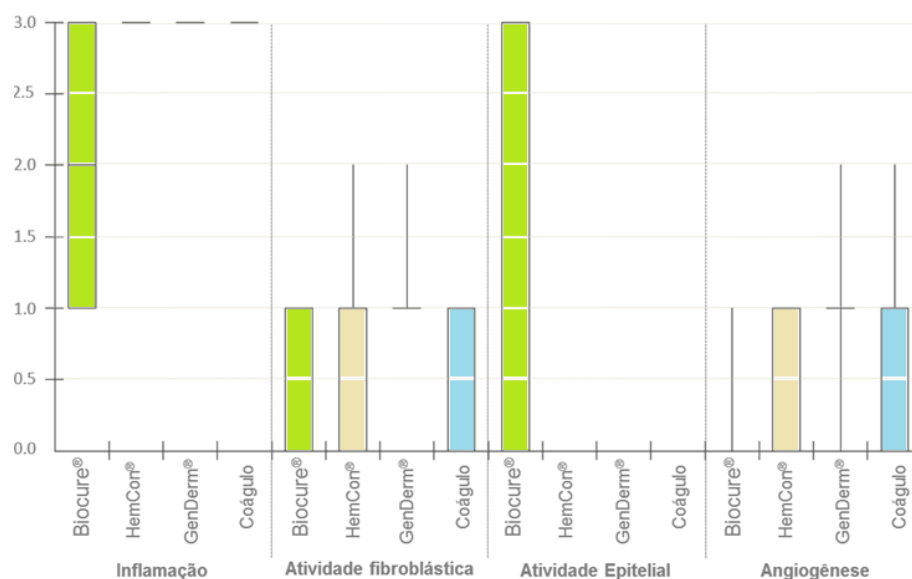
Material	Variável							
	Inflamação		Atividade fibroblástica		Atividade epitelial		Angiogênese	
	α	$\neq$	α	$\neq$	α	$\neq$	α	$\neq$
Biocure® x HemCom®	$p < 0,05$	A < B	ns	A = B	$p < 0,05$	A > B	ns	A = B
Biocure® x GenDerm®	$p < 0,05$	A < C	$p < 0,05$	A < C	$p < 0,05$	A > C	$p < 0,05$	A < C
Biocure® x Coágulo	$p < 0,05$	A < D	ns	A = D	$p < 0,05$	A > D	ns	A = D
HemCom® x GenDerm®	ns	B = C	ns	B = C	ns	B = C	ns	B = C
HemCom® x Coágulo	ns	B = D	ns	B = D	ns	B = D	ns	B = D
Genderm® x Coágulo	ns	C = D	$p < 0,05$	C > D	ns	C = D	ns	C = D

*Pelo teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, ao nível de significância (α) de 5%.

ns = não significativo.

$\neq$ = Conclusão.

Gráfico 1 - Gráfico box-plot de medianas e quartis dos escores da avaliação histológica dos grupos experimentais após o período de 1 dia.



5.2.2 7º Dia

A avaliação dos escores ao 7º dia evidenciou que o Grupo Biocure® apresentou menor atividade epitelial que o grupo GenDerm®, sendo os demais grupos estatisticamente semelhantes nas demais variáveis. As informações detalhadas da avaliação de cada grupo ao 7º dia estão descritas na tabela 3, bem como a comparação entre eles pode ser visualizada através do gráfico 2.

Tabela 3 – Níveis de significância e conclusão estatística da comparação dos grupos em relação às variáveis estudadas no período de 7 dias.

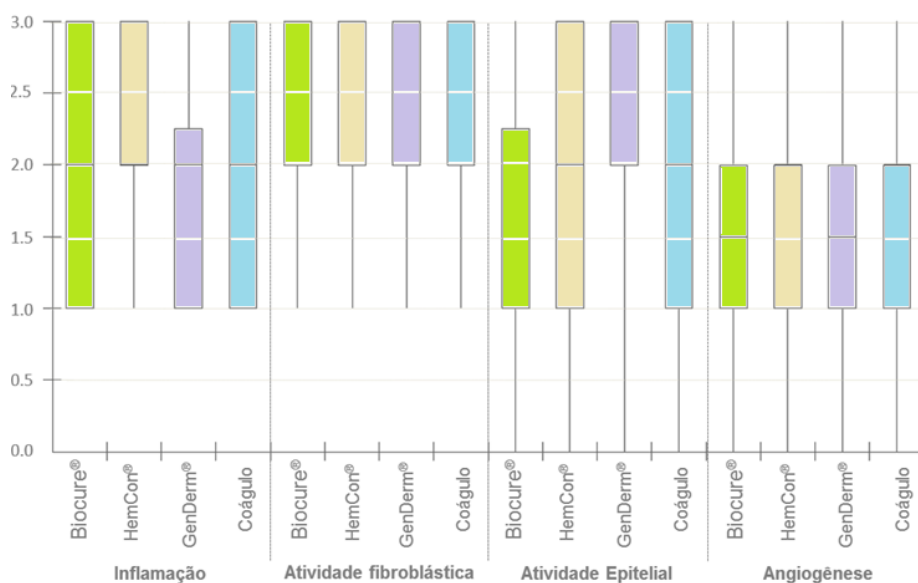
Material	Variável							
	Inflamação		Atividade fibroblástica		Atividade epitelial		Angiogênese	
	α	$\neq$	α	$\neq$	α	$\neq$	α	$\neq$
Biocure® x HemCom®	ns	A = B	ns	A = B	ns	A = B	ns	A = B
Biocure® x GenDerm®	ns	A = C	ns	A = C	$p < 0,05$	A < C	ns	A = C
Biocure® x Coágulo	ns	A = D	ns	A = D	ns	A = D	ns	A = D
HemCom® x GenDerm®	ns	B = C	ns	B = C	ns	B = C	ns	B = C
HemCom® x Coágulo	ns	B = D	ns	B = D	ns	B = D	ns	B = D
Genderm® x Coágulo	ns	C = D	ns	C = D	ns	C = D	ns	C = D

*Pelo teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, ao nível de significância (α) de 5%.

ns = não significativo.

$\neq$ = Conclusão.

Gráfico 2 - Gráfico box-plot de medianas e quartis dos escores da avaliação histológica dos grupos experimentais após o período de 7 dias.



5.2.3 11ºDia

A avaliação dos escores ao 11º dia evidenciou que o Grupo Biocure® apresentou menor atividade inflamatória que o grupo coágulo (controle). O grupo GenDerm® apresentou menor atividade epitelial que o grupo coágulo (controle) e também menor atividade de angiogênese que os demais grupos. As informações detalhadas da avaliação de cada grupo ao 11º dia estão descritas na tabela 4, bem como a comparação entre eles pode ser visualizada através do gráfico 3.

Tabela 4 – Níveis de significância e conclusão estatística da comparação dos grupos em relação às variáveis estudadas no período de 11 dias.

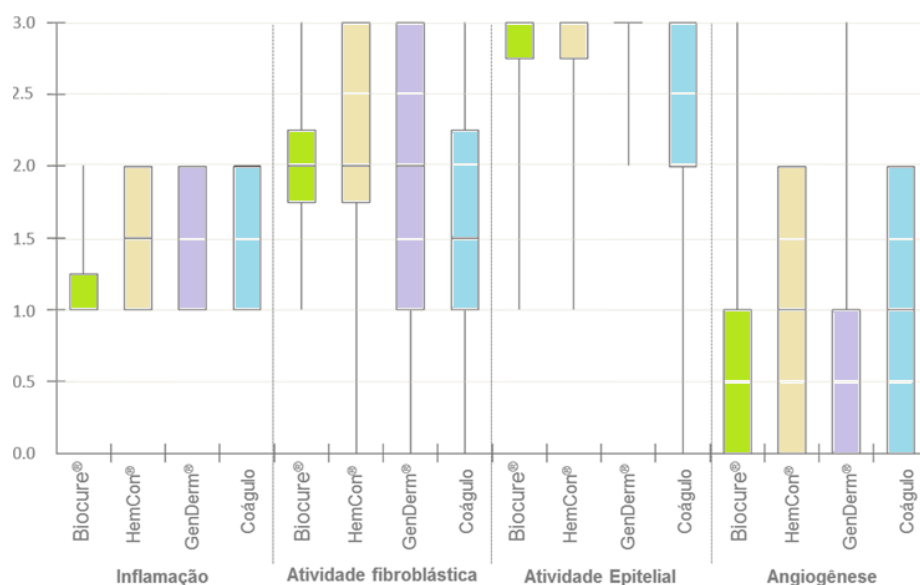
Material	Variável							
	Inflamação		Atividade fibroblástica		Atividade epitelial		Angiogênese	
	α	$\neq$	α	$\neq$	α	$\neq$	α	$\neq$
Biocure® x HemCom®	ns	A = B	ns	A = B	ns	A = B	ns	A = B
Biocure® x GenDerm®	ns	A = C	ns	A = C	ns	A = C	$p < 0,05$	A > C
Biocure® x Coágulo	$p < 0,05$	A < D	ns	A = D	ns	A = D	ns	A = D
HemCom® x GenDerm®	ns	B = C	ns	B = C	ns	B = C	$p < 0,05$	B > C
HemCom® x Coágulo	ns	B = D	ns	B = D	ns	B = D	ns	B = D
Genderm® x Coágulo	ns	C = D	ns	C = D	$p < 0,05$	C < D	$p < 0,05$	C < D

*Pelo teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, ao nível de significância (α) de 5%.

ns = não significativo.

$\neq$ = Conclusão.

Gráfico 3 - Gráfico box-plot de medianas e quartis dos escores da avaliação histológica dos grupos experimentais após o período de 11 dias.



5.2.4 Comparação entre tempos (dias)

A comparação entre tempos (dias) diferentes dos grupos evidenciou que o grupo Biocure não apresentou diferença estatisticamente significativa entre 1 e 7 dias nas variáveis inflamação e atividade epitelial, bem como o grupo GenDerm também apresentou atividade fibroblástica estatisticamente semelhante entre 7 e 11 dias. As informações detalhadas da comparação entre tempos (dias) de cada grupo estão descritas na tabela 5.

Tabela 5 – Níveis de significância e conclusão estatística da comparação dos tempos (dias) em relação aos grupos (materiais) e as variáveis estudadas.

Material	Variável							
	Inflamação		Atividade fibroblástica		Atividade epitelial		Angiogênese	
	α	$\neq$	α	$\neq$	α	$\neq$	α	$\neq$
1 dia x 7 dias								
Biocure®	ns	1 = 7	$p < 0,05$	1 < 7	ns	1 = 7	$p < 0,05$	1 < 7
HemCom®	$p < 0,05$	1 < 7	$p < 0,05$	1 < 7	$p < 0,05$	1 < 7	$p < 0,05$	1 < 7
Genderm®	$p < 0,05$	1 < 7	$p < 0,05$	1 < 7	$p < 0,05$	1 < 7	$p < 0,05$	1 < 7
Coágulo	$p < 0,05$	1 < 7	$p < 0,05$	1 < 7	$p < 0,05$	1 < 7	$p < 0,05$	1 < 7
7 dia x 11 dias								
Biocure®	$p < 0,05$	7 > 11	$p < 0,05$	7 > 11	$p < 0,05$	7 < 11	$p < 0,05$	7 > 11
HemCom®	$p < 0,05$	7 > 11	$p < 0,05$	7 > 11	$p < 0,05$	7 < 11	$p < 0,05$	7 > 11
Genderm®	$p < 0,05$	7 > 11	ns	7 = 11	$p < 0,05$	7 < 11	$p < 0,05$	7 > 11
Coágulo	$p < 0,05$	7 > 11	$p < 0,05$	7 > 11	$p < 0,05$	7 < 11	$p < 0,05$	7 > 11

*Pelo teste de Wilcoxon, ao nível de significância (α) de 5%.

ns = não significativo.

$\neq$ = Conclusão.

6 DISCUSSÃO

Um dos fatores mais importantes para a avaliação de uma biocompatibilidade do material é a sua pronta aceitação pelo hospedeiro, provocando uma resposta inflamatória que deve ser semelhante a do processo de cicatrização normal. Por conta disto, implantes *in vivo* são preferíveis, uma vez que fornecem informações mais realistas do que os sistemas *in vitro* sobre as respostas do hospedeiro na interface entre o material e o meio ambiente circundante (Mrué, 2004).

No nosso estudo foi realizado o estudo histológico com tempos de 1, 7 e 11 dias, buscando-se observar os parâmetros da cicatrização em fases diferentes. Embora os tempos sejam variáveis de acordo com cada espécie e indivíduo, o intuito foi de observar de maneira aproximada o comportamento do tecido em cada fase (inflamatória, proliferativa e maturação).

Os neutrófilos são as primeiras células a serem ativadas na defesa imunológica do hospedeiro contra a infecção. Após a lesão do tecido, estas células migram para o local da inflamação, impulsionadas pelo gradiente quimiotático, para reconhecer e fagocitar bactérias e tecido necrosado. Estes patógenos estão expostos a um arsenal de enzimas hidrolíticas e proteínas bactericidas pré-armazenado nos grânulos azurofílicos dos neutrófilos (Andrade, 2011).

Entre os achados histológicos do nosso estudo, um dos mais relevantes foi o exsudato neutrofílico abundante em algumas amostras, sendo a maioria do grupo coágulo (controle), seguido do grupo GenDerm®. O grupo Biocure® foi o único que não apresentou nenhuma amostra com exsudato neutrofílico, indicando melhor biocompatibilidade deste material em relação aos outros grupos.

O grupo Biocure® induziu menor resposta inflamatória no 1º dia em relação aos outros grupos, sendo no 11º dia também menor que o coágulo (controle). Por outro lado, o grupo Biocure® apresentou maior atividade epitelial no 1º dia em relação aos demais grupos. Estes dados parecem apoiar os achados clínicos de Andrade (2011) que demonstrou que o látex da seringueira *H. brasiliensis* promove um estímulo à cicatrização, especialmente na fase inflamatória. Clinicamente, acredita-se que o comportamento desta membrana seja o encontrado por Xavier

(2008), onde houve aceleração na epitelização, associada a um aumento da hemostasia e diminuição da sensibilidade pós-operatória na área que recebeu a biomembrana.

O grupo HemCon[®] foi o único que não apresentou diferença estatística em nenhuma variável no 1º dia quando comparado ao coágulo (controle), e também apresentou-se estatisticamente igual ou menor que os demais grupos no período de 7 e 11 dias, sendo superior apenas ao grupo GenDerm[®] na variável angiogênese com 11 dias. Apesar de alguns trabalhos demonstrarem propriedades hemostáticas e melhora do processo de reparo (Malmquist et al., 2008), proliferação de fibroblastos e angiogênese (Jayakumar, 2011; Kim, 2008, Muzzarelli, 2009), no presente estudo não foi observada sua influência acelerando o processo de cicatrização.

O grupo GenDerm[®] apresentou as menores atividade epitelial e angiogênese, sendo menor inclusive que o grupo controle (coágulo) no período de 11 dias. Essas informações demonstram que o material de alguma maneira interfere na migração e atividade epitelial, além de uma formação não adequada do tecido de granulação, evidenciado pela menor angiogênese. Na avaliação dos grupos em tempos diferentes (tabela 5), o Genderm[®] foi o único que não apresentou melhora da atividade fibroblástica na comparação entre 7 e 11 dias. A persistência da atividade fibroblástica em 11 dias demonstra que a cicatrização ainda permanece na fase proliferativa e possivelmente evoluirá com a formação de cicatriz hipertrófica, com grandes quantidades de colágeno. A comparação com o grupo controle leva ao entendimento que este material provocou um atraso no processo normal de cicatrização.

7 CONCLUSÕES

A análise dos resultados demonstrou que o grupo Biocure® apresentou infiltrado inflamatório significativamente menor que os demais grupos no 1º dia e maior atividade epitelial na comparação com os mesmos, sendo as demais variáveis semelhantes aos outros grupos. Ao 7º dia apenas o grupo GenDerm® apresentou atividade epitelial menor que o grupo Biocure, sendo os outros grupos nas demais variáveis sem diferenças estatísticas. Ao 11º dia o grupo GenDerm® apresentou menor atividade de angiogênese que os demais grupos, sendo todos os grupos semelhantes nas demais variáveis. No presente estudo, o grupo Biocure® favoreceu o processo de cicatrização, o grupo HemCon® não apresentou diferenças estatisticamente significantes que permitam inferir que este possa estimular o processo de cicatrização, e por outro lado o grupo Genderm® parece interferir retardando o processo cicatricial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade TAM, Iyer A, Das PK, Foss NT, Garcia SB, Coutinho-Netto J, Jordão-Jr AA, Frade MAC. The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in mice. *Braz J Med Biol Res* 2011;44(10):1036-1047

Azargoon H, Benjamin JW, Sokomon ES, Kessler HP, He J, Spears R. Assessment of hemostatic efficacy and osseous wound healing using HemCon dental dressing. *JOE* 2011; 37(6):807-811.

Bagheri SC, Bell RB, Khan HA. Clinical Review of Oral and Maxillofacial Surgery. Elsevier Health Sciences. 2013

Balabanian CA, Coutinho-Netto J, Lamano-Carvalho TL, Lacerda SA, Brentegani LG. Biocompatibility of natural latex implanted into dental alveolus of rats. *J Oral Sci* 2006; 48:201-205.

Bernabé PF, Gomes-Filho JE, Cintra LT, Moretto MJ, Lodi CS, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Dezan E Jr. Histologic evaluation of the use of membrane, bone graft, and MTA in apical surgery. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010; 109(2):309-314.

Broughton II G, Janis JE, Attinger CE. Wound healing: an overview. *Plastic and reconstructive surgery* 2006; 117(7S):1e-S. (a)

Broughton II G, Janis JE, Attinger CE. The basic science of Wound healing: an overview. *Plastic and reconstructive surgery* 2006; 117(Suppl):12S. (b)

Burkatovskaya M, Tegos GP, Swietlik E, Demidova TN, Castano A & Hamblin MR. Use of chitosan bandage to prevent fatal infections developing from highly contaminated wounds in mice. *J. Biomaterials* 2006; 27(2):4157-4164.

Chatelet C, Damour O, Domard A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials* 2001; 22:261–8.

Cui Xu, Zhao D, Zhang B, Gao Y. Osteogenesis mechanism of chitosan-coated calcium sulfate pellets on the restoration of segmental bone defects. *Journal of Craniofacial Surgery* 2009; 20(5):1445-1450.

Dai T, Tanaka M, Huang YY, Hamblin MR. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011;9:857–79

Damy SB, Camargo RS, Chammas R, Figueiredo LFPD. Aspectos fundamentais da experimentação animal-aplicações em cirurgia experimental. *Revista da Associação Médica Brasileira* 2010; 56(1): 103-111.

Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E. Chitosan—a versatile semisynthetic polymer in biomedical. *Progress in Polymer Science* 2011; 678.

Edeoga HO, Okwu DE, Mbaebie BO. Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology* 2005; 4: 685–688.

Figueiredo IST, Ramos MV, Ricardo NMPS, Gonzaga MLC, Pinheiro RSP, Alencar NMN. Efficacy of a membrane composed of polyvinyl alcohol as a vehicle for releasing of wound healing proteins belonging to latex of *Calotropis procera*. *Process Biochemistry* 2014; 49: 512–519.

Gurtner, GC, Werner, S, Barrandon, Y, Longaker, MT. Wound repair and regeneration. *Nature* 2008; 453(7193):314-321.

Herculani PP; Cestari TM, Taga EM, Taga R. Tratamento de defeito ósseo perene em calvária de cobaia com membrana de cortival óssea bovina liofilizada associada ou não a enxerto ósseo bovino desmineralizado. *Rev Bras Implant* 2000; 1(1):7-14.

Huang S, Fu X. Naturally derived materials-based cell and drug delivery systems in skin regeneration. *J Control Release* 2010;142:149–59.

Jayakumar R, Prabakaran M, Nair SV, Tamura H. Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications. *Biotechnol Adv* 2010;28:142–50.

Jayakumar R, Prabakaran M, Sudheesh Kumar PT, Nair SV, Tamura H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnol Adv* 2011;29:322–37.

Kale TP, Singh AK, Kotrashetti SM, and Kapoor A. Effectiveness of Hemcon Dental Dressing versus Conventional Method of Haemostasis in 40 Patients on Oral Antiplatelet Drugs, Sultan Qaboos. *Univ Med J*. 2012;12(3):330–335.

Khoushab F, Yamabhai M. Chitin research revisited. *Mar Drugs* 2010;8:1988–2012.

Kim IY, Seo SJ, Moon HS, Yoo MK, Park IY, Kim BC, et al. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnol Adv* 2008;26:1–21.

Koide SS. Chitin-chitosan: properties, benefits and risks. *Nutr Res* 1998;13:1091–101.

- Korpenwar, A.N., 2012. Ethnomedicinal plants used by tribal's in cure of wounds in Buldhana District (MS) India. *International Journal of Recent Trends in Science and Technology* 2012; 3(2): 49–53.
- Madihally SV. Processing chitosan for tissue regeneration. *Curr Trends Polym Sci* 2011;15:83–8.
- Malafaya PB, Silva GA, Reis RL. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59:207–33.
- Malmquist JP, Clemens SC, Oien HJ. Hemostasis of oral surgery wounds with the HemCon Dental Dressing. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008; 66: 1177-1183.
- Miloro M. Peterson's Principals of Oral and Maxillofacial Surgery. 2 ed. Philadelphia: BC Decker. 2004.
- Moura LI, Dias A, Carvalho E, de Sousa HC. Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment – A review. *Acta biomaterialia* 2013; 9(7):7093-7114.
- Mrué F, Coutinho-Netto J, Ceneviva R, Lachat JJ, Thomazini JA, Tambelini H. Evaluation of the biocompatibility of new biomembrane. *Mat Res* 2004; 7:277-283.
- Muzzarelli RAA. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydr Polym* 2009;76:167–82.
- Pérez RA, Won J, Knowles JC, Kim H. Naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2012.
- Rainaldi G, Calcabrini A, Santini MT. Positively charged polymer polylysine-induced cell adhesion molecule redistribution in K562 cells. *J Mat Sci Mat Med* 1998; 9(12): 755-760.
- Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog Polym Sci* 2006;31:603–32.
- Sanchez MPR; Marzola C; Taga R. Avaliação microscópica em ratos (wistar albinus) de implantes de matriz de osso bovino liofilizado “Biograft” + proteína morfogenética + membrana reabsorvível de osso bovino liofilizado Dentoflex”. *Rev. Brasileira Cirurgia e Implantodontia.* 2000;7(27):30-39.
- Sell SA, Wolfe PS, Garg K, McCool JM, Rodriguez IA, Bowlin GL. The use of natural polymers in tissue engineering: a focus on electrospun extracellular matrix analogues. *Polym Adv Technol* 2010;2:522–53.

Silva EB, Maniscalco CL. Palatoplastia com biomembrana natural de látex com polilisina a 0,1% em cães com defeito palatino experimentalmente induzido. *Seminário: Ciências Agrárias, Londrina* 2013; 34(2):785-792.

Singh M, Govindarajan R, Nath V, Rawat AK, Mehrotra S. Antimicrobial, wound healing and antioxidant activity of *Plagiochasma appendiculatum* Lehm. et Lind. *Journal of Ethnopharmacology* 2006;107: 67–72.

Singh MP, Lumpkin JA, Rosenblatt J. Effect of electrostatic interactions on polylysine release rates from collagen matrices and comparison with model predictions. *Journal of controlled release* 1995; 35(2):165-179.

Tabata Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. *Journal of the Royal Society Interface* 2009:S311–24.

Taga R, Cestari TM, Taga, Assis GF, Marine MG. Avaliação histológica, radiográfica e morfométrica de reparação de defeito ósseo perene em crânio de cobaia tratado com mistura de osseobond e membrana de cortical óssea bovina em posição subperióstica na calvária de cobaia. *JBE – Jornal Brasileiro de Endo/Perio* 2000; 1(1):78-87.

Taga R, Hassunuma CY, Cestari TM, Ferreira PM. Destino de membrana de cortical óssea bovina colocada em posição subperióstica na calvária de cobaia. *Rev. Bras. Implant.* 1997; 3(6) 24-29.

Takei T, Nakahara H, Ijima H, Kawakami K. Synthesis of a chitosan derivative soluble at neutral pH and gellable by freeze-thawing, and its application in wound care. *Acta Biomater* 2012; 8: 686–93.

Tessmar JK, Gopferich AM. Matrices and scaffolds for protein delivery in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;58:274–91.

Thakur R, Jain N, Pathak R, Sandhu SS. Practices in wound healing studies of plants. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2011;(2011) 17 pages, Article ID 438056, doi:10.1155/2011/438056.

Thankamma L. Hevea latex as wound healer and pain killer. *Current Science* 2003; 84: 971–972.

Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. *The Journal of International Medical Research* 2009; 37:1528 – 1542

Xavier NL, Ferrão Júnior JP, Magalhães D, Farias FO, Coelho AAK. Aceleração da fase inicial de reparação tecidual em área doadora de enxerto gengival livre utilizando membrana de látex. *Rev Odontol UNESP* 2008;37(2):69-73.

ANEXO A

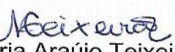
AUTORIZAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comissão de Ética no Uso de Animais / CEUA

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 539/2013 do Pesquisador José Peixoto Ferrão Jr, referente ao projeto de pesquisa “Avaliação histológica da cicatrização de feridas cirúrgicas padronizadas em ratos utilizando três biomateriais”, está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião ordinária do dia 18 de outubro de 2013.


Mária Araújo Teixeira
Coordenadora da CEUA/UFMS

Campo Grande, 29 de setembro de 2013.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
<http://www.propp.ufms.br/ceua>
ceua@propp.ufms.br
fone (67) 3345-7184