

HÉLIO HENRIQUE NETO

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO PROCESSO INFLAMATÓRIO EM CALVÁRIA
DE RATOS UTILIZANDO 3 BIOMATERIAIS**

CAMPO GRANDE

2015

HÉLIO HENRIQUE NETO

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO PROCESSO INFLAMATÓRIO EM CALVÁRIA
DE RATOS UTILIZANDO 3 BIOMATERIAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. José Peixoto Ferrão Junior

CAMPO GRANDE

2015

FOLHA DE APROVAÇÃO

HÉLIO HENRIQUE NETO

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO PROCESSO INFLAMATÓRIO
EM CALVÁRIA DE RATOS UTILIZANDO 3 BIOMATERIAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de mestre.

Resultado Final:

Campo Grande (MS) _____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Peixoto Ferrão Júnior
Instituição: UFMS

Prof. Dr. Alan Augusto Kalife Coelho
Instituição: UFMS

Prof^a. Dr^a. Nára Rejane Santos Pereira
Instituição: UFMS

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Liel** e **Cida** pelo amor, suporte e exemplos que devo seguir, sem vocês nada valeria a pena.

À minha amada mulher **Carol** que sempre esteve ao meu lado nos momentos difíceis e alegres, por confiar em mim, por acreditar em mim, pelas broncas necessárias e principalmente por fazer minha vida ter sentido, TE AMO!

À meus filhos **Caio** e **Theodora** por me darem uma razão pra viver.

Ao meu irmão **Yuri** por todo apoio na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** e ao senhor **Jesus** pela família maravilhosa que eu possuo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. **José Peixoto Ferrão Júnior** pelo aprendizado nesses anos e por ter me dado a chance de realizar um sonho.

À Profª Drª **Nára Rejane Santos Pereira** por ter me ajudado na correção do meu trabalho e por ter disposto seu tempo para me ajudar.

À Profª Drª **Márcia Rodrigues Gorisch** pela leitura das lâminas e pelas dúvidas sanadas.

Aos meus **amigos** de mestrado pela convivência e conhecimentos trocados nesses anos.

"Instruir-te-ei e ensinar-te-ei o caminho em que deves andar, guiar-te-ei com os meus olhos, e sobre as minhas asas te darei conselhos" (Salmo 32:8).

RESUMO

NETO, HH. Análise histológica do processo inflamatório em calvária de ratos utilizando 3 biomateriais. Campo Grande; 2015. [Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Universidade Federal de Mato Grosso Sul].

Este estudo visou pesquisar o efeito biológico na reparação de feridas cruentas. Foram utilizados 30 ratos wistar machos e efetuadas quatro lesões padronizadas na calvária de cada animal onde: lesão superior esquerda foi utilizada uma biomembrana de látex com polisina 0,1%; lesão superior direita foi utilizada uma biomembrana com quitosana; lesão inferior direita membrana liofilizada de cortical óssea; lesão inferior esquerda o coágulo sanguíneo (controle). Posteriormente, os animais foram divididos em três grupos e cada grupo sacrificado nos respectivos tempos de 1 dia (T1), 7 dias (T2) e 11 dias (T3) após a cirurgia. Foram confeccionadas lâminas histológicas coradas com H.E. Essas lâminas passaram por avaliação por um histologista experiente (ensaio cego) e classificadas seguindo um escore pré-definido para inflamação, hiperemia, hemorragia e tipo de processo inflamatório. Fez-se a análise estatística com os testes de Friedman e Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn. Na avaliação da inflamação, hiperemia e hemorragia os resultados demonstraram que o grupo biocure apresentou resultados em T1 significativamente menor que os outros materiais testados ($p=0,008$); ($p=0,003$); ($p=0,004$), respectivamente, na avaliação do tipo de processo inflamatório, foi significativa a diferença do no grupo tratado com Hemcon[®] ($p=0,002$), sendo $T1>T3$; assim como no tratamento com Genderm[®] ($p=0,0006$), onde $T1>T3$ e no grupo Coágulo ($p=0,002$) onde $T1>T3$. O grupo tratado com a membrana Biocure apresentou resultados superiores quando comparados aos outros materiais testados.

Palavras chave: Enxerto gengival livre; Quitosana; Biomembrana de látex.

ABSTRACT

NETO, HH. Histological analysis of the inflammatory process in rat calvaria using 3 biomaterials. Campo Grande; 2015. [Dissertation of Mestrado - Postgraduate Program in Dentistry - Universidade Federal de Mato Grosso Sul].

This study aimed to find the biological effect in the repair of bloody wounds. A total of 30 male Wistar rats and made four standardized lesions in the skull of each animal where: Top left lesion was used a latex biomembrama with Polissina 0.1%; injury upper right we used a biomembrane with chitosan; lower injury right lyophilized bone cortical membrane; injury left lower blood clot (control). Subsequently, the animals were divided into three groups and each group sacrificed at the respective time of 1 day (T1), 7 days (T2) and 11 days (T3) after surgery. Histological slides stained with HE were prepared These blades have undergone evaluation by an experienced histologist (blind test) and classified following a predefined score for inflammation, hyperemia, hemorrhage and type of inflammatory process. There was a statistical analysis using the Friedman and Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test. In the evaluation of inflammation, redness and bleeding results showed that Biocure group showed significantly lower results than others T1 tested materials ($p = 0.008$); ($P = 0.003$); ($P = 0.004$), respectively, to evaluate the type of inflammation, significant difference was observed in the group treated with Hemcon® ($p = 0.002$), and $T1 > T3$; as well as Genderm® treatment ($p = 0.0006$), where $T1 > T3$ and clot group ($p = 0.002$) where $T1 > T3$. The group treated with Biocure membrane showed superior results when compared to other tested materials.

Keyword: Free gingival graft; Chitosan; Latex biomembrane.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EGL – Enxerto Gengival Livre

UFMS – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

CEUA – Comitê de Ética em Uso de Animais

CCBS – Centro de Ciências Biológicas e de Saúde

HE – Hematoxilina e Eosina

PMN'S – Polimorfonucleares

FDA – Food and drugs administration

BMP- Bone morphogenetic protein

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

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição dos Escores utilizados para avaliação qualitativa das lâminas histológicas.....	35
Tabela 2: Descrição dos escores utilizados para avaliação do tipo de processo inflamatório.....	35
Tabela 3: Valores máximo, mínimo e a mediana do escore registrado nos diferentes materiais estudados, nos diferentes períodos de avaliação.....	39
Tabela 4: Valores máximo, mínimo e a mediana do escore registrado nos diferentes materiais estudados, nos diferentes períodos de avaliação.....	40
Tabela 5 – Valores máximo, mínimo e a mediana do escore registrado nos diferentes materiais estudados, nos diferentes períodos de avaliação.....	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Gaiola com animais.....	28
Figura 2: Armazenamento das gaiolas.....	28
Figura 3: Contenção manual e anestesia intraperitoneal.....	29
Figura 4: Cloridrato de quetamina (Dopalen®).....	30
Figura 5: Cloridrato de xilazina (Anasedan®).....	30
Figura 6: Mesa para preparação dos animais.....	30
Figura 7: Tricotomia.....	30
Figura 8: Mesa para procedimentos cirúrgicos	30
Figura 9: Bisturi circular.....	31
Figura 10: Contra-ângulo.....	31
Figura 11: Motor de implante.....	31
Figura 12: Lesão na calvária.....	31
Figura 13: Lesão protegida com biocure.....	32
Figura 14: Biocure.....	32
Figura 15: Lesão protegida com Hencom®	32
Figura 16: Hencom®	32
Figura 17: Lesão protegida com GenDerm®	32
Figura 18: GenDerm®	32
Figura 19: Antimicrobiano de amplo espectro.....	33
Figura 20: Analgésico.....	33
Figura 21: Remoção das peças.....	33
Figura 22: Peça da calvária.....	33

Figura 23: Peças acondicionadas e identificadas.....	34
Figura 24: Frascos com formol.....	34
Figura 25: Fotomicrografias das lesões no período de 7 dias, coloração HE, aumento 10x Processo inflamatório crônico (2);hemorragia(3); Grupo D-controle.....	36
Figura 26: Fotomicrografias das lesões no período de 7 dias, coloração HE, aumento 10x Processo inflamatório agudo (1); Grupo B-Hemcon.....	36
Figura 27: Fotomicrografias das lesões no período de 7 dias, coloração HE, aumento 40x Processo inflamatório misto(3); Grupo A-Biocure.....	37

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Gráfico representando o percentual de animais classificados de acordo com o tipo de processo inflamatório (aguda, crônica ou mista) nos diferentes tratamentos.....	38
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 Enxerto gengival livre.....	18
2.2 Biocure.....	20
2.3 Hencom®.....	22
2.4 GenDerm®.....	26
3 OBJETIVOS.....	27
3.1 Objetivo geral.....	27
3.2 Objetivo específico.....	27
4 MATERIAIS E MÉTODO.....	28
4.1 Animais.....	28
4.2 Procedimentos cirúrgicos.....	29
4.3 Procedimentos histológicos.....	34
4.4 Procedimentos estatísticos.....	35
5 RESULTADOS.....	36
5.1 Análise histológica.....	36
5.2 Avaliação dos escores.....	37
5.3 Variáveis.....	37
6 DISCUSSÃO.....	42
7 CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS.....	46
ANEXO A – COMISSÃO DE ÉTICA.....	52

1 INTRODUÇÃO

As feridas cirúrgicas representam um problema clínico muito desafiador onde conhecer o processo de reparo e saber tratar o problema é essencial na clínica diária. É sabido que o processo de reparo envolve três fases distintas: inflamação, proliferação e maturação e tem-se concentrado muito esforço para o entendimento da fisiologia da cicatrização com ênfase em novas abordagens terapêuticas e um contínuo desenvolvimento de tecnologias curativas. A cicatrização é um dos processos mais estudados atualmente. Pesquisas têm avaliado a importância de sua estimulação na reabilitação funcional e estética do paciente (VELNAR et al., 2009).

Na odontologia, especialmente na periodontia, ocorreu um aumento significativo na procura para correção de problemas estéticos associados a gengiva e a técnica cirúrgica de escolha para se corrigir uma área onde a gengiva está ausente ou escassa é o enxerto gengival livre (EGL) ele envolve a remoção de tecido de uma área doadora e sua transferência para uma área receptora provocando assim uma ferida cirúrgica. Quando tecidos moles são escoriados e o tecido conjuntivo é exposto, ocorre à formação de úlceras, tanto em pele quanto em mucosas e por ser removido o epitélio, a região torna-se cruenta, deixando o paciente susceptível a dor e a hemorragia tardia (SILVA et al., 2008), apesar disso, não existem grandes mudanças no procedimento ou na proteção da área doadora que possibilitam o conforto do paciente (BOSCO et al., 1996).

As técnicas cirúrgicas de enxertia gengival são empregadas quando há necessidade de reparar uma área onde a gengiva queratinizada é estreita ou até mesmo ausente (FEITOSA et al., 2008). É necessário lembrar que o periodonto de proteção necessita de condições mínimas para restabelecer sua homeostasia, dentre estas, é de extrema importância a presença de uma faixa de mucosa queratinizada na área marginal (RESENDE et al., 2009). O enxerto gengival livre representa a principal técnica cirúrgica para aumento na largura do tecido queratinizado, aumento da extensão do vestibulo e eliminação de inserções de freios, mostrando-se como um procedimento previsível para o tratamento desses problemas.

A progressão de cura da ferida cirúrgica envolve a orquestração de complexas interações entre células, componentes da matriz extracelular e mediadores químicos. Após hemostasia e a formação de coágulos o processo de cura pode ser dividido em três fases que se sobrepõem: inflamação, proliferação e reparo. A inflamação inicia-se em poucos minutos após uma lesão e os primeiros mediadores inflamatórios são os leucócitos, ou seja, os neutrófilos que migram através do endotélio dos vasos sanguíneos locais, e monócitos que migram do sangue para os tecidos e diferenciam em macrófagos. Este último inicia respostas inflamatórias através da secreção de citocinas, e recrutam mais células imunes para o local da infecção (MUZZARELLI, 2009). No processo de reparação tecidual, a regeneração e a cicatrização devem ser consideradas como eventos distintos, que agem em conjunto a fim de restaurar a estrutura anatômica e a função da região afetada (BLANES, 2004).

A biomembrana de látex é um produto natural extraído da seringueira *Hevea brasiliensis* sendo um material biocompatível desenvolvido na faculdade de medicina da USP, Ribeirão Preto (PAULO et al., 2005; GANGA et al., 2012) sendo fabricada por um processo diferente do convencional utilizada nas indústrias por ser o látex banhado após o processamento pela proteína polilisina (MRUE et al., 2004). A polilisina é usada rotineiramente na histologia, sendo uma poliamina sintética capaz de facilitar a adesão celular sobre superfícies vítreas, acredita-se que a adsorção celular forçada pela polilisina seja promovida pelas interações eletrostáticas entre a membrana celular e a superfície da poliamina (PAULO et al., 2005). Experimentos realizados em cães demonstraram que este biomaterial se apresentou como um importante indutor na cicatrização de feridas destacando propriedades como a neoangiogênese, epitelização e formação de fibras musculares (FRADE et al., 2004) e por induzir a aceleração dos processos cicatriciais como o estímulo da angiogênese, proliferação fibroblástica e reconstituição tecidual, é atribuído a essa biomembrana um melhor pós-operatório (PAULO et al., 2005).

A quitosana é um polímero produzido pela desacetilização parcial da quitina encontrada em exoesqueletos de alguns crustáceos e fungos (SILVA et al., 2006). É um polissacarídeo compreendendo copolímeros de glucosamina (b-1,4-2-amino-2-deoxy-D-glucose) e N-acetilglucosamina (2-acetamido-2-deoxy-D-glucose). É um material biocompatível, biodegradável e bacteriostático capaz de inibir bactérias

Gram positivas e Gram negativas (XU et al.,2009). Como membrana a quitosana demonstrou excelente reparação tecidual com aumento na formação óssea incluindo osteoindução, osteointegrabilidade, efeito coagulante e analgésico, é de fácil aplicação, possui biodegradabilidade gradual beneficiando a regeneração tecidual (ARDAKANI et al., 2011).

Foi introduzida recentemente no mercado brasileiro uma membrana biológica liofilizada da cortical óssea bovina (GenDerm®) que constitui-se basicamente de fibras colágenas alta e naturalmente estruturadas. Tem sido utilizada rotineiramente com sucesso na clínica odontológica em casos de lesões ósseas periodontais ou associadas a implantes osteointegrados e alguns trabalhos histológicos em modelos animais demonstraram a capacidade osteopromotora desta membrana (TAGA et al., 2000).

Pensando na cicatrização da área doadora, foi proposta a utilização de três biomateriais que foram objetos de estudo desse trabalho: Uma biomembrana de látex com polilisina 0,1% (BIOCURE, PeleNova®), uma biomembrana impregnada com quitosana (CHITOFLEX, HENCOM®-USA) e uma membrana biológica liofilizada de cortical óssea bovina (GenDerm®). Espera-se que os resultados dessa pesquisa possam mostrar os estímulos desses curativos frente ao reparo epitelial das lesões protegidas por eles, pois os relatos da utilização de curativos de colágeno, látex e quitosana em áreas doadoras de enxerto em cirurgias mucogengivais, ainda são escassos na literatura.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Enxerto gengival livre

O enxerto gengival livre é a principal técnica cirúrgica para ganhar, aumentar e melhorar a qualidade e quantidade de tecido gengival queratinizado. Consiste na remoção de um tecido do leito doador e sua inserção no leito receptor. Normalmente a região de escolha é o palato pela boa quantidade e qualidade da camada de revestimento queratinizado da região, porém, bons enxertos podem ser retirados da tuberosidade ou crista edêntula (CAMIO et al, 2010).

Silva et al., em 2008, recomendaram as intervenções cirúrgicas para recuperação da faixa perdida ou ausente de tecido gengival queratinizado a partir do momento em que há o comprometimento da higiene oral, inflamação e aumento de recessões.

Para Feitosa et al. (2008), a necessidade de uma cirurgia para se obter o EGL é uma limitação a técnica pois o leito doador fica cruento e desprotegido, geralmente levando a desconforto doloroso ao paciente e risco de hemorragia tardia.

Pouca ênfase tem se dado as áreas doadoras e novas alternativas devem ser pesquisadas com o objetivo de favorecer a cicatrização do leito doador e assim diminuir o desconforto do paciente (BOSCO et al., 1996). Alguns materiais são aplicados no intuito de promover uma proteção mecânica na área doadora (cimento cirúrgico, placa de acetato, micropore, etc.) (RESENDE et al., 2009), fragmentos de enxerto autógeno (BOSCO et al., 1996), colágeno hemostático microfibrilar (WIRTHLIN et al., 1980), no entanto, nenhum deles é capaz de induzir a aceleração da reparação.

Schrott, em 2009, afirmou que não é possível convencionar qual a faixa ideal de tecido queratinizado para indicar uma intervenção cirúrgica, considera-se que níveis inferiores a 2 mm seja um indicativo de necessidade de ação cirúrgica para seu aumento, visando a saúde bucal do paciente.

Santamaria, em 2011, relatou que aumentar a faixa de tecido queratinizado na presença de comprometimentos a saúde periodontal é orientada pelo papel de

barreira que o tecido queratinizado exerce, com efeito protetivo às agressões teciduais.

Para Costa et al. (2011), o EGL é uma excelente opção para o tratamento da recessão gengival, que é marcada pelo deslocamento vertical do tecido da gengiva rumo ao terço apical podendo trazer desconforto ao paciente.

Segundo Germiniani et al. (2011), o impacto estético das deformidades ou alterações mucogengivais junto com os efeitos dolorosos destas condições é a principal motivação entre os pacientes para buscar tratamento especializado.

A técnica cirúrgica do EGL consiste na remoção de tecido epitelial de uma região doadora e sua inserção no leito receptor com período de cicatrização que geralmente não ultrapassa os 15 dias e com resultados estéticos em curto prazo (PACHECO e HENRIQUES, 2011).

A relevância da presença de uma faixa de tecido queratinizado na manutenção da saúde periimplantar já gerou muitas controvérsias na literatura. Atualmente sabe-se que o EGL é uma técnica com bons resultados para diversos problemas do periodonto, dentre os quais a recuperação da faixa de gengiva queratinizada e restabelecimento da margem gengival (WENNSTRÖM e DERKS, 2012). Com resultados seguros e previsíveis na melhoria da faixa de queratina da gengiva recuperando a barreira gengival contra agressões teciduais (ALMEIDA et al., 2012), diversos estudos têm demonstrado que a presença de gengiva queratinizada ao redor dos implantes osseointegrados apresenta benefícios como contribuir para o selamento e prevenção da inflamação periimplantar, imobilização e diminuição da probabilidade de colapso dos tecidos moles, simplificação do processo de moldagem e principalmente, na facilitação da higienização da área do implante por parte do paciente (ESPER et al., 2012).

Silva et al. (2010) em um estudo clínico prospectivo com o objetivo de avaliar a influência do cigarro sobre o enxerto gengival livre. Eles avaliaram as alterações dimensionais do local e a cicatrização da área doadora, utilizando doze não-fumantes e 10 fumantes com indicação de EGL para aumentar dimensões de tecido queratinizado na área dos incisivos inferiores e avaliaram com até 90 dias de pós-operatório. A área palatal doadora foi avaliada para imediato sangramento e epitelização completa da ferida. Concluíram que o cigarro altera a cicatrização da

ferida cirúrgica pela diminuição do sangramento imediato e por atrasar a epitelização da ferida.

Para Ferrão Jr. et al. (2012), em duas semanas, normalmente, o paciente está recuperado e nesse espaço de tempo a queixa mais comum é em relação a dor e desconforto na região doadora.

2.2 Biocure

A biocure é uma biomembrana de látex natural, desenvolvida pelo departamento de bioquímica da faculdade de medicina da universidade de Ribeirão Preto em 1994. Ela é confeccionada a partir do látex da seringueira "*hevea brasiliensis*" e fabricada diferente do método tradicional usado na indústria da borracha porque é banhada pela proteína polisina a 0,1% que aumenta a permeabilidade e o fluxo microvascular (MRUE et al., 2004).

O látex natural é um cicatrizante, uma defesa natural da planta. Muitas pesquisas com este material, em diferentes tecidos, têm demonstrado resultados extremamente satisfatórios, o que motiva a realização de novos trabalhos nesta área. Próteses desse material foram desenvolvidas na Universidade de São Paulo em que a membrana de látex natural foi utilizada com sucesso na reconstrução do esôfago e na parede de cães. Os resultados revelaram que a membrana de látex como novo material de fonte biológica, possui características bioquímicas que o tornam capaz de interferir no processo de reparação tecidual, favorecendo a formação rápida e regular de novo tecido, além de ser de fácil manuseio, dispensando técnicas complexas para sua confecção e utilização (ZIMMERMANN et al., 2007)

Segundo Pinho et al., em 2004, a biomembrana de látex com polisina a 0,1% apresenta importantes propriedades biológicas, tais como: promoção de adesão celular, atividade neoangiogênica e formação de matriz extracelular. Ela foi capaz de favorecer o reparo de defeitos parciais de esôfago e de ressecção extensas da parede abdominal e capacidade de substituição parcial do pericárdio de cães. Já foi utilizada com sucesso em cirurgias reconstrutivas de membrana timpânica e em

úlceras de membros inferiores, sendo biocompatível em todos os experimentos realizados.

Polilisina é basicamente um ácido poliamínico carregado positivamente. As células normalmente não possuem receptores específicos para este ácido poliamínico e acredita-se que a polilisina ganha adesão pelas interações eletrostáticas entre os sítios aniônicos do plasma com os sítios catiônicos desta superfície (RAINAUDI et al., 1998).

De acordo com Paulo et al. (2005), a polisina é uma poliamida sintética utilizada em histologia para facilitar a adesão celular em superfícies vítreas. Acredita-se que a propriedade de adesão celular da polilisina seja promovida por interação eletrostática entre a membrana celular e a superfície da poliamida mimetizando os eventos adesivos que ocorrem naturalmente entre as membranas celulares e seus receptores específicos. Este produto é carregado positivamente e as células não possuem receptores específicos para ele. As alterações nas cargas elétricas superficiais vão alterar a estruturas e a função celular.

Fugimoto et al., em 2007, relataram que a biomembrana de látex produzida a partir do látex da seringueira "*hevea brasiliensis*" e banhada pela polilisina a 0,1% foi utilizada com sucesso no reparo de defeito parcial de esôfago, ressecções extensas da parede abdominal, substituição parcial do pericárdio, merigoplastias, reconstituição de tímpanos e reconstrução conjuntival e também na cicatrização de feridas crônicas como: úlceras por insuficiência vascular, diabética, de pressão, vasculogênicas, feridas cirúrgicas e traumáticas limpas ou infectadas.

Em um estudo experimental, Silva e Maniscalco (2013) geraram um defeito secundário no palato de sete cães, dos quais, cinco foram recobertos com a biocure e os outros dois foram escolhidos como controle e tiveram a cicatrização por segunda intenção. No pós-operatório foram realizadas avaliações clínicas e macroscópicas para avaliação dos resultados. Concluíram que a biomembrana de látex natural foi capaz de acelerar o processo de reparação tecidual visto que os animais do grupo controle demoraram mais tempo para a cicatrização total do defeito.

Em consequência da ausência de métodos ideais, os compósitos, como as membranas de látex natural, poliamida e polilisina a 0,1%, vêm se mostrando uma

boa alternativa em cirurgias experimentais. Sua utilização foi descrita no reparo de lesões esofágicas em cães com resultados animadores. O material não é incorporado pelo hospedeiro, servindo somente como ponte para a regeneração tecidual. Esta observação, aliada a sua resistência física e boa tolerância por parte do receptor permitiram que se iniciassem investigações para sua possível utilização como implante (RABELO et al., 2005)

Xavier et al. (2008) descreveram um relato de caso clínico avaliando os benefícios do uso da Biocure[®] como curativo. Foram realizadas duas cirurgias de EGL utilizando o palato como área doadora onde foi colocado a membrana de látex natural sob o cimento cirúrgico, em uma área, enquanto a outra foi aplicado apenas o cimento cirúrgico. Na área que recebeu o curativo houve aceleração da epitelização, aumento da hemostasia e diminuição da sensibilidade pós-operatória.

2.3 Hemcon[®]

Hemcon[®] é um curativo hemostático fabricado a partir da quitosana que sofre um processo de secagem por congelamento e remodelação para formar um material altamente esponjoso. Basicamente é uma bandagem compressiva de acetato de quitosana que foi desenvolvido como um agente hemostático. É usado para estancar o fluxo de sangue, especialmente o fluxo de feridas sangrando severamente. Anteriormente, a aplicação de pressão contínua com gaze era a intervenção primária utilizada para estancar hemorragias graves. Outros agentes hemostáticos alternativos, como curativos de colágeno ou curativos à base de fibrina-trombina não demonstraram ser suficientemente resistente à dissolução em fluxo arterial elevado. Relatórios de ação por médicos de combate durante as operações no Afeganistão e no Iraque demonstraram sucesso no tratamento de ferimentos de bala, metralhadora, mina terrestre e outros ferimentos, quando curativos convencionais falharam. (BURKATOVSKAYA et al., 2006)

A quitosana é um polissacarídeo linear abundante na natureza, derivado da N-desacetilação da quitina e composto principalmente de h(1-4) ligado a 2-desoxi-2-amino-d-glicopiranosose e parcialmente de h(1-4) ligado a 2-desoxi-2-acetamidoglicopiranosose. Trata-se de um polissacarídeo abundante na natureza, constituindo-

se em uma fonte renovável e relativamente barata uma vez que é obtida também, como material rejeitado pela indústria da pesca. Naturalmente, a quitosana é encontrada em alguns fungos, mas é principalmente obtida do exoesqueleto de crustáceos como camarões, caranguejos e moluscos como as lulas. Devido a sua biocompatibilidade, natureza não tóxica e propriedades como efeitos inibitórios no crescimento de fungos e bactérias, há um interesse crescente em seu potencial na aplicação em enxertos (COSTA et al., 2006).

A quitosana é um biopolímero natural derivado da quitina. Tanto a quitina quanto a quitosana fazem parte de uma família de macromoléculas formadas por unidades de monossacarídeo unidas por ligações glicosídeas, foi descoberta em 1859 por Rouget, quando do contato da quitina com hidróxido de potássio em ebulição. É um produto derivado da indústria de pesca apresentando aplicações em diversas áreas como tratamento de águas, medicamentos cosméticos e desenvolvimento de biomateriais (SANTOS et al., 2003). Este material se destaca por sua biocompatibilidade, biodegradabilidade (SUH & MATTHEW, 2000), não toxicidade e atividade antimicrobiana (bactericida, bacteriostática, fungicida, fungistática) e também cicatrizante (DALLAN, 2005), de grande abundância, baixo custo, fácil obtenção podendo ser manipulada em diferentes formas (Spin Neto et al., 2008).

De acordo com Wedmore et al. (2006), o curativo Hemcon[®] era carregado por todos os soldados do exército dos EUA para minimizar o risco de hemorragia descontrolada em combates. Cada médico americano carregava cinco bandagens Hemcon[®] em seus kits de primeiros socorros. Foi utilizado para tratar ferimentos em combates envolvendo grande sangramento arterial e venoso, resultante de feridas de projétil de alta velocidade. Foi testado em soldados com alergia a frutos do mar com sucesso, mais de 1.000.000 de unidades foram entregues a soldados sem nenhum relato de evento alérgico. Esta falta de reatividade é provavelmente devida a eliminação de proteína de antígenos de reações alérgicas durante o processamento de geleificação da quitosana antes de ser utilizado para desenvolver o curativo Hemcon[®].

Malmquist et al. (2008), descreveram o Hemcon Dental Dressing[®] como um dispositivo médico hemostático que pode ser usado em cirurgias orais para atingir a hemostasia precoce e melhorar a cura pós-operatória, tendo a capacidade de selar

cavidades pós extrações. Na periodontia é utilizada na região doadora de enxertos gengivais para que haja uma cicatrização mais rápida e com um maior conforto ao paciente, diminuindo a dor. O curativo adere na ferida não havendo necessidade de suturas e será reabsorvido num período de 48h, melhorando a cicatrização do leito doador, garantindo conforto ao paciente.

O avanço nas pesquisas torna esta membrana cada vez mais utilizada, além disso, feridas tratadas com quitosana mostraram menor grau de fibroplasia, favorecendo a reepitelização com formação de cicatriz lisa. A propriedade imunomoduladora da quitosana é devida a sua capacidade de ativar quase que exclusivamente o macrófago e explica não somente seu papel na aceleração da cicatrização de lesões, mas também a biodegradabilidade desse polímero no organismo. E ainda corrobora-se o fato de a quitosana ser obtida principalmente do exoesqueleto de crustáceos, abundante em áreas de costa marítima e que tem na produção a reciclagem com viabilidade econômica e ecológica (SILVA et al., 2006).

Segundo Boateng et al. (2008), a quitosana é conhecida por acelerar a granulação durante a fase proliferativa da cicatrização de feridas. Curativos bioativos são relatados como superior ao convencional e sintético, tais como curativos de gaze e hidrogel respectivamente. Têm as vantagens de fazer parte da matriz de tecido natural, são biodegradáveis e alguns desempenham um papel ativo na cicatrização de feridas e formação de tecido novo.

Os curativos a base de quitosana fornecem uma camada protetora, quando da adesão do curativo com a ferida oral, pode ser cortado em tamanho personalizado para atender as necessidades de cada paciente e proporcionam uma barreira física para proteger a superfície da ferida, reduzindo a dor (CUI XU et al., 2009).

Com o objetivo de avaliar o efeito da quitosana no ligamento periodontal de humanos Pang et al., em 2005, realizaram um estudo tanto *in vitro* como em defeitos realizados em calvária de ratos. Os fibroblastos foram obtidos de indivíduos saudáveis, as culturas de células continham quitosana nas concentrações de 0,01, 0,1, 1 e 2 mg/ml. Também foram realizados defeitos de 8 mm na calvária de 30 ratos que foram divididos em 3 grupos de 10 animais cada. Um grupo recebeu quitosana/esponja de colágeno, outro apenas quitosana e outro coágulo. Os animais foram sacrificados após 2 e 8 semanas e então foi realizada análise histológica e

histomorfométrica. Os autores concluíram que a quitosana foi capaz de induzir a proliferação celular nas concentrações de 0,1 mg/ml.

A quitina reduz o tempo de coagulação sanguínea devida à capacidade de agregar tanto plaquetas quanto eritrócitos. Grupos aminos livres da quitosana interagem com receptores das hemácias. A ligação com as plaquetas promove liberação de fatores de crescimento derivados de plaquetas AB e também fator de transformação de crescimento β 1. A ativação dos macrófagos é responsável pela degradação da quitina no organismo (Costa Silva et al., 2006).

O objetivo do trabalho de Azargoon et al., em 2011, foi avaliar a ação da quitosana na hemostasia, cicatrização e se existiam efeitos de formação óssea. Para isso os autores avaliaram os efeitos da membrana Hemcon[®] (Patterson Dental, St Paul, MN) em cirurgias periapicais realizadas em 12 coelhos. Os animais foram divididos em grupo controle, que utilizou apenas coágulo e dois grupos experimentais que usaram ou quitosana ou sulfato férrico à 15,5%. A membrana Hemcon[®] apresentou hemostasia com 2,17 minutos e sulfato férrico 2,33 minutos. Não foi observada diferença significativa entre quitosana e sulfato férrico, porém, os autores concluíram que a membrana Hemcon[®] apresentou capacidade de hemostasia e também maior formação óssea quando comparada a apenas o coágulo.

2.4 GenDerm[®]

A GenDerm[®] foi introduzida recentemente no mercado brasileiro e é uma membrana biológica liofilizada de cortical óssea bovina, constitui-se basicamente de fibras colágenas ósseas cuja utilização na clínica odontológica tem sido considerada de muito sucesso em casos de lesões ósseas periodontais ou associadas a implantes osteointegrados (TAGA et al., 2000).

O colágeno é uma proteína fibrosa formada por três cadeias polipeptídicas usado para a fabricação de produtos médicos-odontológicos devido às suas excelentes propriedades físicas, biológicas e sua imensa disponibilidade. Constitui cerca de 1/3 de todas as proteínas do corpo. Existem cerca de 19 tipos de colágeno já identificados e o mais abundante é o colágeno tipo 1, cerca de 90% de todo o

colágeno do corpo. Representa o principal elemento do tecido conjuntivo, tendo a função estrutural para outros tecidos do corpo como tendões, ossos, pele e tecidos periodontais (LEE et al., 2001).

Segundo Seal et al. (2001), o colágeno representa a principal macromolécula extracelular do tecido conjuntivo periodontal. O colágeno tipo I representa cerca de 90% do colágeno humano é encontrado principalmente em ossos e pele, sendo o colágeno tipo II o maior constituinte da cartilagem. Os colágenos tipos I, II, III e V apresentam baixo potencial imune quando implantado em animais e humanos, sendo assim, aprovados pela "Food and Drugs Administration" (FDA) para o uso clínico.

De acordo com Wang e Caroll (2001), os vários tipos de colágeno apresentaram excelentes propriedades como hemostasia, mostraram ser quimiotáticos para fibroblastos humanos, foram absorvíveis fisiologicamente pelos tecidos, serviram de suporte para o crescimento celular na engenharia de tecidos, possuíam ampla disponibilidade e abundância na natureza, puderam ser manipulados em diversas formas e possuíam um fácil manuseio.

O uso do colágeno na medicina e odontologia é obtido de várias estruturas, principalmente animal e algumas humanas, que incluem a pele, o tendão, os intestinos de boi e carneiro, a derme do porco, a pele e o pericárdio de bezerro. O colágeno passa por um processo de isolamento e purificação que envolve a digestão enzimática do colágeno solúvel, ou a extração química de colágeno fibrilar do tecido, seguido de processamento para a obtenção de géis, esponjas, filamentos e membranas (AL-ARRAYED et al., 1995).

Bord et al. (1996) afirmaram que na degradação do colágeno estão envolvidas varias enzimas, no entanto, as principais são as enzimas chamadas collagenases, que são especializadas em hidrolisar o colágeno. Pertencem a família das enzimas chamadas metaloproteinases da matriz, responsáveis pela degradação do tecido conjuntivo, essas collagenases podem ser produzidas por diversos tipos celulares dentre eles estão os fibroblastos, macrófagos, células epiteliais e osteoclastos, bem como bactérias que estão presentes na cavidade oral como a *Porphyromonas gingivalis*.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Avaliar histologicamente a reação inflamatória de lesões cirúrgicas em calvárias de ratos pelo uso da biomembrana de látex com polilisina 0,1%, da membrana impregnada com quitosana e a membrana biológica liofilizada de cortical óssea bovina.

3.2 Objetivos específicos

Diferenciar o tipo de processo inflamatório de acordo com o tipo de curativo utilizado nos defeitos cirúrgicos realizados;

Analisar os diferentes biomateriais conforme o grau de inflamação provocada e o estímulo que exercem sobre o tecido durante o processo de inflamação comparando os resultados aos encontrados nos grupos controle.

4. MATERIAIS E MÉTODO

4.1 Animais

Foram utilizados 30 ratos Wistar machos, de procedência do biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), campus Campo Grande, com peso de aproximadamente 350g. Os animais foram mantidos em gaiolas de 25cm³ 45x30x15 cm de comprimento, largura e altura, respectivamente (Figura 1) 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 2), para certificar que ficassem estáveis e saudáveis, mantendo contato apenas com as pessoas envolvidas no trabalho.



Figura 1 - Gaiolas com os animais



Figura 2 - Armazenamento das gaiolas

Os procedimentos só foram realizados após aprovação do Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da UFMS sob o protocolo de número 560/2013. Todo o

procedimento cirúrgico foi realizado no biotério da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, sob a supervisão de um veterinário responsável. Os medicamentos usados nos animais, bem como sua posologia, foram indicados pela médica veterinária responsável pelo biotério. Para a aplicação de anestésicos e medicação pós-operatória, os animais foram pesados e suas doses individualizadas.

4.2 Procedimento cirúrgico

Os animais foram contidos manualmente (Figura 3) e anestesiados com associação de Cloridrato de quetamina (Dopalen[®]) na dose de 80mg/kg (Figura 4)+ Cloridrato de Xilazina (Anasedan[®]) na dose de 10mg/kg (Figura 5).



Figura 3 - Contenção manual e anestesia intraperitoneal

A cirurgia ocorreu após a anestesia por via intraperitoneal, utilizando agulhas de 25x5 mm. Após a obtenção da anestesia, cada animal foi posicionado em uma mesa apropriada (Figura 6) e realizou-se a tricotomia da região a ser operada, utilizando lâmina de barbear estéril (Gillette[®], São Paulo, Brasil), antissepsia com álcool iodado a 2% (Povidini[®], Amazonas, Brasil) (Figura 7).



Figura 4 - Cloridrato de ketamina



Figura 5 - Cloridrato de Xilazina



Figura 6 - Mesa para preparação dos animais



Figura 7 - Tricotomia



Figura 8 - Mesa para procedimentos cirúrgicos

Na calvária foram realizadas quatro lesões de 5x2 mm de extensão e profundidade, respectivamente, com bisturi circular (Conexão[®], São Paulo, Brasil) (Figura 9). Para padronizar a rotação e conseqüentemente o trauma na confecção das lesões, foi utilizado um contra-ângulo com redução 20:1 (NSK, Japão) (Figura

10) e um motor cirúrgico (NSK, Japão) na rotação 1:1 (Figura 11). As lesões foram divididas conforme o tratamento em quatro tipos: G1 – superior esquerda, G2 – superior direita, G3 – inferior esquerda e G4 – inferior direita (Figura 12).



Figura 9 - Bisturi circular



Figura 10 - Contra-ângulo



Figura 11 - Motor de implante



Figura 12 - Lesões provocadas em calvárias

A lesão superior esquerda (G1) foi protegida pela membrana de látex com polilisina a 0,1% (Biocure[®]) (Figuras 13 e 14); a lesão superior direita (G2) a proteção ocorreu com a membrana de quitosana (HemCon[®]) (Figuras 15 e 16); a lesão inferior direita (G3) a proteção se deu pelo curativo de colágeno (Gen derm[®]) (Figura 14 e 15) e a lesão inferior esquerda (G4), ficou sem nenhum curativo para proteção, sendo o controle (Figura 16).



Figura 13 - Lesão protegida com Biocure®



Figura 14 -Biocure®



Figura15 - Lesão protegida com HemCon



Figura16 - HemCon®



Figura 17 - Lesão protegida com GenDerm



Figura 18 - GenDerm®

Os curativos foram fixados somente nas bordas através da cola de cianoacrilato (SuperBonder®, Loctite, Brasil).

Finalizando, aplicou-se uma dose de antimicrobiano de amplo espectro (Pentabiótico Veterinário Reforçado®, Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge, Iowa,

Estados Unidos), via parenteral, com posologia de 1ml/kg (Figura 19) e uma dose de analgésico butorfanol (Torbugesic[®]) na dosagem de 0,1ml/300g peso (Figura 20), com agulha de tamanho 30x7.



Figura 19 - Antimicrobiano



Figura 20 - Analgésico

Os animais foram recolocados em suas gaiolas de origem, em ambiente limpo até a recuperação anestésica e foram observados até a hora do sacrifício.

Os animais foram divididos em três grupos, com dez animais cada, para serem sacrificados nos tempos de 1 dia(T1), 7 dias(T2) e 11 dias(T3) após a cirurgia pela superdosagem do anestésico. Os fragmentos teciduais das calvárias dos ratos, contendo as lesões com os curativos, foram removidas (Figura 22) e imersas em solução de formol tamponado a 10%, catalogadas e encaminhadas para os procedimentos histológicos.



Figura 21 - Remoção das peças



Figura 22 - Peça da calvária

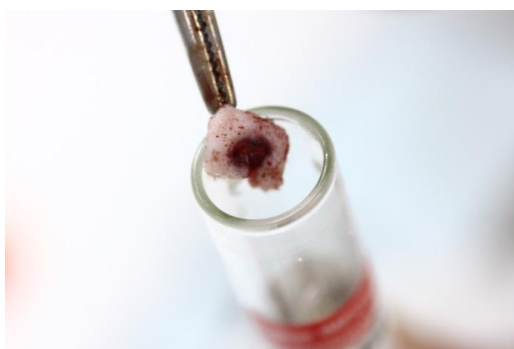


Figura 23 - Peças acondicionadas e



Figura 24 - frascos estéreis com formol identificadas.

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, em seguida foi realizada a remoção dos curativos e a separação das lesões. Após, foi realizada a desidratação das lesões com a série de alcoóis (70%, 80%, 95% e absoluto) por 30 minutos em cada concentração.

Em seguida realizou-se a diafanização pelo xilol, 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-ZEISS- Brasil), com navalhas descartáveis (LEICA 818 perfil alto – Alemanha) com secção de 5 μm de espessura, semi-seriada, com intervalo de 20 μm , sendo confeccionados três cortes de cada lesão, somando um total de 12 cortes de cada animal.

Esses cortes foram corados com hematoxilina (30 segundos) – eosina (1 minuto) (HE). Em seguida foi feita a montagem dos cortes com resina (Entelan – MERCK –Brasil) em lamínulas. Todo este processo foi realizado no laboratório de Histologia do CCBS da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Após secagem, as lâminas foram analisadas por um patologista, sem o conhecimento da origem das mesmas, através da microscopia óptica de luz (Microscópio binocular Nikon Eclipse E200), desde a visão panorâmica até a objetiva de aumento final de 400x, em campos aleatórios e sobre dois cortes seriados e transformados em escores numéricos.

Ao final da observação das lâminas foi obtida uma média aritmética dos scores e transformados em valores numéricos respectivamente: 0 – ausente; 1 – leve; 2 – moderada; 3 – intensa; 4 severa, para as alterações relacionadas com inflamação, hiperemia, hemorragia e tipo de processo inflamatório (Tabela 1 e Tabela 2).

Tabela 1 - Descrição dos escores utilizados para a avaliação qualitativa das lâminas histológicas.

Escore	Descrição	Preenchimento da lesão
0	Ausente	
1	Leve	25%
2	Moderada	50%
3	Intensa	75%
4	Severa	100%

Tabela 2 - Descrição dos escores utilizados para avaliação do tipo de processo Inflamatório.

Escore	Descrição	Preenchimento da lesão
0	Ausente	
1	Aguda	+ de 50% neutrófilos-
2	Crônica	+ de 50% de leucócitos monocelulares
3	Mista	= neutrófilos e monocelulares

4.4 Procedimentos estatísticos

As comparações estatísticas inferenciais entre dados de um mesmo dia comparando os quatro tratamentos foram realizados pelo teste estatístico Friedman, enquanto a comparação entre os diferentes dias em um mesmo tratamento foi calculada pelo teste estatístico Kruskal-Wallis. Na presença de diferença significativa aplicou-se o pós-teste de Dunn a fim de identificar onde estas se encontravam. Para tais análises foi utilizado o software estatístico GraphPadInstat 3.06 com nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Análise histológica

Os cortes evidenciaram a presença da área cirúrgica e em alguns casos até o material pesquisado. Todas as lâminas foram passíveis de análise histológica.

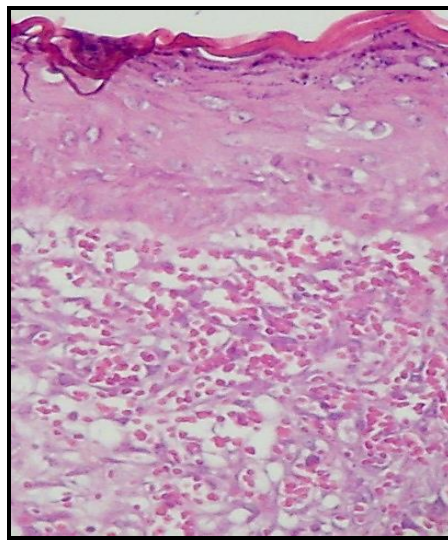


Figura 25 - Fotomicrografias das lesões no período de 7 dias, coloração HE, aumento 10x Processo inflamatório crônico (2);hemorragia(3); Grupo D-controle

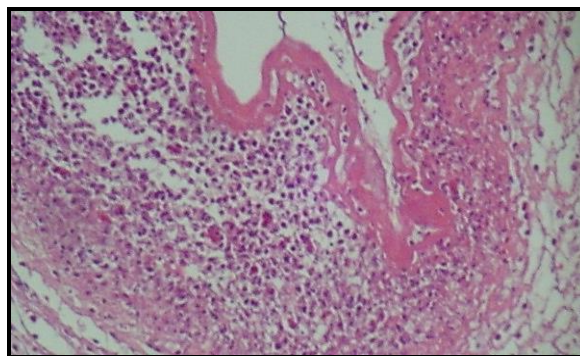


Figura 26 - Fotomicrografias das lesões no período de 7 dias, coloração HE, aumento 10x Processo inflamatório agudo (1); Grupo B-Hemcon.

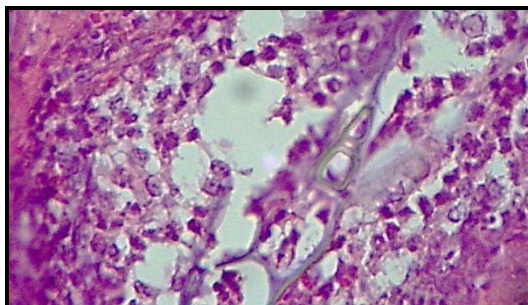


Figura 27- Fotomicrografias das lesões no período de 7 dias, coloração HE, aumento 40x
Processo inflamatório misto(3); Grupo A-Biocure.

5.2 Avaliação dos escores

Os dados coletados, previamente classificados, foram apresentados em valores mínimo, máximo e mediana ou em percentual de animais com a característica analisada, dispostos de forma descritiva, em gráficos ou tabelas.

5.3 Variáveis

5.3.1 Tipo de processo inflamatório

O tipo de processo inflamatório não apresentou diferença significativa nos intervalos de tempo estudado para os quatro grupos. No 1º dia o valor de $p=0,86$, no 7º dia o valor de $p=0,98$ e no 11º dia $p=0,97$.

Quando a comparação do tipo de processo inflamatório foi intra grupo, comparando-se os 3 momentos de análise, não observou-se diferença significativa em relação ao grupo tratado com biocure ($p=0,05$). Entretanto, foi significativa a diferença do tipo de processo inflamatório no grupo tratado com Hemcon® ($p=0,002$), sendo $T1>T3$; assim como no tratamento com Genderm® ($p=0,0006$), onde $T1>T3$ e no grupo Coágulo ($p=0,002$) onde $T1>T3$.

As distribuições percentuais dos animais de acordo com as classificações adotadas para mensurar o tipo de processo inflamatório, em cada um dos tratamentos podem ser visualizadas no Gráfico 1.

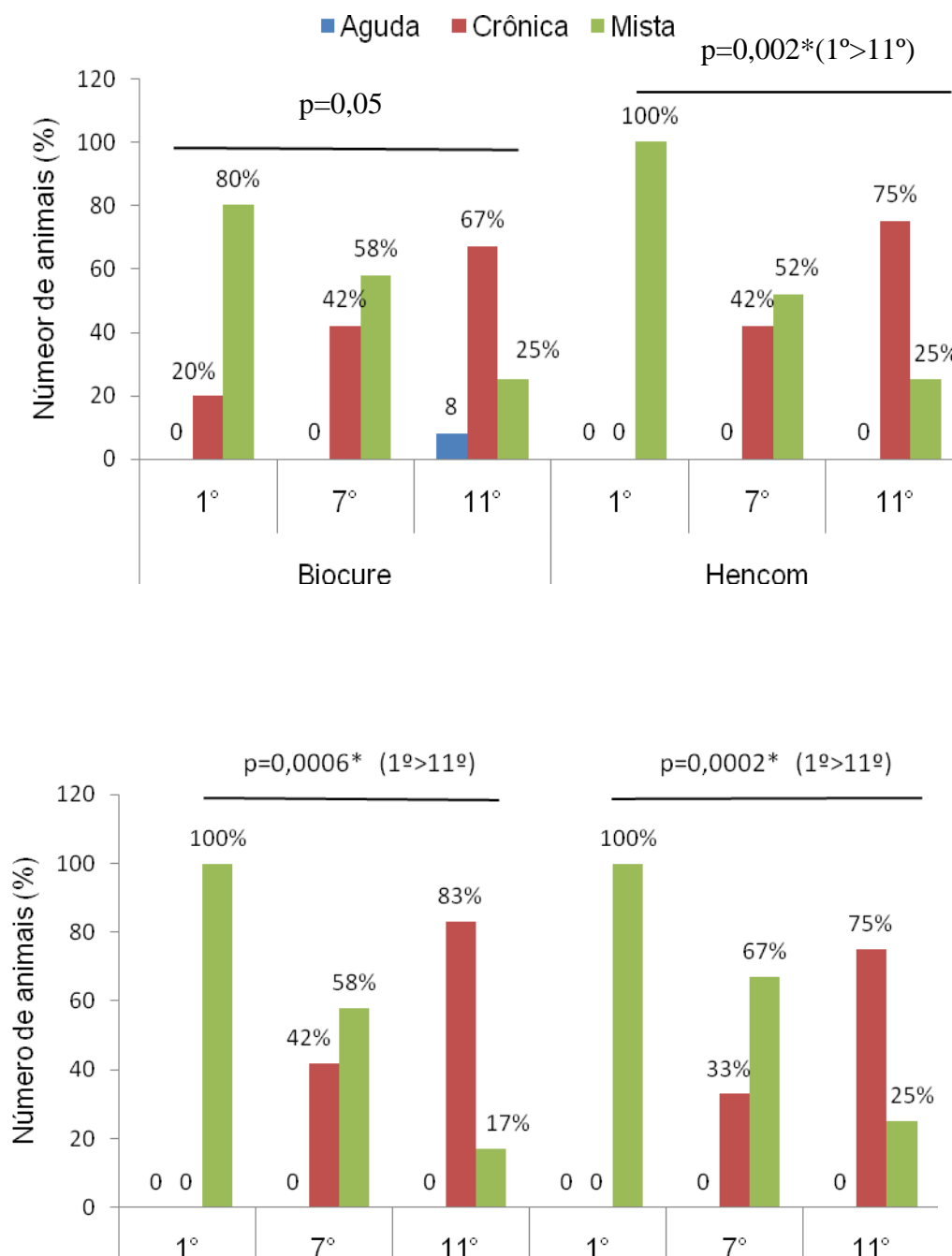


Gráfico 1 – Percentual de animais classificados de acordo com o tipo de processo inflamatório (aguda, crônica ou mista) nos diferentes tratamentos. Nota:* diferença significativa entre as classificações analisadas nos momentos 1º, 7º e 11º dias pelo teste Kruskal Wallis, em um mesmo grupo. Entre parênteses descreve-se em quais momentos a diferença foi identificada pelo pós teste de Dunn.

5.3.2 Inflamação

Foi significativa a diferença entre o grau de inflamação do 1º dia comparando os diferentes tratamentos ($p=0,008$), sendo que o tratamento com Biocure® apresentou grau de inflamação significativamente menor que os tratamentos com Hemcon® e Coágulo ($p<0,05$), mas não diferiu da resposta do tratamento com Genderm® ($p>0,05$) (Tabela 3).

Foi observada significativa diminuição da inflamação ao decorrer dos dias da lesão nos grupos tratados com Hencom® ($p=0,002$), Genderm® ($p=0,04$) e Coágulo ($p=0,0004$). O pós teste apontou que nos tratamentos com Hemcon® e Genderm® a resposta inflamatória foi maior no 1º dia em comparação ao 11º dia. No grupo coágulo o 1º dia foi significativamente maior tanto em relação ao 7º quanto ao 11º dia. No grupo Biocure® não foi evidenciada diferenças significativas entre os dias de lesão (Tabela 3).

Tabela 3 – Valores máximo, mínimo e a mediana do escore registrado para inflamação nos diferentes materiais estudados, nos diferentes períodos de avaliação.

Característica	Grupos				Valordep ⁽¹⁾ (entre grupos)
	Pontuação mínima – máxima (mediana)				
	Biocure (n=12)	Hencom (n=12)	Genderm (n=12)	Coágulo (n=12)	
Inflamação					
1º dia	1 – 3 (1) ^B	2 – 4 (3) ^{Aa}	2 – 3 (3) ^{ABa}	3 – 4 (3) ^{Aa}	0,008
7º dia	1 – 3 (2)	1 – 3(3) ^{ab}	1 – 4(2) ^{ab}	1 – 4 (2) ^b	0,63
11º dia	1 – 2 (1)	1 – 4 (2) ^b	1 – 3 (1) ^b	1 – 3 (2) ^b	0,49
Valor de p ⁽²⁾ (entre momentos)	0,05	0,002	0,04	0,0004	

Nota: Letras minúsculas indicam diferença entre os momentos 1º, 7º e 11º dias na utilização do mesmo material biológico. Letras maiúsculas indicam diferença entre os diferentes materiais biológicos avaliados em um mesmo momento.

5.3.3 Hemorragia

Em relação a hemorragia foi identificada significativa a diferença apenas no 1º dia comparando os diferentes tratamentos ($p=0,003$), sendo apontado pelo pós-teste que o tratamento com Biocure apresentou hemorragia significativamente menor que

os tratamentos com Hemcon ($p < 0,05$), mas sem diferença em comparação com os tratamentos com Coágulo e Genderm[®] ($p > 0,05$) (Tabela 4).

A comparação entre os intervalos de tempos analisados no mesmo grupo de tratamento em relação à hemorragia mostrou significativa diferença no grupo Hemcon[®] ($p = 0,001$) e no grupo Coágulo ($p = 0,004$), com pós-teste apontando o 11º dia com menor hemorragia em relação ao 1º e ao 7º dias ($p < 0,05$). Também foi identificadas diferenças no grupo Genderm[®] ($p = 0,007$), o pós-teste apontou o 11º dia menor apenas que o 1º dia de análise. Já o grupo Biocure[®] não foi significativa a diferença entre os momentos ($p = 0,05$).

Tabela 4 – Valores máximo, mínimo e a mediana do escore registrado para hemorragia nos diferentes materiais estudados, nos diferentes períodos de avaliação.

Característica	Grupos				Valordep ⁽¹⁾ (entre grupos)
	Pontuação mínima – máxima (mediana)				
	Biocure (n=12)	Hemcom (n=12)	Genderm (n=12)	Coágulo (n=12)	
Hemorragia					
1º dia	0 – 3 (0) ^B	1 – 4 (3) ^{Aa}	1 – 3 (2) ^{ABa}	1 – 3 (2) ^{ABa}	0,003
7º dia	0 – 3 (2)	1 – 3 (2) ^a	0 – 3 (2) ^{ab}	0 – 3 (2) ^a	0,19
11º dia	0 – 3 (1)	0 – 2 (1) ^b	0 – 2 (0) ^b	0 – 2 (1) ^b	0,23
Valor de p ⁽²⁾ (entre momentos)	0,05	0,001	0,007	0,004	

Nota: Letras minúsculas indicam diferença entre os momentos 1º, 7º e 11º dias na utilização do mesmo material biológico. Letras maiúsculas indicam diferença entre os diferentes materiais biológicos avaliados em um mesmo momento.

5.3.4 Hiperemia

Foi significativa a diferença entre a hiperemia somente no 1º dia comparando os diferentes tratamentos ($p = 0,004$), sendo apontado pelo pós-teste que o tratamento com Biocure[®] apresentou hiperemia significativamente menor que os tratamentos com Hemcon[®] ($p < 0,05$), mas não diferiu da resposta do tratamento com Coágulo e Genderm[®] ($p > 0,05$) (Tabela 5).

Foi observada significativa diminuição da hiperemia no decorrer dos momentos da análise intra-grupos, nos grupos tratados com Hemcon[®]

($p=0,01$), Genderm[®] ($p=0,007$) e Coágulo ($p=0,01$). O pós-teste apontou que nestes tratamentos a hiperemia foi maior no 1º dia em comparação ao 11º dia ($p<0,05$). No grupo Biocure[®] não foi evidenciada diferenças significativas entre os dias de lesão ($p>0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores máximo, mínimo e a mediana do escore registrado nos diferentes materiais estudados, nos diferentes períodos de avaliação.

Característica	Grupos				Valordep ⁽¹⁾ (entre grupos)
	Pontuação mínima – máxima (mediana)				
	Biocure (n=12)	Hencom (n=12)	Genderm (n=12)	Coágulo (n=12)	
Hiperemia					
1º dia	1 – 3 (2) ^B	2 – 4 (4) ^{Aa}	2 – 4 (3) ^{ABa}	2 – 4 (3) ^{ABa}	0,004
7º dia	1 – 4 (3)	1 – 4 (3) ^{ab}	1 – 4 (2) ^{ab}	0 – 4 (2) ^{ab}	0,50
11º dia	0 – 3 (2)	0 – 4 (2) ^b	0 – 3 (1) ^b	0 – 4 (1) ^b	0,22
Valor de p ⁽²⁾ (entre momentos)	0,05	0,01	0,007	0,01	

Nota: Letras minúsculas indicam diferença entre os momentos 1º, 7º e 11º dias na utilização do mesmo material biológico. Letras maiúsculas indicam diferença entre os diferentes materiais biológicos avaliados em um mesmo momento.

6 DISCUSSÃO

As principais desvantagens citadas sobre o enxerto gengival livre estão associadas à área doadora, dentre as mais relatadas estão: os riscos de acidentes hemorrágicos, necessidade de um segundo sítio cirúrgico, possíveis alterações estéticas e a principal e mais frequente é a dor pós-operatória (FEITOSA et al., 2008; FERRÃO et al., 2012). A ferida cirúrgica deixa o tecido conjuntivo desprotegido expondo vasos e terminações nervosas durante a cicatrização proporcionando um grande desconforto (SIVA et al., 2008; SCHROTT et al., 2009; CAMIO et al., 2010). Histologicamente observa-se a ausência do tecido epitelial e o tecido conjuntivo exibe um intenso infiltrado inflamatório que pode variar de agudo a crônico, de acordo com o tipo de célula encontrada (BLANES, 2004; MUZARELLI, 2009).

Bosco et al. (1996) avaliaram clínica e comparativamente, em humanos, o processo de cicatrização das áreas doadoras de EGL. As áreas eram submetidas a proteção de cimento cirúrgico, feltro de colágeno ou fragmentos autógenos de gengiva e observaram que o grupo cimento cirúrgico apresentou um maior número de queixas de sintomatologia dolorosa. Para proteger as áreas doadoras de EGL, o cimento cirúrgico continua sendo o material de primeira escolha da maioria dos profissionais, visando apenas à proteção mecânica sem induzir estímulos ao tecido lesado (XAVIER et al., 2008; PACHECO e HENRIQUES, 2011). Além da proteção mecânica, o curativo ideal deve atuar modulando o processo inflamatório e, também, acelerando o reparo (RESENDE et al., 2009).

A inflamação pode ser considerada um mecanismo de defesa próprio do tecido conjuntivo (BLANES, 2004). Esse tecido se reconstitui a partir de um tecido de granulação, o que remete ao processo de reparo, sendo esse dependente da liberação abundante de mediadores inflamatórios dentre os quais se podem-se citar: citocinas, quimiotaxias, fatores de crescimento, prostaglandinas e leucotrienos (CONSOLARO, 2009). 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).

Este estudo não pôde evidenciar diferenças entre o tipo de processo inflamatório comparando os tempos (T1; T2; T3) para os 4 tratamentos. Isso pode estar relacionado com os conceitos de progressão de cura da ferida cirúrgica descrito por Muzarelli (2009). Ou seja, o organismo tem que passar pelas fases de inflamação, proliferação e reparo. Nesse conjunto o trabalho evidencia a diferença entre a capacidade de modulação de resposta inflamatória dos grupos HEMCON[®] e GenDerm[®], pois ambos apresentam uma diminuição da resposta inflamatória no T3. O que pode sugerir que nesses casos a ferida chega à fase de reparo mais rapidamente, quando comparada com o Biocure[®]. Esses resultados demonstraram redução da inflamação, mas não melhora da comparação, pois não houve significância.

Seguindo essa linha podemos afirmar que os agentes inseridos nos dois grupos, que possuem capacidade bacteriostática, angiogênica e osteopromotora podem estar facilitando a proliferação celular necessária em T2, onde ocorre os principais eventos de cura da ferida. Por esse motivo as células chegariam mais rapidamente na fase de reparo.

O Biocure[®] apresentou menor grau de inflamação em T1 se comparado com todos os outros grupos testados ($p=0,008$) e teve um comportamento uniforme quando comparado entre os tempos T1, T2, T3 apresentando inflamação leve em T1, moderada em T2 e leve em T3, com predominância de resposta inflamatória do tipo mista em T1 e T2 e do tipo crônica em T3. Isso corrobora com os achados por Rabelo et al. (2005) que afirmaram que a biomembrana mesmo não sendo reabsorvível possui uma excelente biocompatibilidade e induz pouca resposta inflamatória. O tratamento com Biocure[®] apresentou hemorragia e hiperemia significativamente menor que os outros grupos ($p=0,003$) e ($p=0,004$), respectivamente, em T1. A membrana de látex natural tem a capacidade de facilitar a adesão celular, então ela propicia um leito para as células inflamatórias, mas como não possui outros componentes químicos, ela não tem a capacidade de modular ou interferir na modulação da resposta inflamatória. Sua vantagem está na proteção mecânica da área cirúrgica indo de encontro com os achados do estudo experimental de Silva e Maniscalco (2013), onde os autores concluíram que a biomembrana de látex natural foi capaz de acelerar o processo de reparação

tecidual visto que os animais do grupo controle demoraram mais tempo para a cicatrização total do defeito realizado.

No grupo Hemcon[®] foi observado uma significativa diminuição do grau de inflamação ao decorrer dos dias ($p=0,002$) onde em T3 o grau de inflamação foi menor que em T1, notou-se em T1 e T2 uma inflamação intensa e em T3 uma inflamação leve. Foi constatado que houve uma mudança significativa ($p=0,002$) no tipo de resposta inflamatória ao passar do tempo sendo que no primeiro momento T1 era do tipo mista e em T3 do tipo crônica. Embora alguns trabalhos tenham citado a capacidade de hemostasia e neoangiogênese da quitosana (MALMQUIST et al., 2009; Cui Xu et al., 2009) e relataram a capacidade de induzir a migração de células inflamatórias para área da ferida (BURKATOVSKAYA et al., 2006), neste estudo foi observado uma hemorragia intensa em T1 que foi diminuindo com o passar dos dias sendo menor apenas no 11º dia. Viu-se uma hiperemia severa em T1 e maior que os outros tratamentos estudados. Deve-se salientar que a inflamação mista cai praticamente pela metade no dia 11 e na mesma proporção a inflamação crônica aumenta. Com certeza pôde-se afirmar que os neutrófilos tem a sua população diminuída com esse material.

No grupo GenDerm[®] foi significativa a diminuição no grau da inflamação ao passar dos dias ($p=0,04$) a sua comparação com o grupo controle sugere que o material facilita a evolução mais rápida para uma resposta inflamatória crônica. Quando se observa a porcentagem de resposta aguda, GenDerm[®] ela é menor, portanto o processo de reparo tem uma discreta melhora, pois quanto mais tempo o organismo fica com células da resposta aguda no local da ferida mais tempo demora para o processo de reparo finalizar a limpeza local. Com a população de células agudas diminuído um pouco mais com o material (BLANES, 2004) pode-se afirmar que as membranas, inclusive o GenDerm facilitam o processo de reparo.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que os materiais testados obtiveram resultados melhores que os encontrados no grupo controle.

O grupo tratado com a membrana Biocure[®] apresentou grau de inflamação, hiperemia e hemorragia significativamente menor no 1 dia e processo inflamatório predominante do tipo misto, apresentando os resultados superiores quando comparados aos materiais testados.

REFERÊNCIAS*

Almeida JM, Novaes VN, Faleiros PL, Macarimi VC, Bosco AF, Theodoro LH, Garcia VG. Aumento de gengiva queratinizada em mucosa peri-implantar. Rev Odontol UNESP 2012;41(5):365-9.

Al-Alrayed F, Moran AS, Doweel P, Clinical trial of cross-linked human type I collagen as a barrier material in surgical periodontal treatment. J Clin Periodontol 1995;22(5):371-9.

Ardakani EF, Azam AN, Yassaci S, Zatehi F, Rouhi G. Effects of chitosan on dental bone repair. Health 2011;3(4):200-6.

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):807-11.

Bosco AF, Pereira SLS, Júnior NL, Milanezi LA. Análise clínica das áreas doadoras de enxerto gengival livre. APCD 1996;50(6):515-21.

Burkatovskaya M, Tegos GP, Swietlik E, Demidova TN, CastanoA & Hamblin MR. Use of chitosan bandage to prevent fatal infections developing from highly contaminated wounds in mice. J Biomaterials 2006;27(2):4157-64.

Bord S, Horner A, Hembry RM, Reynolds JJ, Compston E. Production of collagenase by human osteoblast and osteoclast *in vivo*. Bone 1996;19(1):35-40.

Boateng JS, Matthews KH, Stevens H N E. Wound healing dressings and drug delivery systems: J Pharm Sci 2008;97(8):2892-23.

Blanes L. Tratamento de feridas. Baptista-Silva JCC, editor. Cirurgia vascular: guia ilustrado. São Paulo: 2004. Disponível em: URL: <http://www.bapbaptista.com>.

Camio J, Antonio AT, Nakanishi FA. Aumento de gengiva inserida: enxerto livre epitelizado palatal x retalho reposicionado apical modificado. Perionews 2010; 4(5):457-63.

*Estilo Vancouver apresentado pelo Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas, publicadas inicialmente em 1979.

Consolaro A. Inflamação e reparo. 1ed. Maringá: Dental Press. 2009. 22p.
Costa VA, Belmonte GC, Saraiva PP. Enxertos gengivais livres e pediculados indicados para o tratamento das recessões gengivais. Rev Odontol UNESP 2011;40(4):171-8.

Costa TAC, Andrade AL, Binotto TE Plepis AMG, Bevilacqua L, Souza WM. Avaliações clínica e morfométrica da capacidade angiogênica da membrana de quitosana em córnea de coelhos. Arg Bras Oftalmo 2006; 69(6):817-21.

Costa Silva HSR, Santos KSCR, Ferreira EI. Quitosana e derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. Química Nova 2006;29(4):776-85.

Cui Xu, Zhao D, Zhang B &Gao Y. Osteogenesis mechanism of chitosan-coated calcium sulfate pellets on the restoration of segmental bone defects. J Craniofacial Surgery 2009; 20(5):1445-50.

Dallan PRM. Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração da pele. [Tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2005.

Esper LA, Ferreira Junior SB, Kaiser ROF e Almeida ALPF. The role of keratinized mucosa in peri-implant health. Cleft Palate-Craniofacial J 2012;49(2):167-71.

Feitosa DS; Santamaria MP; Sallum EA; Nociti Junior FH; Casati MZ; Toledo S. Indicações atuais dos enxertos gengivais livres. RGO 2008;56(2):1-6.

Ferrão Junior JP, Coelho AAK, Parma Neto A, Braga EFA, Ferrão IM e Marcon EM. Aumento da faixa de gengiva inserida através de enxerto gengival livre em área de recessão originada pelo uso de piercing: relato de caso. Rev Full Dent Sci. 2012;4(3):72-7.

Frade MAC, Cursi IB, Andrade FF, Coutinho-Neto J, Barbeta FM, Foss NT. Menagement of diabetic skin wounds with a natural látex biomembrane. Med Cutanl Lat. 2004;32(4):157-62.

Fugimoto F, Jervásio AC, Misawa AK, Garcia R, Matayoshi S. Uso da membrana de látex em cavidade enxerterada: relato de caso. Arq Bras Oftalmol. 2007;70(5): 854-857.

Ganga MVM, Coutinho-netto J, Colli BO, Junior WM, Catalão CHR, Santana RT, Oltramari MRP, Carraro KT, Lachatt JJ, Lopes LS. Regeneração do nervo ciático em ratos através de um conduto confeccionado com uma membrana de látex natural. *Acta Cir Bras* 2012;27(12):885-91.

Germiniani WIS, Pilatti GL, Santos FA. A importância da mucosa queratinizada na manutenção da saúde peri-implantar: uma revisão da literatura. *Rev Dental Press* 2011;5(2):59-68.

Lee CH, Singla A, Lee Y. Biomedical application of collagen. *Int J Pharm* 2001; 221(1):1-22.

Marão HF, Panzarini RS, Gustaldi FPS, Pereira CCS, Junior IRG. Regeneração óssea guiada com uso de matriz óssea bovina desmineralizada em defeitos ósseos experimentais em cães. *Rev Bras Cir Craniomaxilofac* 2011;14(2):86-90.

Malmquist JP, Clemens SC, Oien HJ. Hemostasis of oral surgery wounds with the HemCon Dental Dressing. *J Oral Maxillofac Surg* 2008;66:1177-83.

Muzzarelli RAA. Chitins and chitosan for the repair of wounded skin, nerve, cartilagen and bone. *Carbohydrates polymeres*.2009;76(2):167-82.

Mrue F, Coutinho-Netto J, Ceneviva R, Lachat JJ, Thomazini JÁ, Tambelini H. Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane. *Mat Res* 2004; 7(2):277-83.

Paulo NM, Lima FG de, Siqueira Júnior JT de, Fleury LFF, Sant'Ana FJF, Borges AC, Telles TC. Membrana de látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*), com e sem polilisina a 0,1% e tela de marlex na reconstrução de defeitos iatrogênicos da parede abdominal de ratos. *Acta Cir Bras* 2005; 20(4):305-10.

Pacheco AB, Henriques PSG. Aumento da faixa de tecido ceratinizado ao redor de implante. *Rev Dental Press Periodontia Implantol* 2011;5(1):29-37.

Pang EK, Paik JW, Jung UI, Kim CS, Cho KS, Kim CK, Choi SH. Effects of chitosan on human periodontal ligament fibroblasts in vitro and on bone formation in rat calvarial defects. *J Periodontol* 2005;76(9):1527-33.

Pinho ECCM, Sousa SJF, Schaud F, Lachat JJ, Coutinho Netto J. Uso experimental da biomembrana de látex na reconstrução conjuntival. *Arq Bras Oftalmol* 2004;67:27-32.

Rainaldi G, Calcabrini A, Santini MT. Positively charged polymer polylysine-induced cell adhesion molecule redistribution in k562 cell. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 1998;9:755-60.

Rabelo RE, Sant'ana JFS, Paulo NM, Romani AF, Silva LAF, Viu MAO, Alves CB, Lima CRO, Silva OC. Emprego do compósito látex, poliamida e polilisina 0,1% na correção de cirurgia de hérnias umbilicais recidivante em bovinos leiteros. *Acta Sci Vet* 2005;33(2):169-75.

Resende DRB de, Greggi SLA, Siqueira AF, Benfatti CAM, Pereira KKY. Avaliação clínica comparativa da sintomatologia após a realização de enxertos gengivais livres autógenos e alógenos para a criação e manutenção de uma faixa de mucosa ceratinizada. *Innov Implant J Biomater Esthet (Online)* 2009;4(2):31-6.

Santamaria MP. Recessões gengivais: implicações clínicas de um problemaprevalente. *Rev Perionews* 2011;5(5):462-8.

Santos JE, Soares JP, Dockal ER. Caracterização de quitosana comerciais de diferentes origens. *Pol Cienc Biotecnol* 2003;13(4):242-9.

Schrott AR. Five-year evaluation of the influence of keratinized mucosa on peri-implant soft-tissue health and stability around implants supporting full-arch mandibular fixed prostheses. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20(10):1170-7.

Seal BL, Otero TC, Panich A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Materials science and Engineering* 2001;34:147-230.

Silva CO, Ribeiro EDP, Tatakis DN, Sallum AW. Efeito do tabagismo na taxa de contração do enxerto gengival livre e na reparação da área doadora: um estudo piloto. *Rev Dental Press Periodontia Implantol* 2008;2(2):28-40.

Silva HSRC, Santos KSCR, Ferreira EI. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química Nova* 2006;29(4):776-85.

Silva CO, Ribeiro EP, Sallum AW, Tatakis DN. Free gingival grafts: graft shrinkage and donor site healing in smokers na non-smokers. J Periodontology 2010;81(5):692-99.

Silva EB, Maniscalco CL. Palatoplastia com biomembrana natural de látex com polilisina a 0,1% em cães com defeito palatino experimentalmente induzido. Semina: Ciências Agrárias 2013;34(2):785-92.

Spin-Neto R, Pavone C, Freitas RM, Marcantonio RAC, Marcantonio Júnior E. Chitosan based biomaterials with medical and dental aplicattion. A literature review. Rev Odontol UNESP 2008; 37(2):155-61.

Suh JKF, Matthew HWT. "Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. J Biomaterials 2000;21(4):2589-98.

Taga R, Cestari CM, Taga EM, Assis GF, Marine MG. Avaliação histológica, radiográfica e morfométrica da reparação de defeito ósseo perene em crânio de cobaia tratado com mistura de osseobond e biohapatita e membrana absorvível de cortical óssea bovina. J Bras Endo Perio 2000;1:78-87.

Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. J Int Med Res 2009;37:1528-42.

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.

XU C, Zhao D, Zhang B, Gao Y. Osteogenesis mechanism of chitosan-coated calcium sulfate pellets on the restoration of segmental bone defects. J Craniofac Surg 2009;20:1445-50.

Wang HL, Carroll WJ. Guide bone regeneration using bone grafts and collagen membranes. Quintessence Int 2001;32(7):504-15.

Wedmore I, McManus JG, Pusateri AE. A special report on the chitosan-based hemostatic dressing: Experience in current combat operations. J Trauma 2006; 60:655-56.

Wennström JL, Derks J. Is there a need for keratinized mucosa around mucosa around implants to maintain health and tissue stability. *Clin Oral Implants Res* 2012; 23(6):136-46.

Wirthlin MR, Yeager JE, Hancock FB, Gauler RW. The healing of gingival wounds in miniature swine. *J Periodontol* 1980;6(51):318-27.

Zimmermann M, Raiser AG, Barbosa ALT, Novosad D, Steffen RPB, Lukarsesk R, Silva MS, Lindinberg R, Júnior SP. Teste de biocompatibilidade e resistência da membrana de látex em cães. *Ciência Rural* 2007;37(6):1719-23.

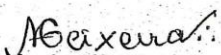
ANEXO A – COMISSÃO DE ÉTICA



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 560/2013 do Pesquisador José Peixoto Ferrão, referente ao projeto de pesquisa “Avaliação histológica da reação inflamatória em calvárias de 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 28 de março de 2014.


Maria Araújo Teixeira

Coordenadora da CEUA/UFMS

Campo Grande, 01 de abril - 2014.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

<http://www.propp.ufms.br/ceua>

ceua@propp.ufms.br

fone (67) 3345-7184