

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
ODONTOLÓGICAS

Juliana da Silva Moro

**BIOCOMPATIBILIDADE DE *SCAFFOLD* NANOFIBROSOS CONTENDO
ANTIBIÓTICOS SOB PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E DE ESTRESSE
OXIDATIVO EM MODELO DE IMPLANTAÇÃO SUBCUTÂNEA EM RATOS**

Santa Maria, RS

2017

Juliana da Silva Moro

**BIOCOMPATIBILIDADE DE SCAFFOLD NANOFIBROSOS CONTENDO
ANTIBIÓTICOS SOB PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E DE ESTRESSE
OXIDATIVO EM MODELO DE IMPLANTAÇÃO SUBCUTÂNEA EM RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de concentração em Odontologia, ênfase em Patologia Bucal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Ciências Odontológicas**.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cristiane Cademartori Danesi
Coorientadora: Dr.^a Raquel Cristine Silva Barcelos

Santa Maria, RS
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Moro, Juliana da Silva
BIOCOMPATIBILIDADE DE SCAFFOLD NANOFIBROSOS CONTENDO
ANTIBIÓTICOS SOB PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E DE ESTRESSE
OXIDATIVO EM MODELO DE IMPLANTAÇÃO SUBCUTÂNEA EM RATOS /
Juliana da Silva Moro.- 2017.
65 p.; 30 cm

Orientador: Cristiane Cademartori Danesi
Coorientador: Raquel Cristine Siva Barcelos
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Odontológicas, RS, 2017

1. Biocompatibilidade 2. Electrospinning 3. Scaffolds
4. Estresse Oxidativo I. Cademartori Danesi, Cristiane
II. Siva Barcelos, Raquel Cristine III. Título.

Juliana da Silva Moro

**BIOCOMPATIBILIDADE DE SCAFFOLD NANOFIBROSOS CONTENDO
ANTIBIÓTICOS SOB PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E DE ESTRESSE
OXIDATIVO EM MODELO DE IMPLANTAÇÃO SUBCUTÂNEA EM RATOS**

Dissertação apresentado ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de concentração em Odontologia, ênfase em Patologia Bucal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em ciências Odontológicas**.

Aprovado em 17 de julho de 2017:

Cristiane Cademartori Danesi, Dra. (UFSM)
(Presidente da banca/Orientadora)

Carlos Heitor Moreira, Dr. (UFSM)

Manuela Favarin Santini Sonza, Dra. (UNIFRA)

Santa Maria, RS
2017

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais, Tania e Luis, a minha irmã, Tatiane, e ao meu
namorado, Thiago*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por minha vida, pela minha família e por ter me dado forças para superar as dificuldades.

Aos meus pais, Tania e Luís, que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida. Tudo o que eu sou hoje é graças aos seus esforços e dedicação. Muito obrigada por tudo, essa vitória também é de vocês.

Ao meu namorado Thiago, pelo companheirismo, carinho, amor e pela paciência durante todos os momentos difíceis. Obrigada por fazer parte da minha vida e me fazer tão feliz.

À minha irmã Tatiane, pelo constante incentivo, carinho e por sempre acreditar em mim.

Aos meus sogros Benonio e Marlene, pelo constante apoio, carinho e por me acolherem tão bem na sua família.

Aos demais familiares e amigos, pelo incentivo e apoio constantes.

À minha Orientadora Cristiane Cademartori Danesi, pela orientação, confiança e oportunidade de realizar o mestrado sob a sua orientação. A você, a minha gratidão, respeito e admiração.

À minha Coorientadora Raquel Barcelos, pela confiança, dedicação, disponibilidade e auxílio durante a realização deste trabalho. Muito obrigada!

À professora Karla Kantorski, pelo auxílio e oportunidade de realizar este trabalho.

À minha colega Patrícia Passos, pela amizade, risadas, paciência e dedicação que sempre teve comigo.

À minha colega Silvana Rodrigues, pela amizade, auxílio durante todo o experimento e pelos momentos de descontração.

Aos meus colegas da patologia, Victor e Luisa, pela amizade, conversas e parceria.

Ao técnico de laboratório Everton pelo auxílio durante o experimento e pelas conversas que animavam minhas manhãs.

Ao professor Roberto Marinho pelo auxílio durante o período de experimento.

À banca examinadora pela disponibilidade em participar da avaliação do meu trabalho.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas pela excelência em ensino e infraestrutura disponibilizada para a execução deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES, pelo apoio financeiro durante o meu estudo.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada!

RESUMO

BIOCOMPATIBILIDADE DE SCAFFOLD NANOFIBROSOS CONTENDO ANTIBIÓTICOS SOB PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM MODELO DE IMPLANTAÇÃO SUBCUTÂNEA EM RATOS

AUTORA: Juliana da Silva Moro

ORIENTADORA: Profa. Dr^a Cristiane Cademartori Danesi

COORIENTADORA: Dr^a Raquel Cristine Silva Barcelos

Os *scaffold* são biomateriais amplamente utilizados na área médica e industrial, podendo ser utilizados como potenciais suportes farmacológicos para a medicina regenerativa e em sistemas de liberação de fármacos. Diante disso, o presente estudo tem como objetivo avaliar a biocompatibilidade dos *scaffold* nanofibrosos de Polidioxanona (PDS) contendo os antibióticos Metronidazol ou Ciprofloxacina em modelo animal de implantação subcutânea. Sessenta ratos Wistar, machos adultos foram randomicamente divididos em seis grupos experimentais: (I) SHAM (controle negativo; sem *scaffold*; n=10), (II) PDS (controle positivo; PDS sem antimicrobiano; n=10), (III) 1MET (um *scaffold* PDS 25m% Metronidazol; n=10), (IV) 2MET (dois *scaffold* PDS 25m% Metronidazol; n=10), (V) 1CIPRO (um *scaffold* PDS 25m% Ciprofloxacina; n=10) e (VI) 2CIPRO (dois *scaffold* PDS 25m% Ciprofloxacina; n=10). Após 3 e 30 dias da implantação subcutânea dorsal dos *scaffold*, metade de cada grupo experimental foi anestesiada, eutanasiada e o tecido correspondente àquela área foi removido para as avaliações histomorfométricas de infiltrado inflamatório. Além disso, o plasma foi utilizado para a análise de biomarcadores oxidativos. Os achados da análise histológica mostraram que os grupos com *scaffold* de PDS contendo os antimicrobianos apresentaram, após 3 dias da implantação, inflamação local leve a moderada, com aumento no número de vasos sanguíneos, demonstrando maior intensidade nos grupos com dois *scaffold* de PDS contendo os antimicrobianos. Porém, 30 dias após a implantação, observou-se uma redução significativa ($p=0.019$) da resposta inflamatória em todos os grupos experimentais. Três dias após a implantação dos *scaffold*, os grupos 2MET, 1CIPRO e 2CIPRO apresentaram os maiores níveis de espécies reativas (ER) quando comparado ao grupo SHAM. A peroxidação lipídica foi observada em todos os grupos que tiveram *scaffold* implantados subcutaneamente, com exceção do grupo 1CIPRO. Além disso, a presença de *scaffold* com Metronidazol ou Ciprofloxacina na região subcutânea dorsal foi relacionada com o aumento dos níveis da defesas antioxidantes plasmáticas não-enzimáticas GSH e VIT C. Trinta dias após a implantação dos *scaffold*, todos os grupos apresentavam maiores níveis de ER plasmáticas comparados ao grupo SHAM, porém com os níveis de peroxidação lipídica, de GSH e VIT C similares entre si. A partir dos resultados desse estudo, podemos sugerir que os *scaffold* de PDS contendo os antimicrobianos Metronidazol ou Ciprofloxacina são biocompatíveis, podendo ser promissores sistemas de liberação de fármacos.

Palavras-chave: Antimicrobianos. Biomarcadores oxidativos. *Electrospinning*. *Scaffold*.

ABSTRACT

BIOCOMPATIBILITY OF NANOFIBROSOS SCAFFOLD CONTAINING ANTIBIOTICS UNDER INFLAMMATORY PARAMETERS AND OXIDATIVE STRESS IN MODEL SUBCUTANEOUS IMPLANTATION IN RATS

AUTHOR: Juliana da Silva Moro

ADVISOR: Profa. Dra. Cristiane Cademartori Danesi

CO-ADVISOR: Dra. Raquel Cristine Silva Barcelos

Scaffolds are biomaterials widely used in medical and industrial areas and can be used as potential pharmacological supports for regenerative medicine and in drug delivery systems. Therefore, the present study aims to evaluate the biocompatibility of polydioxanone nanofibrous scaffold (PDS) containing the antibiotics Metronidazole or Ciprofloxacin in an animal model of subcutaneous implantation. Sixty Wistar rats, adults and males were randomly divided into six experimental groups: (I) SHAM (negative control, without scaffold; n = 10), (II) PDS (positive control, PDS without antimicrobial; n = 10), (III) 1MET (one scaffold PDS 25m% Metronidazole; n=10); (IV) 2MET (two scaffold PDS 25m% Metronidazole; n = 10), (V) 1CIPRO (one scaffold PDS 25m% Ciprofloxacin; n = 10) and (VI) 2CIPRO (two scaffold PDS 25m% Ciprofloxacin; n = 10). After 3 and 30 days of dorsal subcutaneous implantation of the scaffold, half of each experimental group was anesthetized, euthanized, and the tissue corresponding to that area was removed for the histomorphometric evaluations. In addition, plasma was used for the analysis of oxidative biomarkers. Histological analysis showed that groups with PDS scaffold containing antimicrobials showed, after 3 days of implantation, mild to moderate local inflammation, with increase in number of blood vessels, showing greater intensity in the groups with two scaffold of PDS containing the antimicrobials. However, 30 days after implantation, a significant reduction ($p = 0.019$) of the inflammatory response was observed in all experimental groups. Three days after the implantation of the scaffold, the 2MET, 1CIPRO and 2CIPRO groups presented the highest levels of reactive species (RE) when compared to the SHAM group. Lipid peroxidation was observed in all groups that had scaffold implanted subcutaneously, with the exception of the 1CIPRO group. In addition, the presence of scaffold with Metronidazole or Ciprofloxacin in the dorsal subcutaneous region was related to increased levels of the non-enzymatic plasma antioxidant GSH and VIT C. Thirty days after the implantation of the scaffold, all groups had higher levels of ER. Compared to the SHAM group, but with levels of lipid peroxidation, GSH and VIT C similar to each other. From the results of this study, we can suggest that PDS scaffold containing the antimicrobials Metronidazole or Ciprofloxacin are biocompatible, and drug delivery systems may be promising.

Key Words: Antibiotics. Biomarkers Oxidative. *Electrospinning*. Scaffold.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Tríade da Engenharia de Tecidos.....	15
Figura 2 - Configuração de um <i>eletrospinning</i>	17
Figura 3 - Representação da estrutura química do polímero Polidioxanona.....	19
Figura 4 - Confeção dos <i>scaffold</i> de PDS.....	24
Figura 5 - Protocolo experimental.....	26
Figura 6 - Localização do <i>scaffold</i> no tecido subcutâneo dorsal em ratos.....	28
Figura 7 - Esquema da localização dorsal da implantação dos <i>scaffold</i> em ratos....	29
Figura 8 - Procedimentos para a implantação dos <i>scaffold</i> no interior da loja cirúrgica subcutânea dorsal em ratos.....	30
Figura 9 - Área removida referente a localização dorsal do <i>scaffold</i>	31
Figura 10 – Fragmento para análise histológica: região central e externa.....	32
Figura 11 - Infiltrado inflamatório nos diferentes grupos experimentais após 3 dias de implantação subcutânea dorsal dos <i>scaffold</i> em ratos.....	38
Figura 12- Infiltrado inflamatório nos diferentes grupos experimentais após 30 dias de implantação subcutânea dorsal dos <i>scaffold</i> em ratos.....	39
Figura 13 - Comparação do infiltrado inflamatório dicotomizado após a implantação subcutânea dorsal dos <i>scaffold</i> nos diferentes períodos avaliados.....	40
Figura 14 - Perfil oxidativo plasmático dos animais em 3 e 30 dias em cada grupo experimental após o implante subcutâneo dorsal dos diferentes <i>scaffold</i>	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos graus inflamatórios após 3 e 30 dias da implantação subcutânea dorsal de <i>scaffold</i> em ratos.....	36
Tabela 2 - Infiltrado inflamatório após a implantação subcutânea dorsal dos <i>scaffold</i> em cada grupo experimental nos diferentes períodos avaliados.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μm	micrômetros
μs	micro-segundos
<i>Ad libitum</i>	À vontade
ADA	American Dental Association
ANSI	American National Standard Institute
CAT	Catalase
ERO	Espécies Reativas do Oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
g	grama
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
HE	Hematoxilina e Eosina
ISO	International Organization for Standardization
kV	Quilovolt
IP	Intraperitoneal
LPO	Peroxidação Lipídica
mg/kg	miligrama por quilograma
mL	mililitro
mm	milímetros
m%	Porcentagem em massa
mW	miliwatts
nm	nanômetros
PDS	Polidioxanona
PGA	Poliglicólico
PLA	Polilactido
PLGA	Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)
RTG	Regeneração Tecidual Guiada
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	OBJETIVOS.....	13
1.1.1	Objetivo Geral.....	13
1.1.2	Objetivos Específicos.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	ENGENHARIA DE TECIDOS.....	14
2.2	OS SCAFFOLDS: CONCEITO, FUNÇÕES E FABRICAÇÃO.....	15
2.3	SISTEMA DE TRANSPORTE DE FÁRMACOS UTILIZANDO METRONIDAZOL E CIPROFLOXACINA.....	17
2.4	O POLÍMERO POLIDIOXANONA	19
2.5	BIOCOMPATIBILIDADE.....	19
2.6	ESTRESSE OXIDATIVO.....	21
3	MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	23
3.2	ASPECTOS ÉTICOS	23
3.3	PREPARAÇÃO DOS SCAFFOLDS.....	23
3.4	MODELO ANIMAL.....	25
3.5	PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	25
3.6	PROTOCOLO DE ANALGESIA.....	26
3.7	CEGAMENTO DOS OPERADORES.....	26
3.8	PROTOCOLO DE IMPLANTAÇÃO SUBCUTÂNEA DOS SCAFFOLDS.....	26
3.9	EUTANÁSIA E COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO.....	29
3.10	ANÁLISES HISTOLÓGICAS.....	30
3.10.1	Processamento do material para análise histológica.....	31
3.10.1	Coloração com Hematoxilina-Eosina (HE).....	32
3.10.3	Mensuração e análise histológica.....	32
3.11	ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	33
3.11.1	Determinação de peroxidação lipídica.....	33
3.11.2	Determinação de GSH.....	34
3.11.3	Determinação de Vitamina C.....	34
3.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
4	RESULTADOS	35
4.1	ANÁLISE DESCRITIVA DO GRAU INFLAMATÓRIO.....	35
4.2	ANÁLISE QUANTITATIVA DA INTENSIDADE INFLAMATÓRIA.....	39
4.3	ANÁLISE DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	40
5	DISCUSSÃO	43
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
	REFERÊNCIAS	49
	ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	59

1 INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos é uma área em ascensão, uma vez que objetiva a regeneração de órgãos e tecidos em doenças de difíceis tratamentos pelos métodos convencionais. Considerada uma ciência multidisciplinar, esta área envolve conhecimentos em ciências da saúde, materiais e engenharia (IKADA, 2006; DAAR, 2013). Perdas dentárias ocasionadas por patologias de origem inflamatória, traumática ou neoplásicas ainda são comuns na odontologia, fazendo-se necessário terapias regenerativas, recuperando a função do tecido lesado (RAI et al, 2015; ZAKY; CANCCEDA, 2009).

A regeneração de tecidos utiliza três elementos básicos, nomeadamente, células, fatores de crescimento e os *scaffold* (IKADA, 2006). Os *scaffold* são estruturas que mimetizam a matriz extracelular, utilizados como suporte celular, como agente de transporte de nutrientes e resíduos (LIU; XIA; CZERNUSZKA, 2007) e como um sistema de liberação de fármacos (GARG et al., 2012). O sistema de liberação de fármacos possibilita a administração de um componente biologicamente ativo de maneira controlada, diminuindo os seus efeitos tóxicos e secundários (HOFFMAN, 2008; YIH; AL-FAND, 2006). Nesse processo, os *scaffold* são usados a fim de alcançar uma distribuição dos fármacos com uma elevada concentração e eficiência, em lugares específicos. Porém, para cumprir esta função e ser considerado ideal, o *scaffold* precisa apresentar certos requisitos, como biocompatibilidade, biodegradabilidade, boas propriedades mecânicas, volume apropriado da estrutura, aderência de interface, fácil execução ou implantação, porosidade, vida útil longa, fácil fabricação e devem estar isentos de efeitos tóxicos secundários (BEHAR-COHEN, 2002; GARG et al., 2012).

Os *scaffold* poliméricos biodegradáveis estão sendo muito utilizados na engenharia de tecidos, uma vez que fornecem um ambiente adequado para o crescimento celular e tecidual, como também para a administração de fármacos (CHUNG; PARK, 2007). Eles podem ser compostos de polímeros naturais ou sintéticos, que apresentam maiores vantagens em relação aos naturais por apresentarem fácil processabilidade, degradação controlada, e podem ser fabricados a partir de diferentes polímeros (PETER et al., 1998).

Entre as técnicas de fabricação dos *scaffold*, o *eletrospinning* destaca-se por ser econômica, de fácil execução e eficiente para a fabricação de fibras micro e

nanométricas, proporcionando características superiores se comparada as demais técnicas (DUQUE; RODRIGUEZ; LOPEZ, 2013). Essas características são a grande área superficial, a flexibilidade na superfície, a alta porosidade e o alto rendimento mecânico (HUANG et al., 2003; LI et al., 2002). Em consequência, essas fibras podem ser usadas em uma ampla variedade de aplicações médicas como em vasos sanguíneos artificiais, sistema de liberação de fármacos, entre outras (CHIU et al., 2005).

Na Odontologia, o sistema de liberação de fármacos utilizando *scaffold* nanofibrosos vem sendo amplamente estudado em diferentes aplicações (BOTTINO et al., 2013; CHATURVEDI, 2012) como uma alternativa à administração sistêmica de antibióticos e seus efeitos colaterais indesejáveis (REISEA et al., 2012). À vista disso, para desenvolver tais estudos e, posteriormente, serem utilizados clinicamente, realizam-se experimentos *in vitro* e *in vivo*, permitindo avaliar os riscos e as questões de segurança biológica do material utilizado (SILVA et al., 2015). Os testes em animais (*in vivo*) são procedimentos, muitas vezes, simples e rápidos, usados para identificar a biocompatibilidade dos materiais (MASTRANTONIO, 2007).

Nesse contexto, Bottino e colaboradores (2013) fabricaram um sistema de liberação de fármacos que emprega o polímero sintético de Polidioxanona (PDS) contendo os antibióticos Metronidazol ou Ciprofloxacina e avaliaram a citocompatibilidade do biomaterial e seu efeito antimicrobiano frente a bactérias endodônticas. O resultado deste estudo *in vitro* foi promissor, sendo que os antibióticos inibiram as bactérias patogênicas. Porém, para os *scaffold* serem utilizados em humanos, é necessário um estudo *in vivo* a fim de verificar a biocompatibilidade do PDS enquanto biomaterial.

A biocompatibilidade refere-se à interação entre um sistema ou tecido do organismo com um biomaterial ou um dispositivo médico, sem que este cause reações prejudiciais ao ser vivo (WILLIAMS, 2008). A implantação de um biomaterial no organismo induz uma reação tecidual, que pode resultar em um processo inflamatório. Esta resposta inflamatória está ligada a uma série de eventos que visa impedir o dano tecidual e ativar os processos de reparação (BAUMANN; GAULDIE, 1994). Porém, se a inflamação apresentar grande intensidade e durabilidade, esta pode ser prejudicial o organismo (KUMAR et al., 2008).

O evento inicial da resposta inflamatória é a fase aguda, de duração relativamente curta, responsável pela limpeza da ferida e a deposição de matriz

provisória (ANDERSON, 2001). Inicialmente, os vasos se dilatam, fluindo o sangue para o local da lesão e, após, um coágulo é formado para cicatrizar a ferida (FOURNIER et al., 2003). Paralelo a esse evento, os leucócitos se aderem ao endotélio dos vasos sanguíneos, infiltrando-se no tecido. As células predominantes dessa fase são os neutrófilos, uma vez que são os glóbulos brancos mais numerosos e rápidos a serem recrutados ao local da lesão. Já os monócitos, posteriormente transformados em macrófagos, são recrutados no tecido lesado, porém em menor número (RATNER, 2002). Ao persistirem os estímulos inflamatórios, estes podem levar à uma inflamação crônica, caracterizada pela proliferação de macrófagos, linfócitos, vasos sanguíneos e fibroblastos com finalidade de reestruturar a área lesada (JOHNSTON, 1988). Durante o processo inflamatório, por ação das células leucocitárias, podem ocorrer a liberação de espécies reativas do oxigênio (EROs) (KUMAR, 2008). As EROs diferem do oxigênio no seu estado fundamental e caracterizam-se pela acentuada reatividade e sua habilidade em promover mudanças oxidativas no interior celular (PRYOR, 1986).

O organismo possui um sistema de defesa contra a ação deletéria das EROs, denominado de sistema de defesa antioxidantes que é composto por antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (BRIGANTI; CAMERA; PICARDO, 2003). Entre os antioxidantes enzimáticos, a glutathione peroxidase (GPx), a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD) desempenham um papel central. Os antioxidantes não enzimáticos presentes nas células, por sua vez, incluem compostos sintetizados no organismo como a melatonina, a ceruloplasmina, a bilirrubina, os hormônios sexuais, a coenzima Q, o ácido úrico, o α -tocoferol, a ubiquinona, o β -caroteno, o ácido ascórbico (VIT C) e a glutathione reduzida (GSH) (BRIGANTI; CAMERA; PICARDO, 2003; SCHAFFER; BUETTNER, 2001; SIES, 1999). Também fazem parte do sistema de defesa antioxidante não enzimático as substâncias antioxidantes obtidos através da dieta e/ou suplementação, como a VIT C, o α -tocoferol, o β -caroteno e os compostos fenólicos de plantas (flavonóides) (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

Quando a produção de EROs excede a capacidade antioxidante endógena, ocorre um desequilíbrio denominado de estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984). Dependendo da extensão, o estresse oxidativo pode levar à morte celular por apoptose, uma vez que as EROs oxidam componentes celulares vitais como lipídios de membrana, proteínas e DNA (SIMONIAN; COYLE, 1996). Durante esse processo de desequilíbrio, a oxidação dessas biomoléculas gera

metabólitos específicos, que são considerados marcadores de estresse oxidativo, os quais podem ser provenientes da peroxidação lipídica (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979) e da carbonilação proteica (YAN, 1995). Além destes, o doseamento dos níveis dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos pode ser, também, um meio indireto de avaliar o estresse oxidativo (HUANG; PRIOR, 2005).

Até o momento, nenhum estudo foi conduzido para avaliar a biocompatibilidade de *scaffolds* contendo Metronidazol e Ciprofloxacina sobre a resposta inflamatória local e estresse oxidativo sistêmico em um modelo de implantação subcutânea em ratos. Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a biocompatibilidade de um sistema de entrega de fármacos por meio de *scaffold* nanofibrosos de PDS contendo Metronidazol ou Ciprofloxacina em um modelo de implantação subcutânea dorsal em ratos, sob parâmetros inflamatórios e estresse oxidativo sistêmico. Espera-se que os grupos com implantados com *scaffold* de PDS contendo os antimicrobianos supracitados apresentem uma resposta inflamatória de baixa intensidade e não prejudicial ao organismo e com padrão oxidativo tal qual ao grupo contendo apenas o PDS, mostrando biocompatibilidade.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a biocompatibilidade dos *scaffold* de PDS contendo Metronidazol ou Ciprofloxacina em modelos de implantação subcutânea em ratos por meio de análise histológica e bioquímica em 3 e 30 dias.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a intensidade inflamatória induzida por *scaffold* contendo Metronidazol após 3 a 30 dias da sua implantação subcutânea dorsal;
- Avaliar a intensidade inflamatória induzida por *scaffold* contendo Ciprofloxacina após 3 a 30 dias da sua implantação subcutânea dorsal;
- Avaliar parâmetros de estresse oxidativo sistêmico e defesas antioxidantes não enzimáticas após 3 e 30 dias da implantação de *scaffold* contendo Metronidazol;
- Avaliar parâmetros de estresse oxidativo sistêmico e defesas antioxidantes não enzimáticas após 3 e 30 dias da implantação de *scaffold* contendo Ciprofloxacina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

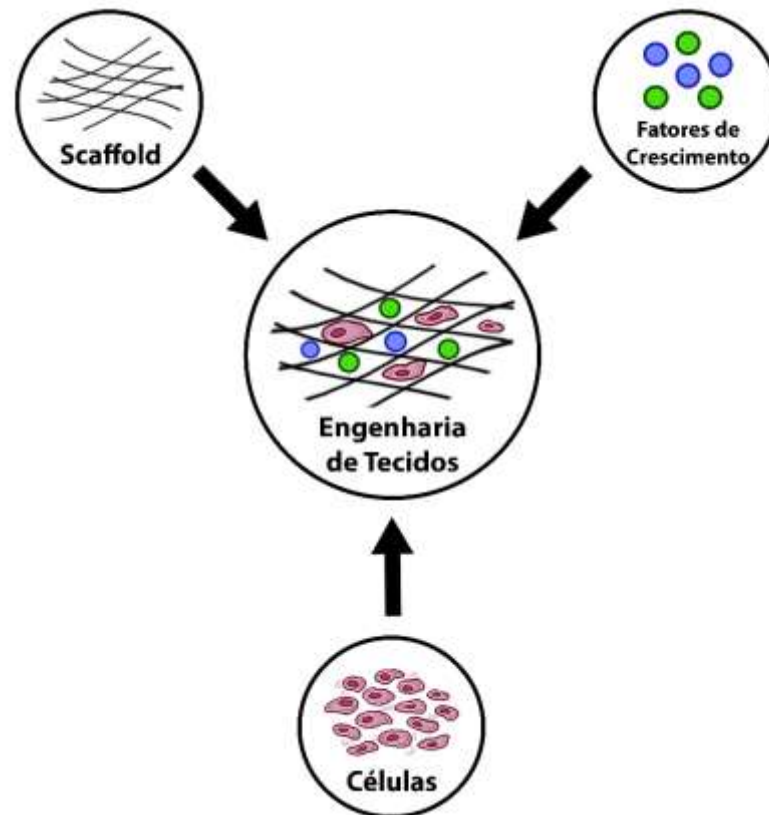
2.1 ENGENHARIA DE TECIDOS

O aumento da demanda de transplantes de órgãos, danificados por patologias ou traumas, impulsionou a pesquisa por alternativas para a regeneração de tecidos e órgãos (BAJAJ et al., 2013). Nesse contexto, uma nova área da saúde destaca-se nas pesquisas, a engenharia de tecidos. A engenharia de tecidos é uma área multidisciplinar, que envolve áreas como a medicina e as engenharias, visando criar novos tecidos (IKADA, 2006). Porém, para que essa área possa cumprir o seu papel, são necessários três elementos básicos: as células, os fatores de crescimento e os *scaffold* ou matriz celular artificial (figura 1) (RAI et al., 2015). As células apresentam uma importante função, uma vez que são responsáveis pela secreção da matriz do novo tecido. Já os fatores de crescimento têm como atribuição a promoção e facilitação da função celular. Os *scaffold*, por sua vez, atuam como uma matriz extracelular, permitindo a diferenciação, proliferação e biossíntese celular (IKADA, 2006).

Na Odontologia, há a necessidade de terapias regenerativas que sejam capazes de recuperar a função do tecido danificado, perdido por patologias dentárias traumáticas e inflamatórias, tais como as doenças de origem endodôntica e periodontais, cárie dentária, entre outras. (BOSSU et al., 2014). Neste contexto, a regeneração tecidual guiada visa corrigir os defeitos periodontais e ósseos, utilizando um *scaffold* entre o tecido conjuntivo gengival e o tecido ósseo alveolar. Assim, o *scaffold* age como uma barreira protetora que impede a migração de células do tecido gengival em direção ao defeito ósseo, a fim de que as células progenitoras localizadas no tecido periodontal possam recolonizar e regenerar o tecido ósseo, periodontal, além do cimento (BOTTINO, 2012). Tentativas de regeneração do complexo dentina-polpa, além de regeneração óssea e cartilaginosa utilizando *scaffold* contendo células-tronco também têm sido recentemente pesquisadas (NEEL et al., 2014; RAI et al., 2015).

Neste contexto, o futuro da engenharia de tecidos na Odontologia é bastante promissor e espera-se que esta nova abordagem possa regenerar os tecidos danificados pelas diferentes patologias dentárias, visando a regeneração completa do órgão dental.

Figura 1 - Tríade da engenharia de tecidos



Fonte: Moro et al., 2017.

2.2 OS SCAFFOLDS: CONCEITO, FUNÇÕES E FABRICAÇÃO

Os *scaffolds* são biomateriais indicados para interagir com os sistemas biológicos e propõem-se a tratar ou substituir um tecido ou órgão lesionado (O'BRIEN, 2011). Apresentam uma arquitetura tridimensional que proporcionam um ambiente adequado às células, impedindo a migração das células ou tecidos que perturbem o local a ser regenerado (IKADA, 2006). Além dessas funções, podem ser usados em um sistema de liberação de fármacos (GARG et al., 2012).

Para cumprir suas funções, o *scaffold* precisa apresentar uma série de requisitos, como biocompatibilidade, biodegradabilidade, boas propriedades mecânicas e porosidade. A biocompatibilidade é uma das principais características que deve estar presente, uma vez que evita as reações imunológicas, citotóxicas e inflamatórias do organismo, as quais impedem o desempenho regenerativo do biomaterial (LE, 2013; BEHAR-COHEN, 2002; GARG et al., 2012). Já a capacidade

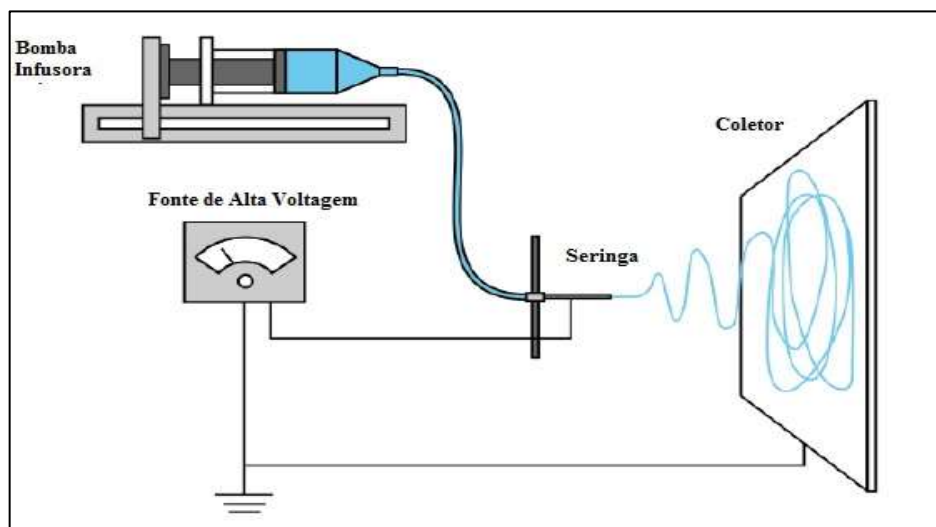
de biodegradabilidade permite que as células do próprio organismo degradem o *scaffold*, dando lugar ao novo tecido (BROWN et al., 2009). Além disso, os *scaffolds* precisam ter boas propriedades mecânicas e de compatibilidade com aquelas do tecido ou órgão a ser substituído. Porém, materiais com tais características ainda são um desafio para a engenharia de tecidos (O'BRIEN, 2011). Também é de fundamental importância que os *scaffolds* apresentem poros de tamanho adequado, visto que estes asseguram a penetração celular e a difusão de nutrientes necessários às células para o interior da estrutura, bem como a retirada dos produtos residuais para fora da estrutura (HUTMACHER, 2001). Além dessas características, os *scaffolds* usados como um sistema de entrega de fármacos devem apresentar uma dispersão homogênea da droga ao longo de sua e, ter uma afinidade de ligação suficientemente baixa com o fármaco, permitindo que este seja liberado numa dosagem não tóxica. Além disso, o *scaffold* deve apresentar uma estrutura física, química e biológica estável por um longo período de tempo (GARG et al., 2012).

Na fabricação de *scaffolds*, diferentes tipos de materiais podem ser usados, tais como cerâmicas, metais e polímeros. Neste contexto, os polímeros ganham destaque por possuírem biodegradabilidade e grande flexibilidade no seu processamento (BAJAJ et al., 2014). Tais polímeros podem ser de origem natural, sendo compostos de colágeno, fibrina e ácido hialurônico; ou ser de origem sintética, como os compostos de polímeros como o poli (etileno glicol), o polilactido (PLA), o poliglicólido (PGA) e seu copolímero de poli (lactido-co-glicosido) (PLGA) (BAOLIN; PETER, 2015). Os materiais sintéticos apresentam uma maior taxa de sucesso, uma vez que fornecem versatilidade ao criar a arquitetura do *scaffold*, permitem o controle das propriedades mecânicas e físicas, além de possuírem capacidade de degradação (BAJAJ et al., 2014). Várias técnicas estão envolvidas na fabricação desse biomaterial, como a liofilização, a separação de fases, o *foaming*, a prototipagem rápida, o *eletrospinning*, entre outras (ZHU; CHEN, 2013). A técnica do *eletrospinning* possui vantagens por ser de fácil execução, possuir versatilidade e ser, relativamente, de baixo custo (LIM; MAO; 2009).

A técnica de *eletrospinning* utiliza os seguintes componentes: uma seringa a partir da qual o material é forçado a sair; um aparelho de alta tensão com polaridades positiva e negativa, o qual está ligado diretamente ao material (fluido); e um coletor (Figura 2) (SILL; RECUM, 2008; DUQUE; RODRIGUEZ; LOPEZ, 2012). Esta técnica segue o princípio eletrostático, em que as forças geradas por uma alta tensão são

aplicadas na solução polimérica, forçando sua saída de maneira controlada e constante. Durante este processo, o solvente evapora e o polímero solidifica-se, resultando em fibras, que são depositadas em um coletor (BOUDRIOT et al., 2006; DAN LI, 2004).

Figura 2 - Configuração de um *eletrospinning*



Fonte: Modificado de DUQUE; RODRIGUEZ; LOPEZ (2012).

2.3 SISTEMA DE TRANSPORTE DE FÁRMACOS UTILIZANDO METRONIDAZOL E CIPROFLOXACINA

A curto e a longo prazo, os antibióticos administrados sistemicamente podem erradicar a flora normal do organismo, induzindo um desequilíbrio na microbiota, eliminando as cepas sensíveis e selecionando as resistentes (AMINOV, 2009). Além disso, podem gerar reações de hipersensibilidade e infecções oportunistas (CASSELL; MEKALANOS, 2001). À vista disso, é de suma importância a investigação de alternativas de administração de fármacos que não causem resistência bacteriana e toxicidade ao organismo, com efeito local adequado e de maneira controlada, por meio de concentrações baixas do medicamento.

Assim, o sistema de transporte de fármacos pode ser um método alternativo para a administração dessas substâncias (FELICE; PRABHAKARAN, 2015). Esse sistema faz com que os fármacos possam atingir tecidos específicos mantendo a sua concentração por um tempo específico (KANNAN, et al., 2005). Além disso, este

sistema propicia ao fármaco o acesso direto à circulação sistêmica, evitando o metabolismo de primeira passagem que ocorre no fígado (JAVALI; VANDANA, 2012). Nesse contexto, as concentrações dos fármacos, contidos no sistema de liberação, estão diretamente relacionados com a toxicidade local, sendo então, essencial à pesquisa por uma concentração ideal que não cause injúrias ao tecido (TESFAMARIAM, 2008).

Diferentes sistemas têm sido pesquisados como meios de transporte dos fármacos, entre eles as micros e nanopartículas (FIALHO; CUNHA, 2007). Essas são estruturas poliméricas que contêm as drogas, podendo ser preparadas a partir de polímeros sintéticos, como a poli (p-dioxanona) (GOONOO et al., 2015).

Dentre os fármacos utilizados nesses sistemas, o Metronidazol e a Ciprofloxacina estão sendo pesquisados (CHATURVEDI, 2012; LAN, 2013; BOTTINO et al., 2014; PARWE et al., 2014). O Metronidazol é um antibiótico de baixo custo e eficaz contra bactérias anaeróbicas, utilizado em doenças bacterianas, como as doenças periodontais e *endodônticas* (PRABHAKARAN et al., 2015; BOTTINO et al., 2014). A Ciprofloxacina é um antimicrobiano de amplo espectro, eficaz contra bactérias Gram-negativas e algumas Gram-positivas, utilizado também para tratar uma grande variedade de doenças bacterianas (MURBACH et al., 2014).

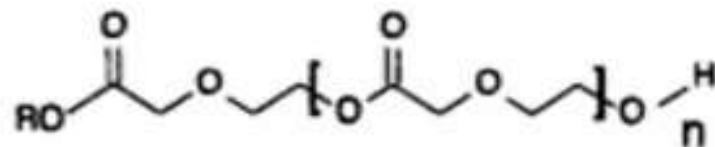
É importante salientar que esses antibióticos administrados sistemicamente podem causar efeitos adversos ao organismo. O Metronidazol apresenta um potencial teratogênico, pertencendo a categoria B na classificação da *Food and Drug Administration* (FDA/EUA), que estabelece a contraindicação da sua administração no primeiro trimestre da gestação. Além disso, esse fármaco pode causar náuseas e vômitos, além de possuir efeitos significantes no citocromo P450 do fígado, inibindo enzimas específicas, dificultando o metabolismo hepático (INMETRO, 2012; ROSE et al., 2007). A Ciprofloxacina também pode causar náuseas, dor de cabeça, vômitos e desconforto abdominal, além de sua administração pertencer a categoria C na classificação da FDA/EUA, durante a gestação (CARRANZA et al., 2007). Assim, a inserção desses antibióticos em um sistema de entrega que possibilite sua administração local pode apresentar vantagens, como a possibilidade de alcançar uma maior concentração do fármaco no sítio desejado, o que pode culminar na redução dos efeitos colaterais indesejados relacionados à sua administração sistêmica (BOTTINO et al., 2014).

2.4 O POLÍMERO POLIDIOXANONA

O polímero Polidioxanona (Figura 3) é um poliéster biocompatível, uma vez que provoca uma reação tecidual mínima (BEZWADA, 1995; SABINA; RONCA; MÜLLER, 2000; VERT et al., 1992) e apresenta excelentes propriedades mecânicas, poder de degradação e boa aplicabilidade na área médica. Está aprovado pelo FDA e é usado comumente em suturas (Ethicon, 1981), como a Polidioxanona (PDS) (SABINA; RONCA; MÜLLER, 2000). Além disso, tal polímero degrada-se por hidrólise química, gerando moléculas de baixo peso molecular, que podem ser metabolizadas ou reabsorvidas pelo organismo. A flexibilidade deste polímero é maior quando comparada a outras suturas monofilamentosas, o que facilita a sua fabricação em diferentes tamanhos (VERT et al., 1992).

No que se refere ao tempo de degradação do fio de sutura de PDS, estudo prévio demonstrou que tal possui uma perda de força tensora de 14% em 14 dias, 31% em 42 dias e uma reabsorção completa em seis meses (FOSSUM, 2014).

Figura 3 - Representação da estrutura química do polímero Polidioxanona



Fonte: Modificado de DOMB; KOST; WISEMAN (1998)

2.5 BIOCAMPATIBILIDADE

A biocompatibilidade de um material refere-se a sua capacidade realizar sua função, com uma resposta adequada do hospedeiro em uma situação específica (DONARUMA, 1987). No contexto da engenharia de tecidos, Willians (2008) redefiniu a biocompatibilidade como sendo a capacidade de um material desempenhar sua função sem provocar quaisquer efeitos locais ou sistêmicos indesejáveis no organismo, gerando uma resposta tecidual ou celular benéfica, e otimizando o desempenho clínico da terapia.

A avaliação da biocompatibilidade de um material leva em consideração fatores como a sua estrutura anatômica. Em outras palavras, um biomaterial pode induzir uma reação adversa em um local específico no organismo, mas não necessariamente causará a mesma resposta em um outro local. Além disso, a biocompatibilidade de um material não depende somente das suas propriedades intrínsecas, mas também da duração da exposição deste material ao tecido (KOHANE; LANGER, 2010).

Existem organizações empenhadas em padronizar os testes de biocompatibilidade dos biomateriais, como a *American Dental Association* (ADA), a *American National Standard Institute* (ANSI) e a *International Organization for Standardization* (ISO). Conforme a ADA e a ANSI, para a avaliação da biocompatibilidade, devem ser seguidas os seguintes níveis: primeiramente são realizados testes iniciais ou primários (*in vitro*), em que são preconizados os ensaios de citotoxicidade, potencial mutagênico e carcinogênico em meio celular. Após, o material deve ser avaliado *in vivo* (testes secundários) em animais de pequeno porte, nos quais esse material deve ser implantado subcutaneamente e verificado o seu potencial imunogênico e de toxicidade sistêmica. Finalmente são realizados os testes de aplicações dos materiais em animais de grande porte e após, em humanos (SEHNEM, 2012).

Como mencionado anteriormente, a biocompatibilidade é a habilidade de um biomaterial extrair uma resposta tecidual positiva do organismo (WILLIANS, 2008). Tal resposta tecidual, inclui a reação inflamatória, a qual é responsável pelo processo de reparação, cicatrização e reconstituição do tecido conjuntivo. No entanto, apesar da inflamação ser um mecanismo de defesa do organismo, o seu processo pode ocasionar danos consideráveis e lesionar os tecidos saudáveis se apresentar uma grande intensidade e duração (KUMAR et al., 2008).

A colocação de um biomaterial sobre um tecido ou no seu interior gera uma série de reações que poderão ser observadas ao longo do tempo. As principais reações são: (I) a inflamação aguda caracterizada pela presença de neutrófilos, edema e alterações vasculares; (II) a inflamação crônica, com infiltração de células mononucleares (macrófagos, linfócitos e plasmócitos); (III) a proliferação de vasos sanguíneos (angiogênese) e de fibroblastos; (IV) as respostas mutagênicas e de genotoxicidade, entre outras (WILLIANS, 2008). Simultaneamente à resposta inflamatória pode-se observar o processo de reparo também induzido pelo biomaterial, que se refere à restauração da arquitetura do tecido e de suas funções, e envolve a

proliferação de células e a matriz extracelular. Os tecidos podem ser reparados por regeneração, com completa restauração das funções e forma ou por reposição do tecido conjuntivo, a qual envolve os processos de angiogênese, migração e proliferação de fibroblastos, síntese de colágeno e remodelação (KUMAR et al., 2008). Diante disso, a biocompatibilidade de um biomaterial frente a um tecido pode ser definida por meio de respostas inflamatórias, observada em diferentes períodos após a implantação do biomaterial (ANDERSON, 2001). Assim, as análises histológicas do tecido circunscrito ao biomaterial estudado é, comumente, o meio usado para este tipo de estudo (ANDERSON, 2001; ONUKI, et al., 2008).

2.6 ESTRESSE OXIDATIVO

Sob condições normais, uma pequena quantidade de oxigênio pode ser reduzida por um, dois ou três elétrons, dando origem ao radical superóxido (O_2^{\bullet}), ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ao radical hidroxil (OH^{\bullet}), respectivamente (CADET; KAHLER, 1994). Estas substâncias são denominadas EROs, diferem do oxigênio no seu estado fundamental e caracterizam-se pela acentuada reatividade e sua habilidade em promover mudanças oxidativas no interior celular (PRYOR, 1986). As EROs são derivadas do metabolismo do oxigênio, liberadas durante o seu processo de redução. Fisiologicamente, estas espécies são produzidas para ajudar na manutenção da homeostase celular ou na regulação de reações de oxirredução em tecidos saudáveis (DEVASAGAYAM et al., 2004). Além disso, em baixas concentrações, atuam na formação de energia na forma de adenosina trifosfato (ATP) e são usadas, também, para a defesa contra agentes infecciosos (SLATER, 1984).

Em contrapartida, a produção excessiva de EROs, aliada à deficiência dos mecanismos de defesa antioxidantes, podem ser prejudiciais ao organismo. Este desequilíbrio induz a oxidação de lipídios de membrana, proteínas, carboidratos e DNA, gerando um quadro denominado estresse oxidativo (VALKON et al., 2007). O estresse oxidativo está envolvido da patogênese de muitas doenças como o câncer, as doenças neurológicas, periodontite, entre outras (DALLE-DONNE et al., 2006; TEMSAH; NETTICADAN, 2000; EI ASSAR, ÂNGULO; RODRÍGUEZ, 2013). Além disso, uns aumentos nos níveis das EROs podem estar envolvidos em uma variedade de situações clínicas, classificadas de acordo com as características fisiopatológicas, como: a toxicidade por produtos químicos e xenofóbicos, hiperoxigenação, doenças

degenerativas, dietas, medicamentos e reações inflamatórias (PINCEMAIL, 1995; BIANCHI, 1999).

O processo de estresse oxidativo gera metabólitos específicos, denominados de marcadores do estresse oxidativo, que podem ser identificados e quantificados. Por meio desses marcadores, o dano oxidativo de componentes celulares pode ser avaliado, seja através da quantificação dos produtos finais da peroxidação lipídica, como o malondialdeído (MDA), seja pela quantificação dos níveis de carbonilação de proteínas. Pode-se avaliar, também, as defesas antioxidantes enzimáticas, como os níveis de GPx, a atividade da CAT e da SOD, que são as principais enzimas na linha de defesa contra a alta geração de EROs, e as defesas antioxidantes não enzimáticas como a GSH e a VIT C (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; AMES; SHIGENAGA; HEGEN, 1993; ONDEI et al., 2014). Além disso, no sangue, circulam importantes antioxidantes como a VIT C, GSH, entre outros, além dos biomarcadores dos danos oxidativos como o MDA e as EROs, podendo ser considerado uma excelente fonte de marcadores de estresse oxidativo (VASCONCELOS et al., 2007).

Durante a inflamação há a geração de EROs por meio das células responsáveis pela imunidade do organismo (neutrófilos, eosinófilos, macrófagos), que podem causar injúrias aos tecidos adjacentes, como também agravar o processo inflamatório. Portanto, situações em que envolvam uma resposta inflamatória aguda ou crônica, o estresse oxidativo estará presente como um agravante, sendo responsabilidade dos agentes antioxidantes neutralizar este processo (CONNER; GRISHAM, 1996).

Referente a implantação tecidual de um biomaterial, além dos processos inflamatórios, os produtos da degradação do material (íons e detritos moleculares dos materiais) podem induzir, de maneira direta e indireta, na liberação de EROs. Isso ocorre principalmente nos polímeros sintéticos, uma vez que durante o processo de eliminação dessas partículas pelas células de defesa do organismo (neutrófilos, macrófagos e células gigantes), essas liberam, também, espécies reativas do oxigênio (MOUTHUY et al., 2016).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Estudo experimental em modelo animal, controlado e cego.

3.2 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM (027/2013) e aprovado sob o protocolo CEUA nº 4141250315. O projeto encontra-se de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (Lei 11.794) e da Ética no Uso de Animais da UFSM.

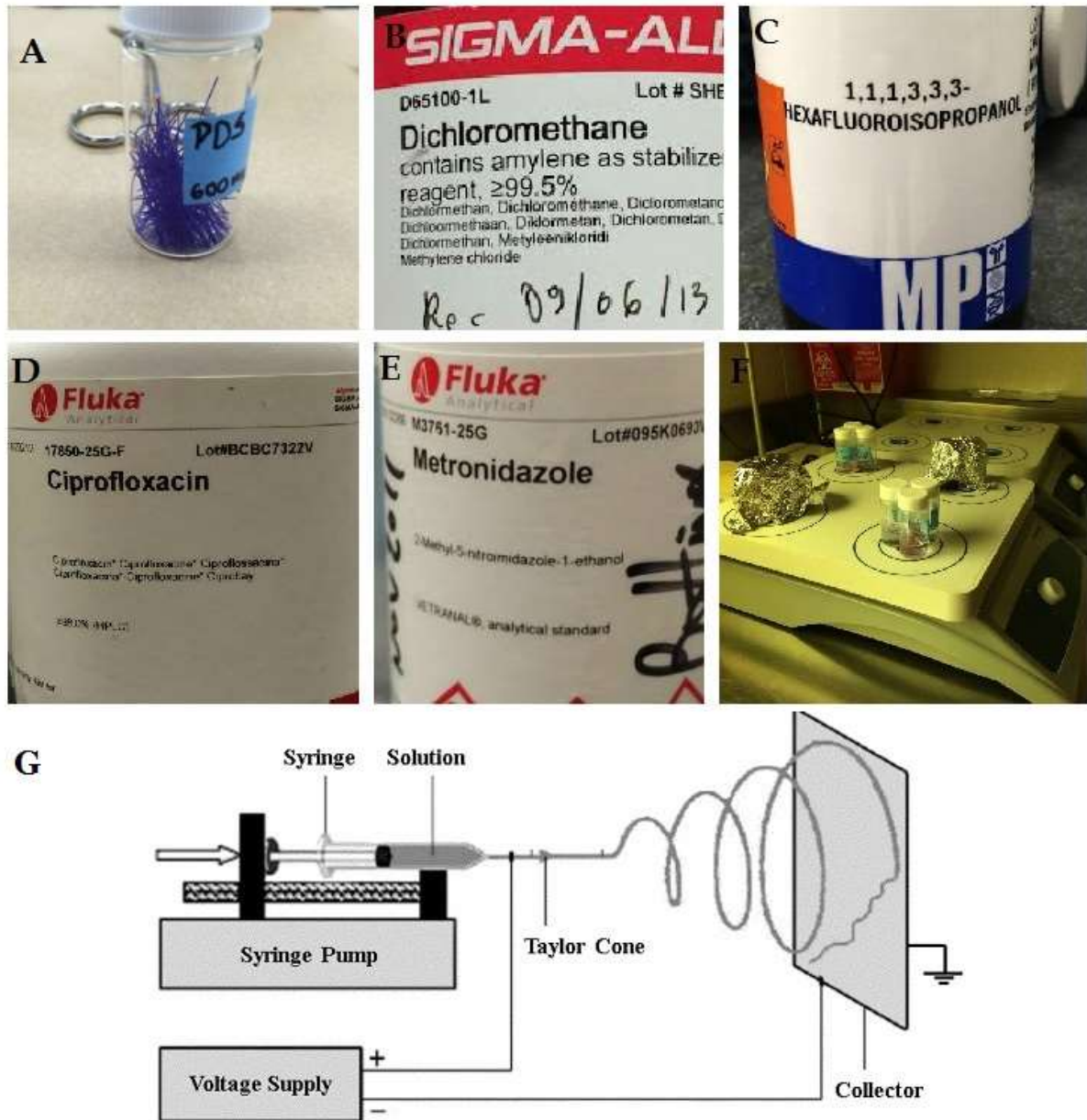
3.3 PREPARAÇÃO DOS SCAFFOLDS

A metodologia da preparação dos *scaffolds* segue o protocolo de Bottino et al. 2013. Para remover o corante violeta, os fios de sutura de monofilamentos de PDS (PDS®, Ethicon, Somerville, NJ, EUA) foram cortados dentro de um recipiente de vidro contendo diclorometano (Sigma Aldrich®, St Louis, MO, EUA). A seguir, o PDS foi dissolvido em 1,1,1,1,3,3,3-hexafluor-2propanol (Sigma Aldrich®, St Louis, MO, EUA) em uma concentração de 10m%, sob agitação. O Metronidazol (Sigma Aldrich®, St Louis, MO, EUA) com peso molecular de 171.15g/mol e a Ciprofloxacina (Sigma Aldrich®, St Louis, MO, EUA) com peso molecular de 331.34g/mol foram individualmente e diretamente adicionados ao PDS na concentração de 25m%. Ambos os antibióticos foram mensurados em relação ao peso total de PDS sob intensa agitação.

O sistema de liberação de drogas foi sintetizado pela técnica de *eletrospinning*. O PDS puro ou soluções de PDS contendo cada antibiótico foram carregadas em seringas plásticas (5mL) contendo uma agulha metálica e *electrospin* sob parâmetros padronizados (2mL/h, 18cm de distância, 15kV). As fibras foram coletadas em temperatura ambiente e envoltas em folhas de papel alumínio. Os *scaffolds*

nanofibrosos foram secos a temperatura ambiente por 48h a fim de remover o solvente remanescente.

Figura 4 - Confeção dos *scaffold* de PDS



(A) Fragmentos de fio de sutura de PDS. (B) Solução de diclorometano para remover a coloração violeta do fio de sutura de PDS. (C) Solução de hexafluoropropanolol para dissolver o fio de sutura de PDS. (D) (E) Antibióticos utilizados nos *scaffold*. (F) Mistura dos componentes sob intensa agitação. (G) Figura esquemática da máquina eletrospinning.
Fonte: Autoria própria.

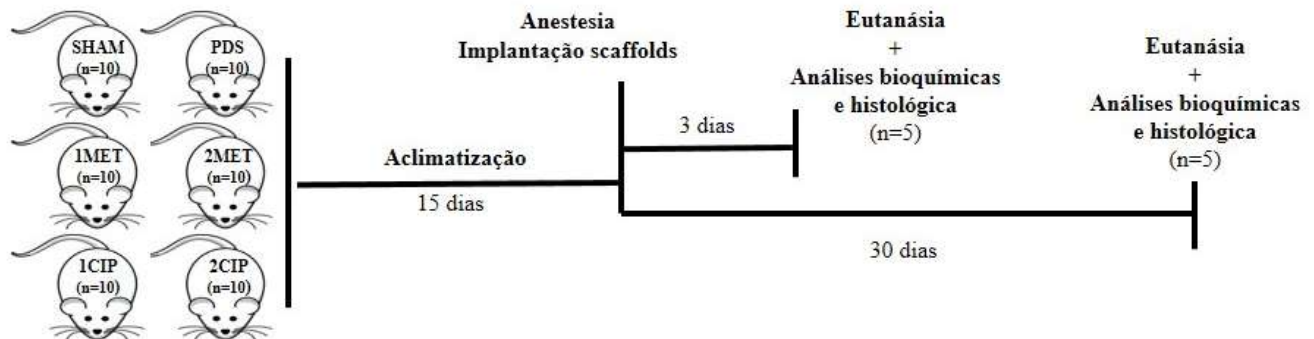
3.4 MODELO ANIMAL

Baseado em outros estudos encontrados na literatura, foram utilizados 60 machos da espécie *Rattus norvegicus* do stock Wistar, com 3 meses de idade e massa corporal entre 250-300g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Os animais foram mantidos em gabinetes para biotério, os quais estavam alocados em uma sala climatizada com controle de luminosidade (ciclo claro/escuro de 12h), com ruídos no máximo de 65dB e exaustão de ar (Insight® Equipamentos, Pesquisa e Ensino, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Os ratos foram randomizados (Random Allocation® Software, versão 1.0) e alocados em gaiolas de polipropileno com tamanho de 49x34x16cm, em um microambiente com temperatura de 23°C e umidade relativa próxima a 60%. Cada gaiola apresentava 4 animais em seus respectivos grupos experimentais. Os animais receberam água potável *ad libitum* e ração para roedores (SUPRA® Alisul Alimentos S/A, São Leopoldo, RS, Brasil). A limpeza e a substituição da maravalha estéril (Viruta® de Pinos Elliots; Argentina) foi realizada diariamente com o intuito de permitir que os animais mantivessem limpos e secos. O período de adaptação foi de 15 dias. Durante o experimento foi disponibilizado em cada caixa objetos de enriquecimento ambiental, com o objetivo de minimizar o estresse desses animais.

3.5 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em 6 grupos experimentais em 3 e 30 dias, de acordo com a quantidade (concentração do fármaco) e tipo de antibiótico utilizado no *scaffold* de PDS. Os grupos foram: (I) SHAM (controle negativo; sem *scaffold*; n=5), (II) PDS (controle positivo; PDS sem antimicrobiano; n=5), (III) 1MET (um *scaffold* PDS 25m% Metronidazol; n=5), (IV) 2MET (dois *scaffolds* PDS 25m% Metronidazol; n=5), (V) 1CIPRO (um *scaffold* PDS 25m% Ciprofloxacina; n=5) e (VI) 2CIPRO (dois *scaffolds* PDS 25m% Ciprofloxacina; n=5). O protocolo experimental está ilustrado na Figura 5.

Figura 5 – Protocolo experimental



Fonte: Autoria própria.

3.6 PROTOCOLO DE ANALGESIA

A analgesia foi realizada em dois momentos durante o período experimental: (I) previamente a implantação subcutânea dorsal dos *scaffolds*; e (II) previamente a eutanásia. O analgésico administrado foi o cloridrato de Tramadol (Tramal®, ampola de 2mL, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu Guaçu, SP, Brasil), dose de 20 mg/Kg por via intraperitoneal (IP).

3.7 CEGAMENTO DOS OPERADORES

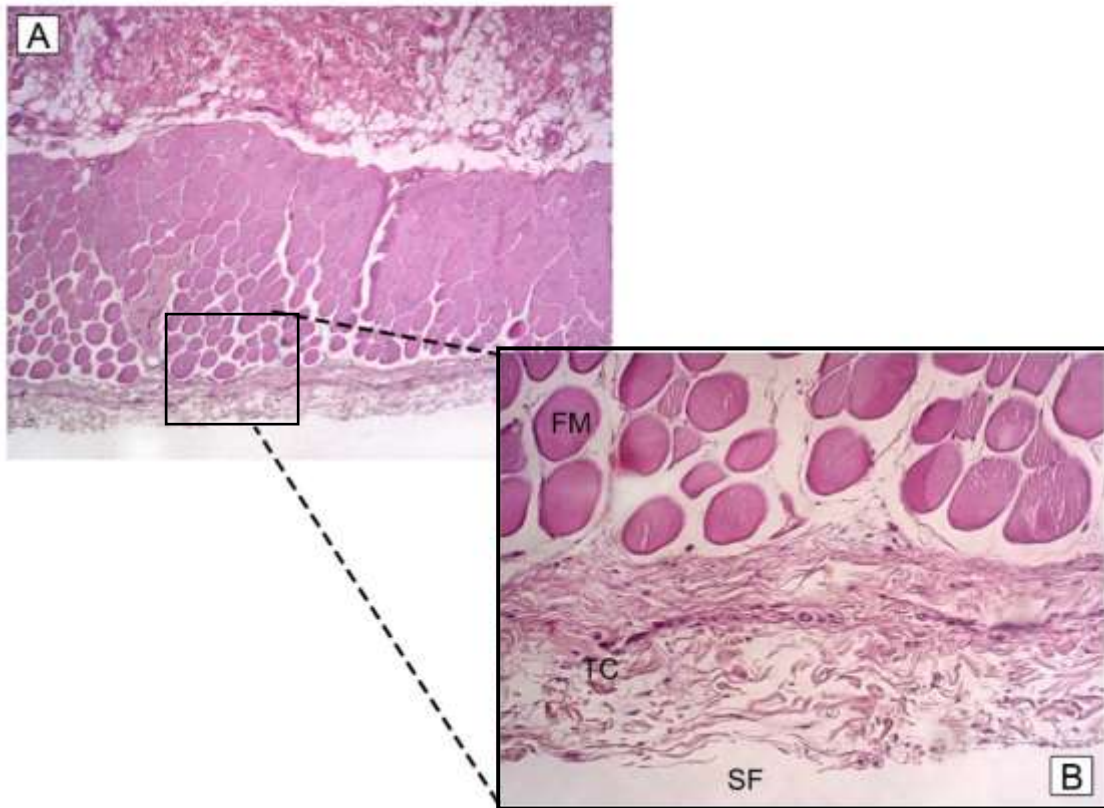
Um operador foi responsável pela anestesia dos animais (J.S.M). Dois operadores foram responsáveis pela implantação subcutânea dorsal dos *scaffold*. Após a assepsia e criação de uma loja cirúrgica, os pesquisadores (S.M.R; P.C.P) receberam os *scaffolds* de um terceiro membro da equipe (A.P.R). Todas as membranas possuíam as mesmas características físicas como coloração, flexibilidade e tamanho.

3.8 PROTOCOLO DE IMPLANTAÇÃO SUBCUTÂNEA DORSAL DOS SCAFFOLD

Decorridos os 15 minutos da administração do analgésico, os animais foram anestesiados com administração intramuscular (IM) de 6mg/Kg de cloridrato de Xilazina 2% (Xilazin®, Syntec do Brasil LTDA, Cotia, SP, Brasil) associada a 70mg/Kg

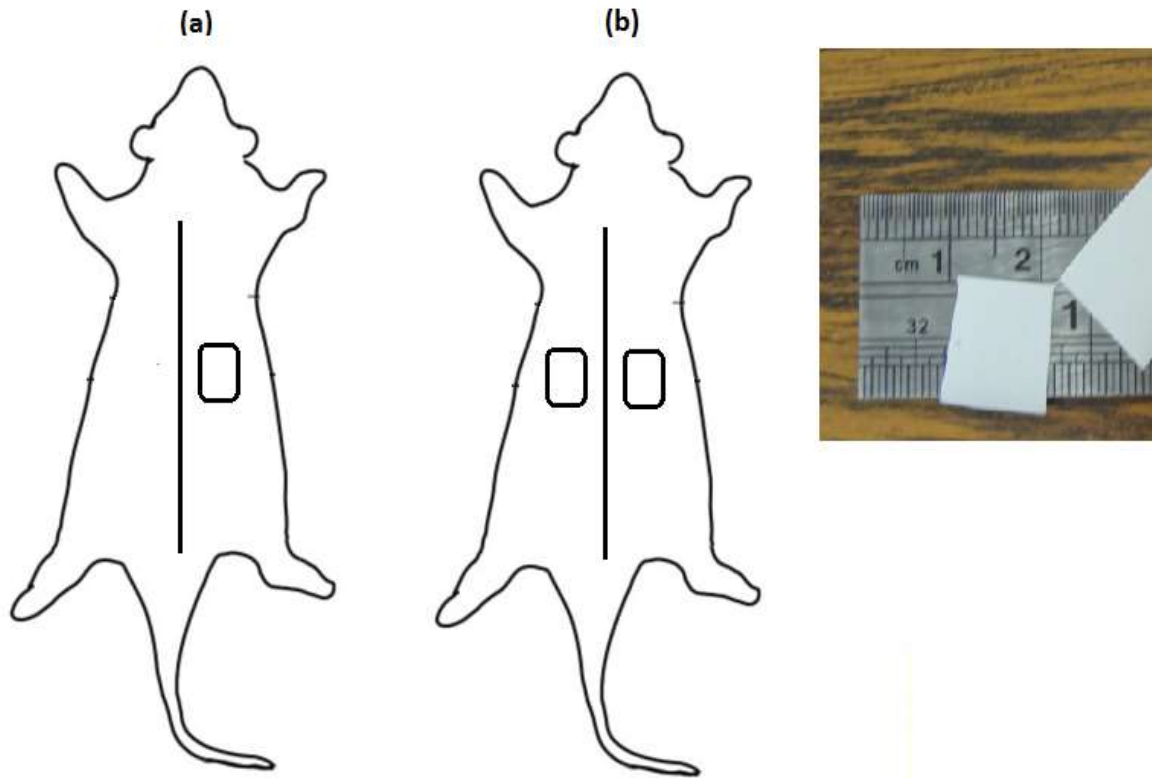
de Cetamina 10% (Cetamin®, Syntec do Brasil LTDA, Cotia, SP, Brasil). Após a analgesia, os animais foram submetidos a tricotomia da região dorsal. A assepsia da área foi realizada com solução de digluconato de clorexidina 2% e isolada com campo cirúrgico estéril. Incisões na pele dorsal de 3cm, perpendicular à linha média, foram realizadas com tesoura cirúrgica, a fim de atingir o espaço subcutâneo. A área subcutânea está situada abaixo da epiderme e derme, e acima do tecido muscular, sendo caracterizada por tecido conjuntivo frouxo. Assim, o *scaffold* ficou situado entre a derme e o tecido muscular (Figura 6). Posteriormente, uma bolsa subcutânea com 3cmx3cm, próxima à linha média dorsal, foi executada utilizando uma tesoura de ponta romba e o *scaffold* de 2cm x 2cm foi implantado (Figura 7). As incisões foram suturadas com fio de seda 4-0, não reabsorvíveis, (Ethicon®, Johnson & Johnson Ltda, São José dos Campos, SP, Brasil) e sobre as linhas de incisão foram aplicadas tiras adesivas (Leukostrip, Smith & Nephe Ltda, SP, Brasil) a fim de proteger o local. Durante o procedimento cirúrgico, os animais receberam lubrificação ocular com solução de hipromelose 5mg (uma gota por olho) e uma bolsa de água quente com temperatura de 60°C foi colocada próximo aos animais para que não perdessem calor durante a recuperação. Após 7 dias, foram removidas as suturas. Durante o período experimental, os animais não receberam nenhum outro tipo de medicação além dos administrados nos procedimentos de implantação e eutanásia. Além disso, nenhum animal morreu durante o experimento. Os procedimentos estão ilustrados na Figura 8.

Figura 6 - Localização do *scaffold* no tecido subcutâneo dorsal em ratos.



(A) Tecido subcutâneo. Magnificação 40x. (B) Campo para análise. Magnificação 100x. Abreviaturas: (FM) Fibras musculares; (TC) Tecido conjuntivo; (SF) *Scaffold*. Coloração HE.

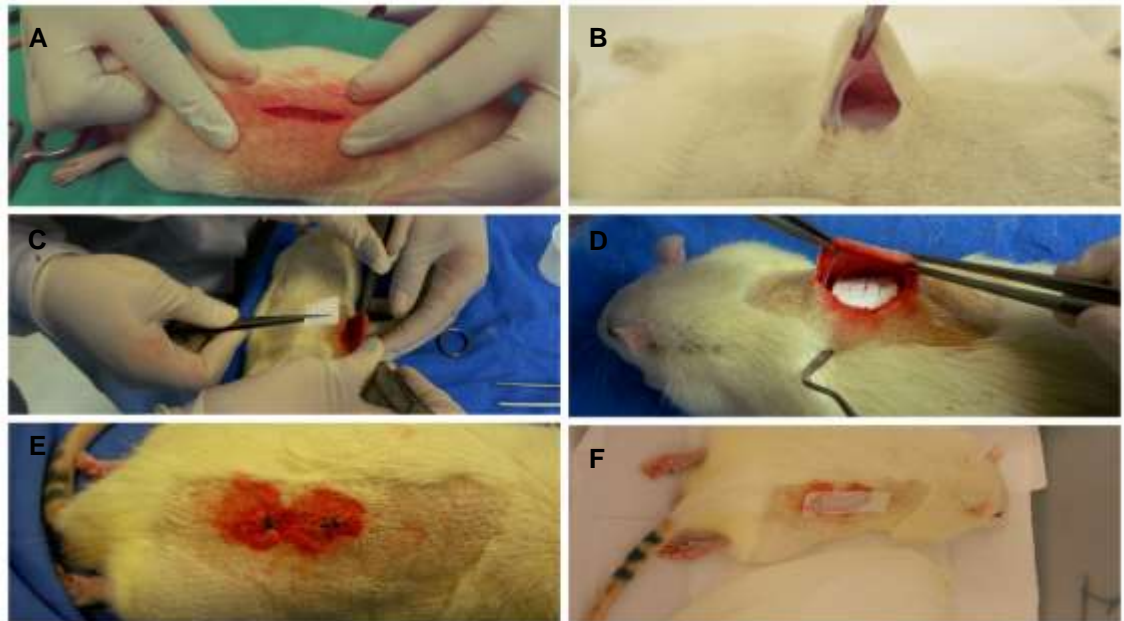
Figura 7 - Esquema da localização dorsal da implantação dos *scaffolds* em ratos



Localização dorsal da implantação dos *scaffolds*. (a) Grupos contendo apenas 1 *scaffold*; (b) Grupos contendo 2 *scaffolds*.

Fonte: Autoria própria.

Figura 8 - Procedimentos para a implantação dos *scaffolds* no interior da loja cirúrgica subcutânea dorsal em ratos

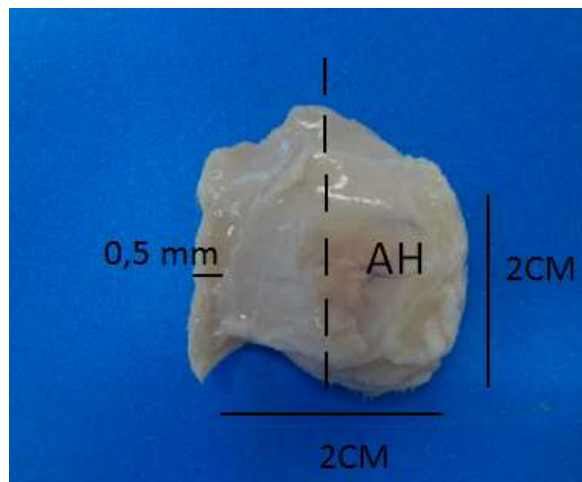


(A) Tricotomia da região dorsal, assepsia e incisão; (B) Loja cirúrgica; (C) Implantação do *scaffold* no interior da loja cirúrgica subcutânea dorsal, (D) *Scaffold* no interior da loja cirúrgica; (E) Sutura; (F) Recuperação do animal com bolsa térmica e tira adesiva
Fonte: Autoria própria

3.9 EUTANÁSIA E COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Após a administração do analgésico opioide Tramadol (2mg/Kg, via IP), os animais foram anestesiados com Isoflurano (Isoflurano®, BioChimico, Itatiaia, RJ, Brasil) em uma campânula de vidro e mantidos em plano anestésico por meio de máscara facial. Foi realizada anestesia local com cloridrato de Lidocaína 2% sem vasoconstritor (Lidojet®, Embu-Guaçu, SP, Brasil) (7mg/Kg) ao longo da linha de incisão para o acesso ao coração. A eutanásia foi executada por exsanguinação cardíaca, após o aprofundamento do plano anestésico. O sangue foi centrifugado e o plasma foi utilizado para as análises bioquímicas. Na sequência, com o auxílio de uma tesoura, foi removida a área dorsal em que estava alojado o *scaffold* (2cm x 2cm) e, aproximadamente, 0,5mm de tecido circunvizinho (Figura 9). Durante este processo, os *scaffold* não aderiram ao tecido, sendo removidos da análise histológica. Um fragmento foi obtido e fixado em formalina tamponada (10%) por 72h para a avaliação histológica.

Figura 9 - Área removida referente a localização dorsal do *scaffold*



Abreviatura: (AH) Análise histológica.
 Fonte: Autoria própria.

3.10 PROCESSAMENTO E ANÁLISES HISTOLÓGICAS

3.10.1 Processamento do material para análise histológica

Após 72 h de fixação em formalina tamponada (10%), os fragmentos referentes à área dorsal, na qual foram implantados os *scaffolds* utilizados para a análise histológica, foram divididos em duas partes (Figura 10), sendo que uma peça representava a região central e outra, a externa. Após o corte dos fragmentos, esses foram dispostos em cassetes para o processamento no processador de tecidos (INTELSINT- EFTP). Após, os blocos foram orientados perpendicularmente ao molde metálico e as peças foram incluídas em parafina. Os cortes histológicos foram realizados por meio de um micrótomo (YD-335 Computerized Microtome) com secção de 5µm das regiões central e periférica. Em seguida, foram montadas as lâminas e colocadas em uma estufa a 60°C por 24h para fundir a parafina. Logo após este processo, a lâmina foi corada com hematoxilina e eosina (HE) para a mensuração da intensidade do infiltrado inflamatório.

Figura 10 – Fragmento para análise histológica: região central e externa



Abreviatura: (C) Central; (E) Externa.
Fonte: Autoria própria.

3.10.2 Coloração com Hematoxilina-Eosina (HE)

As lâminas histológicas da pele dorsal foram coradas com HE, segundo o protocolo do Laboratório de Patologia da UFSM.

Após a desparafinação dos cortes histológicos foi realizada a hidratação. Esse processo inclui os seguintes passos: mergulha-se o cesto contendo as lâminas nas cubas de coloração seguindo a ordem álcool etílico absoluto por 1min; álcool etílico absoluto por 30s; álcool etílico 96°GL por 30s; álcool etílico 70°GL por 1min; água corrente por 1min.

Posteriormente a hidratação, realizou-se a coloração dos cortes histológicos obedecendo a seguinte sequência: corante Hematoxilina de Harris por 2min e 30s; lavagem da cuba em água corrente por 6min; secagem da água; solução de Eosina por 1min e 45s. A seguir foi realizada novamente a desidratação dos cortes histológicos em cubas contendo álcool etílico e, na sequência, foi realizada a fixação do corante e conservação do material em duas cubas contendo Xilol.

3.10.3 Mensuração e análise histológica

As imagens para a análise histológica foram capturadas utilizando um microscópio de luz (Microscópio Óptico Binocular, Carl Zeiss, Alemanha) e transferidas para um monitor, por meio de uma câmera (AxioCam, Erc5s, Alemanha). O programa utilizado para a visualização e análise das imagens foi o software ZEN lite 2012 para Windows.

A intensidade inflamatória foi avaliada por meio de escores, em um aumento de 100x (MOURA, 2014; BAVARIYA, 2013; ØRSTAVIK, MJOR, 1988). As características dos escores são: (0) Ausente: ausência de células inflamatórias; (1) Leve: poucas células inflamatórias, dispersas no tecido conjuntivo; (2) Moderada: um grande número de células inflamatórias localizadamente dispostas; (3) Intensa/Severa: um grande número de células inflamatórias dispersas no tecido conjuntivo. Os dados correspondentes aos graus inflamatórios foram posteriormente dicotomizados e considerados: (I) Boa biocompatibilidade: campos com escores 0 e 1 (ausente e leve); (II) Baixa biocompatibilidade: campos com escores 2 e 3 (moderado e severo) (XUE et al., 2014). Além do infiltrado inflamatório, foi realizada uma análise descritiva no local de implantação, observando a presença de vasos sanguíneos, de fibroblastos e de células gigantes multinucleadas. Foram analisados três campos aleatórios de cada secção (central e externa), somando seis campos por animal e totalizando trinta campos em cada grupo (MOURA, 2014). O avaliador foi treinado e calibrado por um patologista experiente para a análise das lâminas histológicas. Os índices de concordância Kappa inter-examinador e intra-examinadores foi de, respectivamente, 0,92 e , 0,92.

3.11 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

A coleta de sangue foi realizada por punção cardíaca, sob anestesia (cloridrato de xilazina 2%, 6mg/Kg (Xilazin®, Syntec do Brasil LTDA, Cotia, SP, Brasil) associada cetamina 10%, 70mg/Kg (Cetamin®, Syntec do Brasil LTDA, Cotia, SP, Brasil), e o sangue foi centrifugado (1300g por 15 min) para obter o plasma para as análises bioquímicas. Utilizando aparelhos previamente calibrados, foram obtidos os seguintes parâmetros bioquímicos para a avaliação do estresse oxidativo: níveis plasmáticos de espécies reativas, níveis de peroxidação lipídica, níveis de GSH e Vitamina C.

3.11.1 Determinação dos níveis plasmáticos de espécies reativas (ER)

Os níveis de ER plasmáticos foram quantificados utilizando a mensuração da oxidação da diclorofluoresceína que foi determinada a 488nm para excitação e 525nm para emissão (HEMPEL et al., 1999). As amostras foram adicionadas a um meio contendo tampão Tris-HCl (0,01mM; pH 7,4) e 2',7'-diclorofluoresceína diacetato

(DCFH-DA). Após, as amostras foram incubadas, no escuro, durante 1h até o procedimento de medição da fluorescência. Os níveis ER foram corrigidos pelo teor de proteína (LOWRY et al., 1951) e expresso como uma porcentagem dos valores de controle (grupo SHAM).

3.11.2 Determinação dos níveis de peroxidação lipídica plasmática

O dano oxidativo aos lipídios foi estimado por meio da quantificação dos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, do inglês *thiobarbituric acid reactive substances*) por meio do cromógeno rosa, produzido pela reação do ácido tiobarbitúrico com o malondialdeído (MDA), a 100°C e medido espectrofotometricamente a 532nm (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979). Os resultados foram expressos como nmol MDA/mL plasma.

3.11.3 Determinação dos níveis plasmáticos de GSH

Após a reação do plasma com 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico), os níveis plasmáticos de GSH foram determinados, de acordo com Ellman (1959). A fração de proteína do plasma foi precipitada com ácido tricloroacético a 20%, seguido por centrifugação. O teor de GSH foram expresso em GSH nmol/mL plasma.

3.11.4 Determinação dos níveis plasmáticos de VIT C

Para a determinação da VIT C, a técnica realizada foi descrita por Galley et al. (1996) modificada por Jacques-Silva et al. (2001). O plasma foi centrifugado em uma solução de ácido tricloroacético a 5%. Os sobrenadantes foram misturados com 2,4-dinitrofenilhidrazina (4,5mg/mL) e ácido tricloroacético a 13,3% e incubados durante 3h a 37°C. Uma solução de ácido sulfúrico (65%) foi adicionado e as amostras foram medidas espectrofotometricamente a 520nm. Uma curva padrão, utilizando ácido ascórbico foi utilizada para calcular os níveis de VIT C que foram expressos como µg VIT C/mL plasma.

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Primeiramente, os graus inflamatórios foram analisados descritivamente em cada tempo de avaliação (3 ou 30 dias). Para a análise comparativa entre os dois períodos (3 e 30 dias) foi realizado o teste Mann-Whitney-Wilcoxon, utilizando o escore inflamatório em cada grupo. A análise bioquímica foi realizada por meio do teste two-way ANOVA, seguido do teste de Duncan. O programa utilizado nas análises foi o Stata 12.0. O valor de p foi considerado estatisticamente significativo quando <0.05

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DESCRITIVA DO GRAU INFLAMATÓRIO

Após três dias da implantação subcutânea dorsal dos *scaffolds* foi observado um leve infiltrado inflamatório com formação de vasos sanguíneos na maioria das amostras analisadas dos grupos SHAM e PDS. Em poucos campos do grupo PDS foi observado um grande número células inflamatórias em pontos localizados, caracterizando um grau inflamatório moderado.

Nesse mesmo período, nos grupos experimentais 1MET e 1 CIPRO foram observados um grau inflamatório leve na maioria das áreas analisadas e, em poucas áreas, um grau inflamatório moderado. Além disso, foram observados pequenos vasos sanguíneos e proliferação de fibroblastos no tecido circundante aos *scaffolds*. Já nos grupos 2MET e 2CIPRO, foram observados um maior número de áreas caracterizadas por um grau inflamatório moderado, demonstrando maior intensidade da reposta inflamatória (Figura 11).

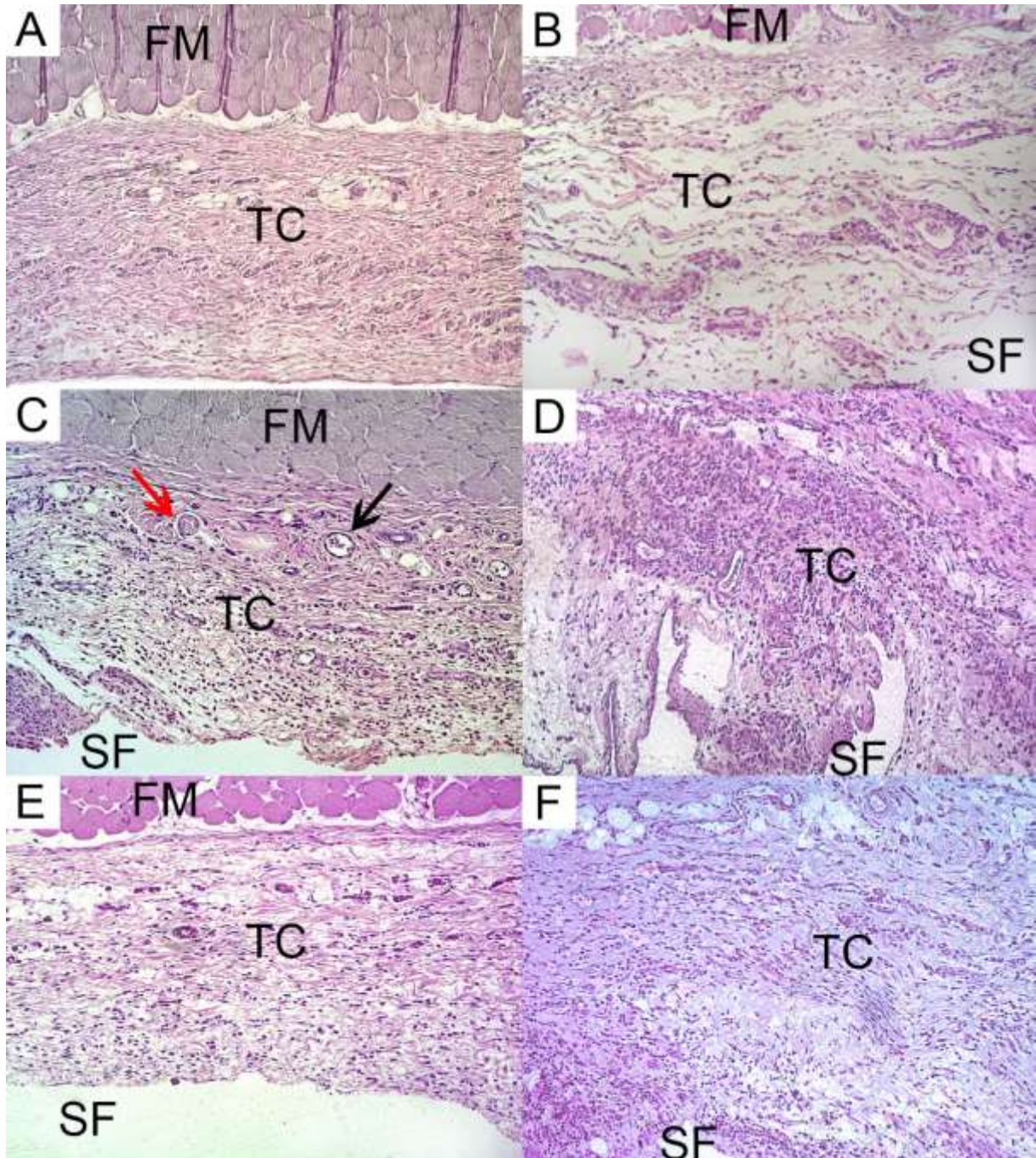
Decorridos os trinta dias de implantação subcutânea dorsal dos *scaffolds*, pode-se observar uma diminuição da intensidade inflamatória em todos os grupos experimentais, destacando-se os grupos 2MET e 2CIPRO (Figuras 12 e 13). Nesse mesmo período, os achados histológicos demonstraram a formação de tecido conjuntivo, angiogênese e discreta presença de células gigantes multinucleadas em todos os grupos experimentais. Além disso, nenhum dos grupos em que os *scaffolds* foram implantados apresentaram degradação completa desse material. A descrição dos dados inflamatórios obtidos após a análise histológica nos diferentes períodos está demonstrada na Tabela 1.

Tabela 1 - Descrição dos graus inflamatórios após 3 e 30 dias da implantação subcutânea dorsal de *scaffold* em ratos

Grupos	3 DIAS				30 DIAS			
	Escore				Escore			
	n (%)				n (%)			
	0	1	2	3	0	1	2	3
SHAM	6 (20)	24 (80)	0	0	18 (60)	12 (40)	0	0
PDS	1 (3)	27 (90)	2 (7)	0	22 (73)	8 (27)	0	0
1MET	8 (27)	19 (63)	3 (10)	0	17 (57)	12 (40)	1 (3)	0
1CIPRO	2 (7)	22 (73)	6 (20)	0	10 (33)	20 (67)	0	0
2MET	1 (3)	14 (47)	15 (50)	0	11 (36)	17 (57)	2 (7)	0
2CIPRO	0	20 (67)	10 (33)	0	13 (43)	14 (47)	3 (10)	0

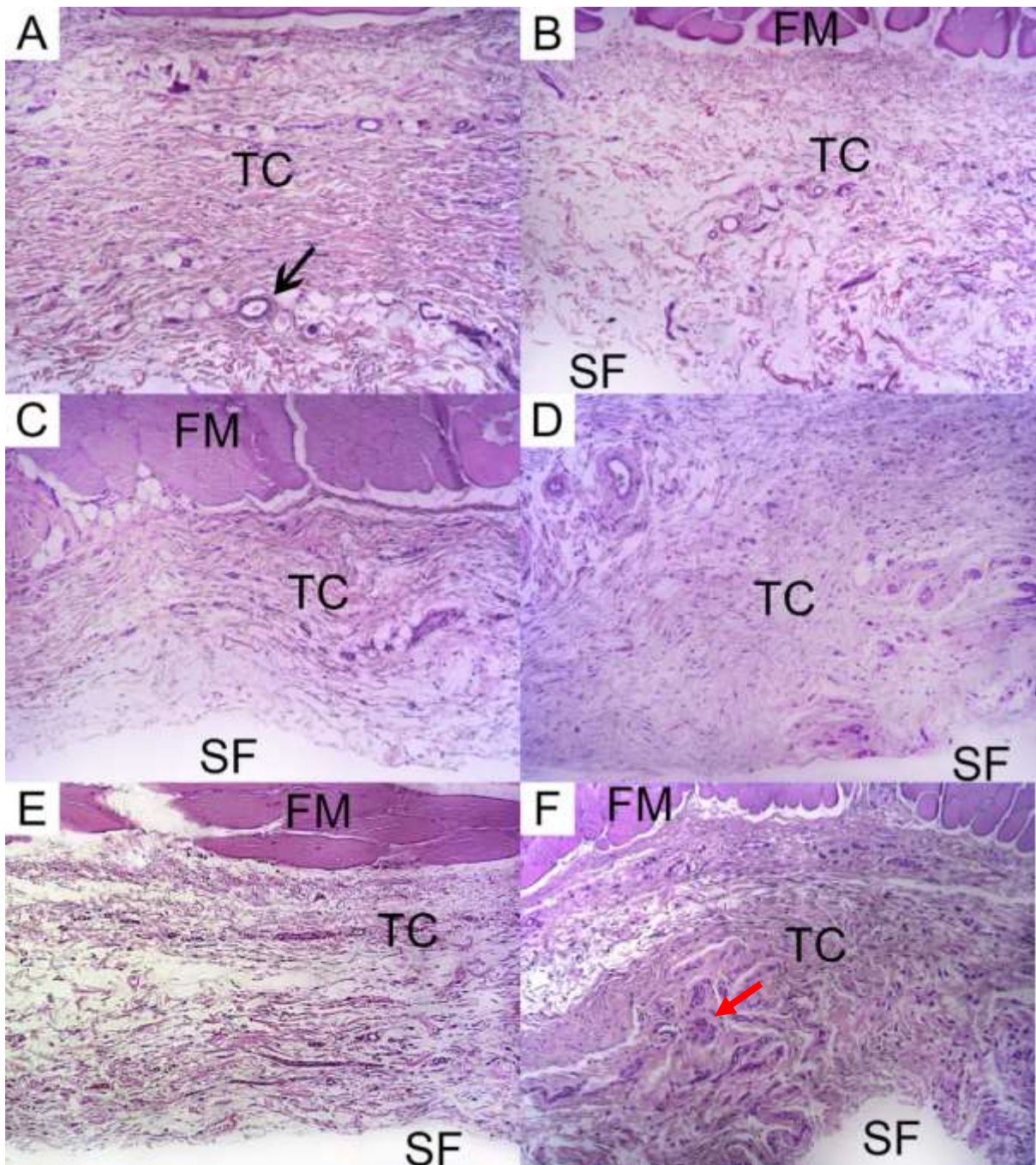
Dados descritivos, obtidos após análise histológica de três campos aleatórios de cada secção (central e externa), totalizando seis campos por animal e 30 campos em cada grupo experimental. Escores: (0) Ausência de células inflamatórias; (1) Leve: poucas células inflamatórias dispersas no tecido conjuntivo; (2) Moderado: grande número de células inflamatórias localizadas; (3) Severo: grande número de células inflamatórias dispersas no tecido conjuntivo. Abreviações: SHAM (controle negativo; sem scaffold), (II) PDS (controle positivo; *scaffold* sem antimicrobiano), (III) 1MET (um scaffold PDS 25m% Metronidazol), (IV) 2MET (dois *scaffold* PDS 25m% Metronidazol), (V) 1CIPRO (um scaffold PDS 25m% Ciprofloxacina) e (VI) 2CIPRO (dois *scaffold* PDS 25m% Ciprofloxacina).

Figura 11 - Infiltrado inflamatório nos diferentes grupos experimentais após 3 dias de implantação subcutânea dorsal dos *scaffolds* em ratos.



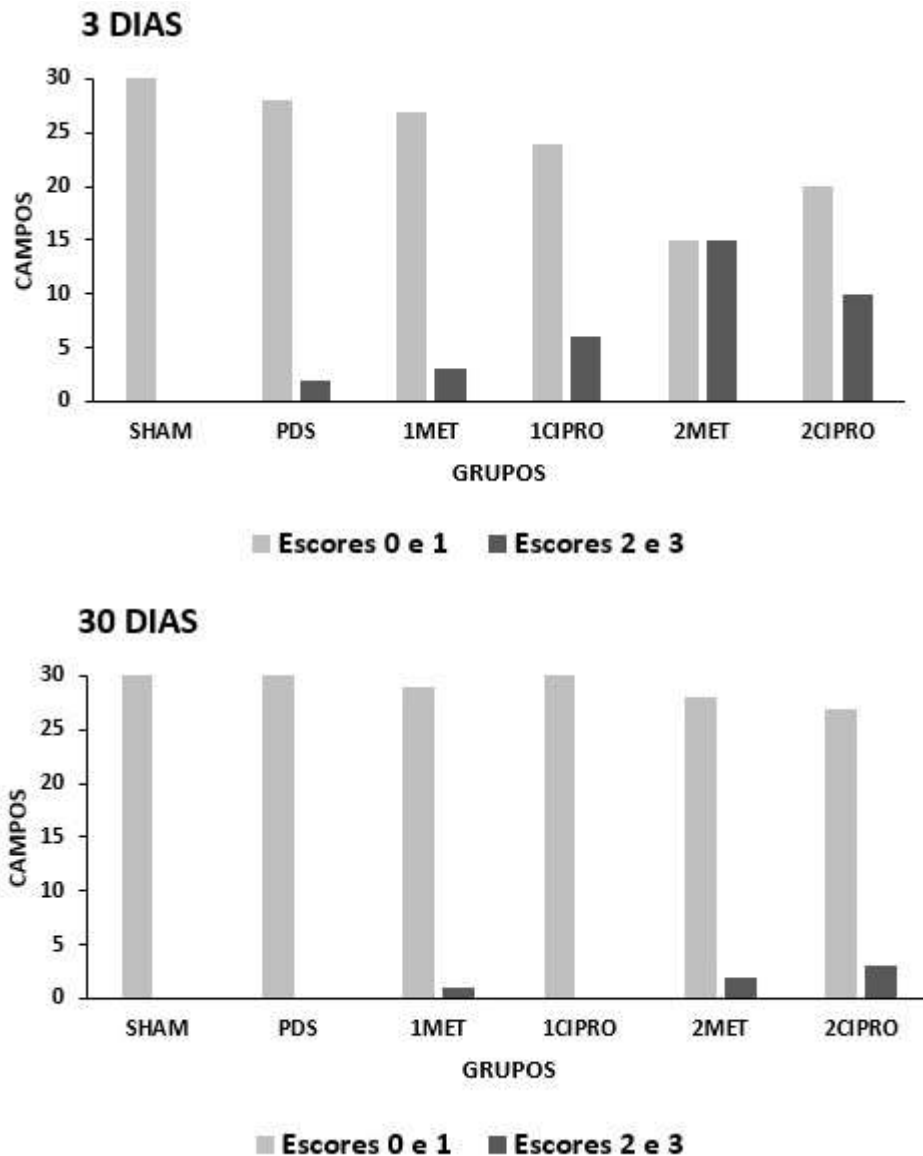
(A) Grupo SHAM (controle negativo; sem implantação de *scaffold*); (B) Grupo PDS (controle positivo; implantação de um *scaffold* PDS sem antimicrobiano); (C) Grupo 1MET (implantação de um *scaffold* PDS 25m% metronidazol) ; (D) Grupo 2MET (implantação de dois *scaffold* PDS 25m% metronidazol); (E) Grupo 1CIPRO (um *scaffold* PDS 25m% ciprofloxacino); (F) Grupo 2CIPRO (dois *scaffold* PDS 25m% ciprofloxacino). Abreviaturas: (FM) Fibras musculares; (TC) Tecido conjuntivo; (SF) Scaffold; (→) Seta preta indica vaso sanguíneo; (→) Seta vermelha indica célula gigante multinucleada. Magnificação: 100x. Coloração HE.

Figura 12 - Infiltrado inflamatório nos diferentes grupos experimentais após 30 dias de implantação subcutânea dorsal dos *scaffolds* em ratos.



(A) Grupo SHAM (controle negativo; sem implantação de *scaffold*); (B) Grupo PDS (controle positivo; implantação de um *scaffold* PDS sem antimicrobiano); (C) Grupo 1MET (implantação de um *scaffold* PDS 25m% metronidazol) ; (D) Grupo 2MET (implantação de dois *scaffold* PDS 25m% metronidazol); (E) Grupo 1CIPRO (um *scaffold* PDS 25m% ciprofloxacino); (F) Grupo 2CIPRO (dois *scaffold* PDS 25m% ciprofloxacino). Abreviaturas: (FM) Fibras musculares; (TC) Tecido conjuntivo; (SF) *Scaffold*; (→) Seta preta indica vaso sanguíneo; (→) Seta vermelha indica célula gigante multinucleada. Magnificação: 100x. Coloração HE

Figura 13 – Comparação do infiltrado inflamatório dicotomizado após a implantação subcutânea dorsal dos *scaffolds* nos diferentes períodos avaliados



Os escores do grau inflamatório foram dicotomizados em: (I) Escores 0 e 1: indicam boa biocompatibilidade; (II) Escores 2 e 3: indicam baixa biocompatibilidade. Escores: (0) Ausência de células inflamatórias; (1) Leve: poucas células inflamatórias dispersas no tecido conjuntivo; (2) Moderado: grande número de células inflamatórias localizadas; (3) Severo: grande número de células inflamatórias dispersas no tecido conjuntivo.

4.2 ANÁLISE QUANTITATIVA DA INTENSIDADE INFLAMATÓRIA

Os grupos experimentais apresentaram diferença significativa ($p=0,019$) quando comparados entre os períodos de 3 e 30 dias, demonstrando que houve uma

diminuição da intensidade inflamatória nos grupos experimentais, após trinta dias da implantação subcutânea dorsal dos *scaffold*. Os dados estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2 - Infiltrado inflamatório após a implantação subcutânea dorsal dos *scaffolds* em cada grupo experimental nos diferentes períodos avaliados

Grupos	3 dias	%	30 dias	%	p
SHAM	1	80	0	60	0.019
PDS	1	90	0	73	
1MET	1	63	0	56	
2MET	2	50	1	56	
1CIPRO	1	73	1	66	
2CIPRO	1	66	0	46	

Dados obtidos após análise de três campos aleatórios de cada seção (central e externa), totalizando seis campos por animal e 30 campos em cada grupo experimental. Escores: (0) Ausência de células inflamatórias; (1) Leve: poucas células inflamatórias dispersas no tecido conjuntivo; (2) Moderado: grande número de células inflamatórias localizadas; (3) Severo: grande número de células inflamatórias dispersas no tecido conjuntivo. A análise estatística revelou um nível de significância de 0.019. Abreviações: SHAM (controle negativo; sem *scaffold*), (II) PDS (controle positivo; *scaffold* sem antimicrobiano), (III) 1MET (um *scaffold* PDS 25m% Metronidazol), (IV) 2MET (dois *scaffold* PDS 25m% Metronidazol), (V) 1CIPRO (um *scaffold* PDS 25m% Ciprofloxacina) e (VI) 2CIPRO (dois *scaffold* PDS 25m% Ciprofloxacina).

4.3 ANÁLISE DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Os parâmetros de estresse oxidativo, aqui apresentados como níveis plasmáticos de espécies reativas (ER), de peroxidação lipídica, GSH e vitamina C foram descritos como média e erro padrão da média nos grupos experimentais, em três e trinta dias. Os dados estão ilustrados na Figura 11.

ANOVA de duas vias revelou uma significativa influência dos diferentes *scaffold* nos níveis plasmáticos de espécies reativas. Após 3 dias da implantação subcutânea dorsal dos *scaffolds*, os grupos PDS, 2MET, 1CIPRO, 2CIPRO mostraram um aumento dos níveis plasmáticos de espécies reativas quando comparados ao grupo SHAM e 1MET. Após 30 dias, os grupos 1MET, 2MET e 2CIPRO mostraram redução dos níveis plasmáticos de espécies reativas quando comparados ao dia 3.

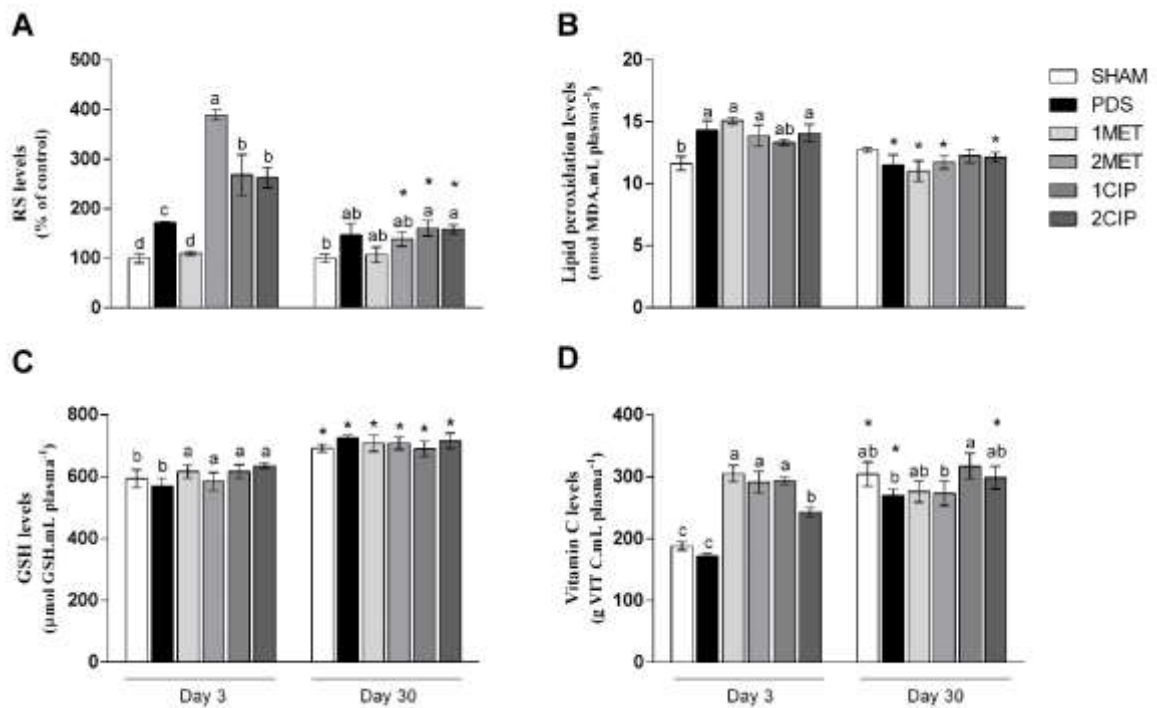
ANOVA de duas vias revelou uma significativa influência dos diferentes *scaffolds* nos níveis plasmáticos de peroxidação lipídica. No dia experimental 3, os grupos PDS, 1MET, 2MET, 1CIPRO, 2CIPRO mostraram um aumento dos níveis plasmáticos de peroxidação lipídica quando comparados ao grupo SHAM. Após 30

dias, os grupos PDS, 1MET, 2MET e 2CIPRO, mostraram redução dos níveis plasmáticos de peroxidação lipídica quando comparados ao dia 3.

ANOVA de duas vias revelou uma significativa influência dos diferentes *scaffolds* nos níveis plasmáticos de GSH. Após 3 dias da implantação subcutânea dorsal dos *scaffolds*, os grupos 1MET, 2MET, 1CIPRO, 2CIPRO mostraram um aumento dos níveis plasmáticos de GSH, quando comparados aos grupos SHAM e PDS. Após 30 dias, todos os grupos mostraram um aumento dos níveis plasmáticos de GSH quando comparados ao dia experimental 3.

ANOVA de duas vias revelou uma significativa influência dos diferentes *scaffolds* nos níveis plasmáticos de VIT C. Após 3 dias da implantação subcutânea dorsal dos *scaffolds*, houve um aumento dos níveis plasmáticos de VIT C nos grupos 1MET, 2MET, 1CIPRO, 2CIPRO, quando comparados aos grupos SHAM e PDS. Após 30 dias, apenas os grupos SHAM, PDS e 2CIPRO mostram maiores níveis plasmáticos de VIT C quando comparados ao dia experimental 3.

Figura 14 - Perfil oxidativo plasmático dos animais em 3 e 30 dias em cada grupo experimental após o implante subcutâneo dorsal dos diferentes *scaffolds*



(A) Níveis de ER plasmáticos de todos os grupos em 3 e 30 dias; (B) Níveis de peroxidação lipídica plasmático de todos os grupos em 3 e 30 dias; (C) Níveis de GSH plasmáticos de todos os grupos em 3 e 30 dias; (D) Níveis de Vitamina C plasmáticos de todos os grupos em 3 e 30 dias. (a-c) Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas intergrupos no mesmo período experimental. ($p < 0,05$). *Indica diferença estatística em 30 dias quando comparado a 3 dias ($p < 0,05$).

5 DISCUSSÃO

Electrospinning é uma técnica amplamente utilizada para sintetizar *scaffold* de polímeros sintéticos ou naturais, usados nos sistemas de liberação de fármacos (BOTTINO et al., 2011; 2012; GUPTA; MA, 2012; KENAWY et al., 2002). Neste contexto, recentes estudos acerca de *scaffold* contendo antibióticos têm demonstrado uma liberação controlada desses fármacos, culminando na redução e/ou controle da infecção (KIM et al., 2004; RUCKH et al., 2012). Neste estudo, avaliou-se, pela primeira vez, a biocompatibilidade de um sistema de liberação de fármacos utilizando *scaffolds* nanofibrosos de PDS contendo os antimicrobianos Metronidazol ou Ciprofloxacina sintetizados pela técnica *eletrospinning*, utilizando um modelo de implantação subcutânea dorsal em ratos. O estudo da biocompatibilidade deve ser baseado em diferentes critérios, uma vez que essa não é definida somente pela interação do material e um tipo celular, mas através de diversos eventos que podem interferir na resposta do hospedeiro (KOHANE; LANGER 2010). Devido a isso, neste estudo, para a avaliação da biocompatibilidade dos *scaffolds* contendo os diferentes antimicrobianos, foram utilizados parâmetros de inflamação local e de estresse oxidativo sistêmico.

Os resultados do presente estudos demonstraram que o procedimento cirúrgico (incisão) na região dorsal dos ratos foi bem-sucedido, como observado pela inflamação local leve, a qual foi relacionada aos baixos níveis de espécies reativas e peroxidação lipídica sistêmica apresentados pelo grupo SHAM, que não teve nenhum *scaffold* implantado. Do mesmo modo, a implantação dorsal subcutânea de uma unidade de *scaffold* sem antimicrobianos também foi bem conduzida uma vez que uma inflamação leve maioria das áreas analisadas foi observada no grupo PDS, similar ao grupo SHAM. Gallapudi e colaboradores (2014) demonstraram que nanofibras de Polidioxanona implantadas em ratos não provocaram nenhum efeito adverso inflamatório tecidual significativo, comprovando a biocompatibilidade do material, o que está de acordo com nossos achados. No que se refere ao estresse oxidativo sistêmico, a implantação subcutânea de um *scaffold* sem antibiótico induziu uma maior liberação de espécies reativas, culminando em maiores níveis plasmáticos de peroxidação lipídica no grupo PDS quando comparado ao grupo SHAM, no dia experimental 3. Este achado pode estar relacionado a presença do biomaterial na região subcutânea, o qual pode ter induzido o recrutamento de células leucocitárias e

produtos da degradação do biomaterial e a subsequente geração espécies reativas, o que está de acordo com estudos prévios (ANDERSON, 2001; CHANG et al., 2005, TSARYK et al., 2013).

Recentemente, tem sido demonstrado o papel do estresse oxidativo no processo inflamatório, na cicatrização e na fibrose tecidual, os quais são eventos críticos após a implantação de biomateriais (MOUTHUY et al., 2016). De particular importância, as espécies reativas modulam os processos de inflamação e cicatrização, uma vez que orquestram o recrutamento e a função dos leucócitos e macrófagos (NIETHAMMER et al., 2009; WATTAMWAR; DZIUBLA, 2012). Além disso, a implantação de biomateriais pode estimular a formação de oxidantes, tanto pelo constante ataque oxidativo induzido pelas células imunes, como pelos seus produtos de degradação (CHANG et al., 2005, TSARYK et al., 2013), como observado aqui pelos níveis plasmáticos de MDA plasmáticos, produto finais de peroxidação lipídica, na avaliação do terceiro dia no grupo PDS. Ainda que o grupo PDS tenha mostrado maiores níveis plasmáticos de espécies reativas e de peroxidação lipídica comparado ao grupo SHAM na avaliação do terceiro dia, níveis baixos ou moderados de oxidantes podem induzir alterações nas vias de sinalização intracelulares em resposta a alterações das condições extra e intracelulares, mantendo a função fisiológica da célula (REUTER et al., 2010). Quando a cicatrização de feridas envolve biomateriais, esses oxidantes podem orquestrar as diferentes fases da inflamação, o que leva à integração bem-sucedida do *scaffold* (MOUTHUY et al., 2016), tal qual demonstrado no grupo PDS. Quando a exposição ao agente oxidante é excessiva ou prolongada, pode levar à uma inflamação crônica e à perda da biocompatibilidade e da função do biomaterial (LIN et al., 2014). Neste contexto, a biocompatibilidade do biomaterial requer um equilíbrio entre a produção e a eliminação de oxidantes (MOUNTHUY et al., 2016).

Todos os organismos possuem um complexo sistema antioxidante de defesa que contrabalança os oxidantes endógenos e exógenos aos quais o corpo está constantemente exposto. Esse pode ser endógeno ou ser obtido por via exógena, e inclui enzimas como a CAT, a SOD e a GPx, entre outras; e pequenas moléculas solúveis em água, como a VIT C e a GSH. A GSH é uma das moléculas menores mais ubíquas na defesa antioxidante e reage com os oxidantes através do seu resíduo de cisteína formando glutathiona oxidada. A VIT C (ácido ascórbico), por sua vez, protege os compartimentos aquosos celulares uma vez que é capaz de quelar radicais livres e formar um radical ascorbil, que é mais estável e apresenta pouco dano

oxidativo (AUGUSTYNIAK et al. 2010). Ademais, as moléculas oxidadas de VIT C são regeneradas pela GSH, que converte a VIT C de volta à sua forma ativa (ISMAIL et al., 2015). No presente estudo, a implantação subcutânea dorsal de um *scaffold* sem antimicrobianos (grupos PDS) foi relacionada a níveis plasmáticos de GSH e VIT C similares àqueles do grupo SHAM na avaliação do terceiro dia. Esses achados podem ser atribuídos ao não recrutamento do sistema de defesa antioxidante sistêmico após a implantação de um *scaffold* (grupo PDS). No entanto, após 30 dias, houve um aumento nos níveis desses antioxidantes não enzimáticos nos referidos grupos experimentais (SHAM e PDS), que permaneceram similares entre si e entre os demais grupos experimentais. O aumento nos níveis plasmáticos de GSH observados nos grupos SHAM e PDS no trigésimo dia experimental, comparados aos seus próprios níveis no terceiro dia, pode ser atribuído ao processo catalítico do sistema glutatona para a manutenção dos níveis adequados de GSH necessários para a proteção antioxidante, uma vez que representa, juntamente com o sangue, uma das primeiras defesas sistêmicas contra a peroxidação lipídica (AHMED et al., 2000).

Os *scaffolds* contendo antibióticos têm sido demonstrados como uma ferramenta promissora para o aperfeiçoamento das estratégias regenerativas, proporcionando um sistema de administração de fármacos em que os mesmos podem ser liberados de forma controlada, em doses eficazes e baixas, quando comparadas aos tratamentos convencionais (BOTTINO et al., 2013). Recentemente, *scaffolds* contendo antibióticos têm sido utilizados em estudos que avaliaram sua capacidade antimicrobiana e sua citocompatibilidade na regeneração endodôntica (BOTTINO et al., 2013) e periodontal (BOTTINO et al., 2011). No presente estudo, os *scaffold* contendo os antimicrobianos, exceto o grupo 1CIPRO, foram relacionados ao aumento dos níveis plasmáticos de peroxidação lipídica após 3 dias de implantação subcutânea quando comparados ao grupo SHAM. Interessantemente, o grupo 1CIPRO mostrou níveis plasmáticos de peroxidação lipídica similares ao grupo SHAM na mesma avaliação. Esses resultados podem estar relacionados a indução do sistema antioxidante de defesa comprovado pelo aumento dos níveis plasmáticos de GSH e VIT C observados em todos os grupos que tiveram um ou dois *scaffolds* implantados com Metronidazol ou Ciprofloxacina, independente do antibiótico empregado, comparados aos grupos SHAM e PDS.

Na avaliação do terceiro dia após a implantação dos *scaffolds*, no que se refere a resposta inflamatória, essa foi mais intensa nos grupos em que foram implantadas

duas unidades de *scaffold* em comparação aos grupos SHAM e PDS, bem como aos grupos experimentais contendo apenas um *scaffold* (1CIPRO e 1MET). A maior resposta inflamatória exibida pelos grupos 2MET e 2CIPRO pode estar relacionada aos dois acessos cirúrgicos realizados na região dorsal destes animais durante o procedimento de implantação, conforme demonstrado em estudos anteriores (ANDERSON, 2001; ANDERSON; RODRIGUEZ; CHAN, 2008). Ao comparar os grupos que tiveram dois *scaffolds* contendo antibióticos implantados, o grupo 2MET mostrou mais campos histológicos com células inflamatórias. Este achado pode estar relacionado com uma maior liberação de Metronidazol após 48h da implantação do biomaterial, tal como demonstrado no estudo *in vitro* (BOTTINO et al., 2013), em que dois *scaffolds* contendo Metronidazol foram capazes de libertar 44% da droga em comparação aos *scaffolds* contendo Ciprofloxacina, que liberaram 27,52%. Ademais, a alta concentração de fármacos liberados pela presença de dois *scaffolds* aliada à sua rápida liberação inicial podem gerar uma toxicidade tecidual aguda (BERGERON, 1986), o que está de acordo com nossos achados. Então, os fármacos devem ser liberados de forma gradual e homogênea, evitando efeitos deletérios aos tecidos, uma vez que uma liberação inicial rápida pode levar a um efeito tóxico tecidual agudo (TESFAMARIAM, 2008; KOHANE; LANGER, 2010).

Após trinta dias de implantação dos *scaffolds*, o recrutamento do sistema antioxidante de defesa pela presença do *scaffold* na região subcutânea e, conseqüente peroxidação lipídica, ficou evidente uma vez que os níveis plasmáticos de GSH e VIT C diminuíram na avaliação do trigésimo dia, igualando-se aos níveis dos grupos SHAM e PDS. Os níveis plasmáticos de peroxidação lipídica exibidos por todos os grupos que tiveram *scaffolds* implantados subcutâneamente foram similares entre si e ao grupo PDS após 30 dias do procedimento cirúrgico. Esse resultado comprova a ação protetora do sistema antioxidante plasmático, que evitou a ação oxidante das espécies reativas sobre os lipídios celulares, uma vez que os níveis de espécies reativas ainda permaneceram maiores em todos os grupos com *scaffolds* implantados quando comparados ao grupo SHAM na avaliação do trigésimo dia. Em relação a resposta inflamatória, nesse mesmo período, pode-se observar uma diminuição significativa do infiltrado inflamatório em todos os grupos experimentais. Além disso, pode-se notar a presença de tecido fibroso, proliferação de vasos sanguíneos e a formação de células gigantes multinucleadas em todos os grupos em que o biomaterial foi implantado. Estes eventos são característicos da reação de corpo

estranho, que é identificada pela presença de células gigantes multinucleadas e componentes do tecido de granulação (macrófagos, fibroblastos e vasos sanguíneos). Essa reação ocorre principalmente em materiais com superfícies porosas, como os *scaffolds*, e é considerada um dos processos para a cicatrização de tecidos (ANDERSON; RODRIGUEZ; CHAN, 2008) e que também demonstram a biocompatibilidade do biomaterial aqui investigado.

Em resumo, os dados histológicos mostraram que os *scaffolds* de PDS contendo os antimicrobianos não induziram inflamações severas após trinta dias de avaliação. Além disso, nenhum dano oxidativo aos lipídios foram observados após a implantação subcutânea dorsal dos *scaffolds* de PDS contendo Metronidazol ou Ciprofloxacina a longo prazo. Ainda, esses biomateriais puderam incitar mecanismos antioxidantes de defesa, então evitando o dano oxidativo que pode ser gerado pelas espécies reativas induzidas pela implantação do biomaterial. Baseado nos achados preliminares do presente estudo, pesquisas adicionais são necessárias para confirmar as relações descritas aqui, a fim de ampliar o conhecimento acerca da biocompatibilidade dos *scaffolds*, especialmente quando contiverem antibióticos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, a biocompatibilidade de *scaffolds* de PDS contendo os antibióticos Metronidazol ou Ciprofloxacina foi avaliada em um modelo animal de implantação subcutânea dorsal. Porém, apesar desse modelo apresentar vantagens devido ao tecido subcutâneo de ratos apresentar semelhanças ao dos humanos, ainda se faz necessário estudos clínicos para sua utilização na clínica diária. No que se refere as etapas da pesquisa, foram preconizados a exatidão metodológica, a fim de controlar os possíveis vieses que comprometessem os resultados do presente estudo.

Com base nos parâmetros histológicos e de estresse oxidativo sistêmico encontrados nesse estudo, sugere-se que os *scaffolds* contendo os antibióticos Metronidazol ou Ciprofloxacina apresentaram biocompatibilidade. Ainda, a quantidade de *scaffolds* implantados, bem como a concentração dos fármacos incorporados na sua estrutura, parece induzir respostas inflamatórias e bioquímicas agudas observados após três dias da implantação, as quais tiveram sua intensidade reduzida, atingindo os níveis do grupo controle (SHAM) na avaliação do trigésimo dia.

Dessa forma, a partir dos resultados desse estudo, concomitantemente aos achados do estudo *in vitro* realizado anteriormente, os *scaffolds* de PDS contendo os antibióticos de Metronidazol ou Ciprofloxacina podem ser utilizados, futuramente, como sistemas de liberação de fármacos. Como perspectivas, estudos sobre a degradação e eficácia desse sistema de liberação de fármacos frente a bactérias patogênicas em testes *in vivo* devem ser realizados a fim de complementar os dados obtidos dessa pesquisa.

REFERÊNCIAS

ADJEI, I.M.; PLUMTON, G.; SHARMA, B. Oxidative Stress and Biomaterials: The Inflammatory Link. **Oxidative Stress and Biomaterials**. 2016.

AMES, B.N.; SHIGENAGA, M.K.; HEGEN, T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. **Proceedings of the National Academic of Science USA**. v. 90, p.7915-7922, 1993.

AMINOV, R.I. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. **Environmental Microbiology**. v.11, p.2970–2988, 2009.

AN, Y.H.; WOOLF, S.K.; FRIEDMAN, R.J. Pre-clinical in vivo evaluation of orthopaedic bioabsorbable devices. **Biomaterials**. V.2, n.24, p.2635–52. 2000.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research** v. 350, n.1, p.103-108, 1996.

ANDERSON, J.M. Biological responses to materials. **Annual Review Material Research**. v.31, p.81–110, 2001.

ANDERSON, J.M.; RODRIQUEZ, A.; CHANG, D.T. Foreign body reaction to biomaterials. **Seminars in Immunology**. v.20, n.2, p.86-100, 2008.

ANDERSON, J.M.; MACNALLY, A.K. Biocompatibility of implants: lymphocyte/macrophage interactions. **Seminars in Immunology**. v. 33, p. 221-233, 2011.

AUGUSTYNIAK, A. et al. Natural and synthetic antioxidants: An updated overview. **Free Radical Research**. v.44, 2010.

BAJAJ, P. et al. 3D Biofabrication Strategies for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. **Annual Review Biomedical Engineering**. n.11, v.16, p.247–276, Jul. 2014.

BAJPAI, A. K.; SHUKLA, S. K.; BHANU, S.; KANKANE, S., Responsive polymers in controlled drug delivery. **Progress in Polymer Science**, n.33, v.11, p.1088-1118, 2008.

BAOLIN, G.; PETER, X. MA. Synthetic biodegradable functional polymers for tissue engineering: a brief review. **Science China Chemical**. v.57, n.4, p.490-500, Abr. 2014.

BATISTA, R.F. et al. Microscopic analysis of subcutaneous reactions to endodontic sealer implants in rats. **Journal of Biomedical Material Research A**. v.81, p. 171–177, 2007.

BAUMANN, H; GAULDIE, J. The acute phase response. **Immunology Today**. v.15, p. 74–80, 1994.

- BAVARIYA, A.J. et al. Evaluation of biocompatibility and degradation of chitosan nanofiber membrane crosslinked with genipin. **Society for biomaterials**. p. 1-9, Nov. 2013.
- BEHAR-COHEN, F. Systèmes de délivrance des médicaments pour le segment antérieur: bases fondamentales et applications cliniques. **Journal Français d'Ophtalmologie** v.25, n. 5, Abr. 2002.
- BEZWADA, R.S. et al. Monocryl suture, a new ultra pliable absorbable monofilament suture. **Biomaterials**. n.16, p.1141-8. Out. 1995.
- BERGERON, M.G. Tissue Penetration of antibiotics. **Clinical Biochem**. V.19, p.90-100, 1986.
- BIACHI, A. Free radicals and the main dietary antioxidants. **Revista de Nutrição**. v.12, n.2, p.123-130, mai./ago. 1999.
- BOLAND, E.D. Electrospinning polydioxanone for biomedical applications. **Acta Biomaterialia**. P.115–123, 2005.
- BOSSU, M. et al. Today Prospects for Tissue Engineering Therapeutic Approach in Dentistry. **Scientific World Journal**. p. 151.252, 2014.
- BOTTINO, M.C. et al Recent advances in the development of GTR/GBR membranes for periodontal regeneration—A materials perspective. **Dental Materials** v. 28, p. 703-721, 2012.
- BOTTINO, M.C. et al. Bioactive Nanofibrous *Scaffold* for Regenerative Endodontics. **Journal Dental Research**. v.92, n. 11, p.963-969, 2013.
- BOTTINO, M.C, et al. Biodegradable nanofibrous drug delivery systems: Effects of metronidazole and ciprofloxacin on periodontopathogens and commensal oral bacteria. **Clinical Oral Investigations**. v.18, n.9, p.2151–2158, 2014.
- BOUDRIOT, U. et al. Electrospinning approaches toward scaffold engineering – a brief overview. **Artificial Organs**. n.30, p-785-92, 2006.
- BRIGANTI, S.; CAMERA, R.; PICARDO, P. Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. **Pigment Cell Res**. v.16, n.2, p.101-10, 2003
- BROWN, B.N. et al. Macrophage phenotype and remodeling outcomes in response to biologic *scaffold* with and without a cellular component. **Biomaterials**, v.30, n.8, p. 1482, 2009.
- CADET, J.L.; KAHLER, L.A. Free radical mechanisms in schizophrenia and tardive dyskinesia. **Neurosci. Biobehav. Rev**. v.18. p. 457–6, 1994.

CALIXTO, R.F.E. **Implante de um floculado de resina derivada do óleo de mamona (*Ricinus Communis*) em alvéolo de rato imediatamente após a extração dental. Avaliação histológica e histométrica da biocompatibilidade e da cronologia de reparo ósseo.** Dissertação (Mestre em Reabilitação Oral) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, 2001.

CARRANZA, F.A. et al. **Periodontia clínica.** 10. ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2007.

CASSELL, G. H.; MEKALANOS, J. Development of antimicrobial agents in the era of new and reemerging infectious diseases and increasing antibiotic resistance. **Journal of the American Medical Association**, v. 285, n. 5, p. 601–605, fev. 2001.

CHANG, H.H. et al. Stimulation of glutathione depletion, ROS production and cell cycle arrest of dental pulp cells and gingival epithelial cells by HEMA. **Biomaterials** v.26 n.7, p.745-753, 2005.

CHATURVEDI, T.P. et al. Evaluation of metronidazole nanofibers in patients with chronic periodontitis: A clinical study. **International Journal Pharmacology Investigations**. v.2, n.4, p.213-217, Out. 2012.

CHIU, J.B. et al. Electrospun Nanofibrous *Scaffold* for Biomedical Applications. **Journal Biomedical Nanotechnology**, v.1, p.115, 2005.

CHUNG, H.J.; PARK, T.G. Surface engineered and drug releasing pre-fabricated *scaffold* for tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.59, p.249–59, 2007.

COIMBRA, P. M. A. **Preparação e Caracterização de Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos com base em Polímeros de Origem Natural.** Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal, 2010.

COLLINS, T. Inflamação aguda e crônica. In: Robbins. **Patologia estrutural e funcional.** 6 ed. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan, p. 45-78, 2000.

CONNER, E.M, GRISHAM, M.B. Inflammation, free radicals, and antioxidants. **Nutrition** v.12, p.274-7, 1996.

COTRAN R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia estrutural e funcional.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p1251, 2000

DAAR, A.S. The Future of Replacement and Restorative Therapies: From Organ Transplantation to Regenerative Medicine. **Transplantation Proceedings**, v.45. 3450-3452, 2013

DALLE-DONNE, I. et al. Biomarkers of oxidative damage in human disease. **Clinical. Chemical.** n.52, p.601–623, 2006.

DAN LI, Y.X. Electrospinning of nanofibers: reinventing the wheel?. **Advanced materials**. n.16, p. 1151-70, 2004.

DOMB, A.J.; KOST, J.; WISEMAN, D. **Handbook of biodegradable polymers**. ed. CRC Press. p.544, 1998.

DEVASAGAYAM, T. P., et al. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. **Journal of Association of Physicians of India**, n.52, p. 794-.804, 2004

DHALLA, N. S.; TEMSAH, R. M., NETTICADAN, T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. **Journal Hypertens.**, n.18, p.655–673, 2000.

DONARUMA, L.G **Definitions in biomaterials**, in: D.F. Williams (Ed.), J. Polym. Sci.: Polym. Lett. ed. 26, Elsevier, Amsterdam. p. 414–422, 1987.

DUQUE, L. M.; RODRIGUEZ, L.; LÓPEZ, M. Electrospinning: la era de las nanofibras. **Revista Polímeros**, v.14, n.1, p. 10-27, out. 2014.

EL ASSAR, M.; ANGULO, J.; RODRÍGUEZ-MAÑAS, L. Oxidative stress and vascular inflammation in aging. **Free Radical Biology Medicine**. n. 65 p.380-401 Dez. 2013.

FELICE, B. et al. Drug delivery vehicles on a nano-engineering perspective. **Material Science Engineering**. v.41, p.178–195, Ago. 2014.

FIALHO, S.L; CUNHA, A.S. Sistemas de transporte de drogas para o segmento posterior do olho: bases fundamentais e aplicações. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**. São Paulo v. 70, n. 1, p. 173-179, Fev. 2007.

FOURNIER, E. et al. Biocompatibility of implantable synthetic polymeric drug carriers: focus on brain biocompatibility. **Biomaterials**. v.24, n.19, p.3311–3331, 2003.

FOSSUM, T.W. **Cirurgia de pequenos animais**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

GALLEY, H.; DAVIES, M.J.; WEBSTER, N.R. Ascorbil radical formation in patients with sepsis: effects of ascorbate loading. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, p. 139-43, 1996.

GARG, T. et al. Scaffold: a novel carrier for cell and drug delivery. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier System**. v.29, n.1, p.1-63, 2012.

GOLLAPUDI, S. et al. Safety and Efficacy of Polydioxanone Nano-Fibers as Anti-Inflammatory Agents. **J Nanomedicine Biotherapeutic Discov**, 2014.

GOONOO, N. et al. Polydioxanone-based bio-materials for tissue engineering and drug/gene delivery applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** v. 97, p. 371–391, 2015.

GRETZER, C. et al. The inflammatory cell influx and cytokines changes during transition from acute inflammation to fibrous repair around implanted materials. **J Biomater Sci Polym** Ed v.17 n.6 p.669–87, 2006.

GUPTA, M.J.; MA, P.X. Nanofibrous *Scaffold* for Dental and Craniofacial Applications. **J Dent Res**. V.91, n.3, p-227-334, 2012.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymology** p.1-85, 1990.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. **Am. J. Med.** v.91, p. 14–22, 1991.

HALLIWELL, B. Oxidative Stress, nutrition and health: experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. **Free radical research** v.25, n.1, p. 57-74, 1996.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.C.M. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3. ed. Oxford University Press, 1999.

HEALING, W. Cicatrização de feridas. **ABCD, arq. bras. cir. dig.** v.20 n.1. 2007.

HEDRICH, H.J. History, strains and models. In: Kringe G.J. **The laboratory rat**. San Diego: Academic Press, p. 3-16, 2000.

HOFFMAN, A.S. The origins and evolution of “controlled” drug delivery systems. **Journal of Controlled Release** v.132, p. 153–163, Dez. 2008.

HUANG, Z.M, et al. A Review on Polymer Nanofibers by Electrospinning and Their Applications in Nanocomposites. **Composites Science and Technology**. v.63, p.2223, 2003.

HUANG, D.B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemical**.; v.53, n.6, p 1841-56, 2005.

HUTMACHER, D.W, Scaffold design and fabrication Technologies for engineering tissues – state of art and futures perspectives. **Journal Biomaterials Science Polymer**. v.12, n1 p. 107-24, 2001.

HYE-LIN, H. et al. Oxidative stress and antioxidants in hepatic pathogenesis. **World Journal Gastroenterology**. v.16, n.48, p.6035–6043, Dez. 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **NIE-DIMCI-033**: Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ). Rio de Janeiro, 2012.

IKADA, Y. Challenges in tissue engineering. **Journal of the Royal Society Interface**. v.3, p.589–601, Abr. 2006.

JACQUES-SILVA, M.C. et al. Diphenyldisselenides and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in brain of mice. **Pharmacology Toxicology**, v. 44, p. 119-25, 2001.

JAVALI, M.A.; VANDANA, K.L. A comparative evaluation of atrigel delivery system (10% doxycycline hyclate) Atridox with scaling and root planing and combination therapy in treatment of periodontitis: A clinical study. **Journal Indian Society Periodontology**. n.16, p. 43–8, 2012.

JOHNSTON, R.B. Current concepts: immunology. Monocytes and macrophages. **The New England Journal of Medicine**. v. 318, n.12, p. 747–752, 1988.

KHASHABA, R.M. et al. The response of subcutaneous connective tissue to newly developed calcium phosphate-based root canal sealers. **International Endodontics Journal**.; v.44, n.4, p.342–52, 2011.

KANNAN, R.Y. et al. Artificial nerve conduits in peripheral-nerve repair. **Biotechnology Applied Biochemistry**. v.41, p.193–200, 2005.

KENAWY, E.R. et al. Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly (ethylene-co-vinylacetate), poly(lactic acid), and a blend. **Journal of Controlled Release**. v. 81, p. 57–64, 2002.

KIDO, H.W. **Biocompatibilidade da vitrocerâmica bioativa (Biosilicato®): análise *in vitro* e *in vivo***. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2011.

KOHANE, D.S.; LANGER, R. Biocompatibility and drug delivery systems, **Chemical Science**. p. 441–446, 2010.

KRICHELDORF, H.R.; DAMRAU, D. POLYLACTONES 42: Zn L-lactatecatalyzed polymerizations of 1,4-dioxan-2-one. **Macromol Chem Phys**; v.199, p.1089–98, 1998.

KUMAR, V. et al. **Robbins - Patologia básica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

LANGER, R.; VACANTI, J.P. Tissue engineering. **Science**. v. 6, p. 260-920, 1993.

LAKSHMI S.N; LAURENCIN, C. Biodegradable polymers as biomaterials. v.32, n.8, p. 762-798, Ago. /Set. 2007.

LE, X. Engineering a biocompatible scaffold with either micrometre or nanometre scale surface topography for promoting protein adsorption and cellular response. **International Journal of Biomaterials**, 2013.

LI, W. et al. Electrospun Nanofibrous Structure a Novel Scaffold for Tissue Engineering, **Journal Biomedical Material Research** v.60, p.613, 2002.

LIM, S.H.; MAO, H.Q. Electrospun scaffold for stem cell engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 61, n.12, p. 1084-96, Out. 2009.

LOWRY, O.H. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** p.193: 265, 1951

T.H. Lin, et al., Chronic inflammation in biomaterial-induced periprosthetic osteolysis: NF-kappaB as a therapeutic target. **Acta Biomater.** V.10, n.1, p.1-10, 2014.

LIU, C.; XIA, Z.; CZERNUSZKA, J.T. Design and development of three-dimensional *scaffold* for tissue engineering. **Chemical Engineering Research & Design.** v.85 p.1051-1064, Jun .2007.

MASTRONTONIO, S.S. **Avaliação da biocompatibilidade de materiais para remoção química da lesão de cárie: análise histológica em tecido conjuntivo de camundongos.** 2007. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, 2007.

MENDONÇA, J.R.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **An. Bras. Dermatol.** V.84 n.3, 2009.

MORO, J.S. et al. Perspectivas da engenharia tecidual na odontologia – revisão de literatura. **RGO.** 2017

MOURA, C. C. G., et al. A Study on Biocompatibility of Three Endodontic Sealers: Intensity and Duration of Tissue Irritation. **Iranian Endodontic Journal.** Spring; n.9, v.2, p. 137–143 Mar. 2014.

MOUTHUY, P.A. Biocompatibility of implantable materials: An oxidative stress viewpoint. **Biomaterials** v.109 p. 55-68, 2016.

MURBACH, H.D, et al. Ciprofloxacin Release Using Natural Rubber Latex Membranes as Carrier. **International Journal of Biomaterials.** p.157-952. 2014.

NADERI, H.; MATIN, M.M.; BAHRAMI, A.R. Review paper: critical issues in tissue engineering: biomaterials, cell sources, angiogenesis, and drug delivery systems. **Journal of Applied Biomaterials.** n.4, v.26, p.383-417, nov. 2011.

NEEL, E.A.A., et al. Tissue engineering in dentistry. **Journal of dentistry.** v.42, p. 915-928. 2014.

NIE, H; WANG, C.H. Fabrication and Characterization of PLGA/HAp Composite *Scaffold* for Delivery of BMP–2 Plasmid DNA. **Journal Controlled Release.** v.120, p.111, 2007.

NIETHAMMER, P. et al. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish, **Nature** n.459, v.7249, p.996-999, 2009.

O'BRIEN, F. Biomaterials & *scaffold* for tissue engineering. **Materials today.** v.14, n.3, p. 88-95, Mar. 2011.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.

ONDEI L.S et al. Avaliação de fatores preditivos de estresse oxidativo em pessoas saudáveis. **Biotemas**. v.27, n.3, p.167-173, set. 2014.

ONUKEI, Y. et al. A Review of the Biocompatibility of Implantable Devices: Current Challenges to Overcome Foreign Body Response. **Journal of Diabetes Science and Technology**. v.2, n.6, nov. 2008.

ØRSTAVIK, D.; MJOR, I.A. Histopathology and x-ray microanalysis of the subcutaneous tissue response to endodontic sealers. **Journal Endodontic**. n.14, p.13–23. 1988.

PARWE, S.P. et al Synthesis of ciprofloxacin-conjugated poly (L-lactic acid) polymer for nanofiber fabrication and antibacterial evaluation. **International of Journal of Nanomedicine**. v.9, p.1463-1477. 2014.

PINCEMAIL J. Free radicals and antioxidants in human disease. In Favier, AE Cadet, J Kalyanaraman B Fontecave M, Pierre JL (editors). **Analyses of Free Radicals in Biology Systems**. Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag. 1995.

PETER, S.J. et al. Polymer concepts in tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research (Appl. Biomater.)** v.43, p.422–427. 1998.

PRABHAKARAN, M. et al. Electro spraying technique for the fabrication of metronidazole contained PLGA particles and their release profile. **Materials Science and Engineering**. v.56, p.66–73. 2015.

PRYOR, W.A. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. **Annu Rev Physiol**. v.48, p.657–667, 1986.

RAI, R. et al. Tissue Engineering: Step Ahead in Maxillofacial Reconstruction. **Journal International Oral Health**. v.9, n.7, p.138-42. Set. 2015.

RATNER, B.D. Reducing capsular thickness and enhancing angiogenesis around implant drug release systems. **Journal Controlled Release** v.78, p.211–218. 2002.

RAY J.A. et al. Polydioxanone (PDS), a novel monofilament synthetic absorbable suture. **Surgery, Gynecology & Obstetric**. p.497–507, 1981.

REISEA, M. et al. Release of metronidazole from electrospun poly(l-lactide-co-d/l-lactide) fibers for local periodontitis treatment. **Dental Materials** v.28, p. 179-188. 2012.

REUTER, S. et al., Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radic. Biol. Med**. v.49, v.11, p.1603-1616, 2010.

ROSE, L.R. et al. Periodontia- medicina, cirurgia e implantes. **Editores Santos**. 2007.

- RUCKH, T.T. et al. Antimicrobial effects of nanofiber poly(caprolactone) tissue scaffold releasing rifampicin. **J Mater Sci Mater Med**. v.23, n.6, p.1411-1420, 2012.
- SABINA, M.A; MÜLLER A. Heterogeneous nucleation and self-nucleation of poly(p-dioxanone). **Journal of Materials Science** v.35, n.20, p. 5071-84. Out. 2000
- SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Oxygen free radicals and exercise: mechanisms of synthesis and adaptation to the physical training. **Rev Bras Med Esporte**. v.10, n. 4, 2004
- SEHNEM, D.P. Alternative methods for assessment of cytotoxicity of biomaterials. **Revista rede de cuidados da saúde**. v. 6, n.2, 2012.
- SIES, H. Oxidative stress. **Academic Press**. London. p. 1–507, 1985.
- SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**, v.215, n.2, p.213- 219, 1993.
- SILL, T.J; RECUM, H.A. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. **Biomaterials**. v.29 p.1989-2006, 2008.
- SILVA, G.R., et. al. In vitro and in vivo ocular biocompatibility of electrospun poly(ε-caprolactone) nanofibers. **Europe Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.73, p.9–19, 2015.
- SILVEIRA, E.M. **Mecanismos envolvidos na resposta imune e inflamatória frente à implantação de membrana cortical óssea bovina no tecido subcutâneo de camundongos: caracterização histomorfométricas, imunoenzimática e molecular**. 2012. Tese (Doutorado em Estomatologia e Biologia Oral) - Universidade de São Paulo, Bauru, SP, 2012.
- SILVEIRA, G. P. et al. Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. **Química Nova [online]**. v.29, n.4, p. 844-855, 2006.
- SIMONIAN, N.A; COYLE, J.T. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. v.36:p.83-106. 1996
- SLATER, T.F. Free radical mechanisms in tissue injury. **Biochemical Journal**. v.222, p.1-15, 1984.
- TESFAMARIAM, B. Drug Release Kinetics From Stent Device-Based Delivery Systems. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. v. 51, n. 2, p 118-125, Nov. 2008.
- TSARYK, R. et al., The role of oxidative stress in the response of endothelial cells to metals, in: I. Antoniac (Ed.), *Biologically Responsive Biomaterials for Tissue Engineering*, Springer, p.65-88 2013.

UCHEGBU, I., Introduction. In *Polymers in drug delivery*, Uchegbu, I.; Schatzlein, A., Eds. Taylor & Francis: Boca Raton, 2006.

VALKON, M., et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international Journal of Biochemistry and cell biology**. v. 39, p 44-84, 2007.

VASCONCELOS, S.M.L. et al. Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and markers of oxidative damage in human blood: main analytical methods for their determination. **Quím. Nova**. v.30, n.5, 2007.

VAN GINKEL, G.; SEVANIAN, A. Lipid peroxidation-induced membrane structural alterations. **Methodos Enzymol**. V.233, p.273-288, 1994.

VERT, M. et al. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. v.3, n.6, p.432-446, nov. 1992.

WATTAMWAR, P.P.; DZIUBLA, T.D.; Modulation of the wound healing response through oxidation active materials, IN: K.S. BHATIA (ED.), **Engineering Biomaterials For Regenerative Medicine: Novel Technologies For Clinic Applications**, Springer. p. 161-192, 2012.

WHITE, M. Mediators of inflammation and the inflammatory process. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v.103, n.3., p.378-381, 1999.

WILLIAMS, D.F On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials** v.29, p.2941–2953, 2008.

YAN, L.Y.; TRABER, M.G.; PACKER, L. Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxydatively modifiedapolipoprotein B of human low-density lipoproteins. **Analytical Biochemistry**, v. 228, p. 349-351, 1995.

YIH, T.C; AL-FANDI, M. Engineered Nanoparticles as Precise Drug Delivery Systems. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.97, p.1184, 2006.

XIE, J; WANG, C.H. Electrospun Micro– and Nanofibers for Sustained Delivery of Paclitaxel to Treat C6 Glioma in Vitro. **Pharmaceutical Research**, v.23, p.1817, 2006.

XUE, J. et al. Preparation and in vivo efficient anti-infection property of GTR/GBR implant made by metronidazole loaded electrospun polycaprolactone nanofiber membrane. **International Journal of Pharmaceutics**. n.475, p.566–577, 2014.

ZAKY, S.H.; CANCEDDA, R. Engineering Craniofacial Structures: Facing the Challenge. **J Dent Res**. v.88, n.12, p.1077-1091, 2009

ZHU, N.; CHEN, X. Biofabrication of Tissue *Scaffold*. **Intech** Mar. 2013.

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Comissão de Ética no Uso de Animais

da
Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação in vivo da biocompatibilidade e degradação de scaffolds nanofibrados contendo metronidazol e ciprofloxacina em modelo de implantação subcutânea em ratos.", protocolado sob o CEUA nº 4141250315, sob a responsabilidade de Karla Zanini Kanforski e equipe; Patrícia Cabral Passos; Cristiane Cademartori Danesi; Roberto Marinho Maciel - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) em reunião de 19/05/2015.

We certify that the proposal "in vivo biocompatibility evaluation and scaffolds nanofibrados degradation containing metronidazole and ciprofloxacin model of subcutaneous implantation in rats.", utilizing 52 Heterogenic rats (52 males), protocol number CEUA 4141250315, under the responsibility of Karla Zanini Kanforski and team; Patrícia Cabral Passos; Cristiane Cademartori Danesi; Roberto Marinho Maciel - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - It's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was approved by the Federal University of Santa Maria in the meeting of 05/19/2015.

Vigência da Proposta: de 04/2014 a 06/2015
Periodontia

Laboratório: Departamento De Estomatologia Disciplina De

Procedência: Biotério Central UFSM

Espécie: Ratos heterogêneos

Gênero: Machos

Idade: 2 meses N: 52

Linhagem: stock Wistar

Peso: 250-300g

Nota: A periodontite é uma doença infecto inflamatória que afeta os tecidos periodontais de suporte, resultando na perda do elemento dentário. A doença periodontal tem como fator etiológico primário o biofilme bacteriano que estimula a resposta imune-inflamatória do hospedeiro. A alta prevalência e as sequelas da periodontite como defeitos ósseos e recessão gengival, tem levado ao estudo de técnicas para restabelecer os tecidos perdidos, através da regeneração de tecidos periodontais específicos como osso alveolar, cimento, ligamento periodontal e gengiva. Modalidades terapêuticas utilizando enxertos ósseos, materiais osteocondutores/indutores, fatores exógenos de crescimento, tecnologia baseada em células e genes estão sendo estudadas. Nesse contexto, a regeneração tecidual guiada (RTG) e a regeneração óssea guiada (ROG) está sendo considerada uma técnica promissora para a regeneração periodontal. A RTG/ROG consiste no uso de uma membrana como interface entre o tecido conjuntivo ou epitelial e ligamento osso alveolar. A membrana impede que o tecido conjuntivo e epitelial migre para o defeito, favorecendo que células progenitoras localizadas do ligamento remanescente e ou células sanguíneas recolonizem o local, para diferenciação em novo aparato periodontal. Porém, o sucesso dessas técnicas ainda é limitado, devido à ausência de uma membranascaffold ideal, ou seja, biocompatível, capaz de promover o reparo e regeneração tecidual, estável, com propriedades mecânicas e físicas adequadas e resistentes ao colapso. Assim, pesquisadores têm avançado no conhecimento de biomateriais combinados à alta tecnologia para o desenvolvimento de membranascaffold que possibilitem a engenharia de tecidos periodontais. Scaffolds sintetizados a partir de polímeros naturais (p. ex. colágeno, quitosana) e sintéticos (p. ex copolímero -PCL, monofilamentos de polidioxanona -PDO) com ou sem drogas terapêuticas, fatores de crescimento e ou partículas de fosfato de cálcio estão sendo estudados. A técnica do e-spinning tem demonstrado bom potencial para o processamento de membranas nanoparticuladas para regeneração periodontal, com promissoras propriedades mecânicas, biológicas e estruturais. Neste contexto, os scaffolds nanoparticulados de PDG contendo na sua composição antimicrobianos, metronidazol e ciprofloxacina, foram testados em um estudo in vitro por Botino e colaboradores (2013). Essas membranas obtiveram redução significativa (p

Santa Maria, 19 de maio de 2015