



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Manuela Broering Lebarbenchon

**AVALIAÇÃO DAS MEMBRANAS DE NANOCELULOSE  
BACTERIANA E MATRIZ DÉRMICA ACELULAR (SUREDERM<sup>®</sup>)  
COMO ARCABOUÇOS PARA ENGENHARIA TECIDUAL**

Florianópolis  
2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**AVALIAÇÃO DAS MEMBRANAS DE NANOCELULOSE  
BACTERIANA E MATRIZ DÉRMICA ACELULAR (SUREDERM<sup>®</sup>)  
COMO ARCABOUÇOS PARA ENGENHARIA TECIDUAL**

Trabalho de Conclusão de curso de  
Odontologia UFSC 2013/1, do Centro de  
Ciências da Saúde da Universidade Federal de  
Santa Catarina

**Aluna:** Manuela Broering Lebarbenchon

**Orientador:** Prof. Dr. César Augusto  
Magalhães Benfatti

Manuela Broering Lebarbenchon

**AVALIAÇÃO DAS MEMBRANAS DE NANOCELULOSE BACTERIANA E MATRIZ  
DÉRMICA ACELULAR (SUREDERM<sup>®</sup>) COMO ARCABOUÇOS PARA  
ENGENHARIA TECIDUAL**

Florianópolis, 20 de outubro de 2017

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. César Augusto Magalhães Benfatti  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr. Marco Aurélio Bianchini  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Cirurgião-Dentista, Abraão Moratelli Prado  
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho a minha família por ter sido essencial na conclusão do mesmo e por sempre me apoiarem em todo o meu crescimento pessoal e profissional dentro da graduação da Odontologia da UFSC. À vocês, todo meu amor.

## **Agradecimentos**

Frente à todas as inspirações terrenas, agradeço primeiramente à Deus que me permitiu a conclusão de tantos projetos e continua me guiando no caminho da verdade.

Aos meus queridos pais **Octávio Rene Lebarbenchon Neto** e **Marisa Broering Lebarbenchon** por me amarem incondicionalmente, me ajudarem independente das circunstâncias e me guiarem nas escolhas que realizo. Por sempre estarem me inspirando e me dando forças. Sou eternamente grata por tudo que vocês fizeram e continuam fazendo por mim.

Ao meu irmão **Victor Broering Lebarbenchon**, por ser meu amigo, companheiro e confidente e ter me ajudado tanto sempre que precisei. Obrigada por ser meu porto seguro e por me aconselhar em todos os âmbitos.

A minha avó **Dalva Abigail Lebarbenchon**, por me ajudar a crescer e me tornar sempre melhor tanto pessoal quanto profissionalmente.

Ao meu tio, padrinho e inspiração na carreira odontológica, **Ricardo Luiz Lebarbenchon** por todos os aprendizados e por ajudar a me conduzir nesta carreira maravilhosa.

Ao meu namorado e melhor amigo **Ricardo Pezzini Filho**, por estar presente em todos os momentos que precisei de seu apoio. Muito obrigada.

A minha amiga e dupla querida **Amanda Luíza de Almeida Santos** por me apoiar, ensinar e me dar todo o suporte necessário ao longo do curso. Sorte a minha ter tido a oportunidade de crescer pessoal e profissionalmente com seus ensinamentos e sua amizade.

A minha grande amiga **Michelle Estevam Vilpert** por ter sido minha conselheira e parceira durante a caminhada odontológica. Muito obrigada por todas palavras e gestos, foram muito especiais.

Ao meu orientador **César Augusto Magalhães Benfatti**, por me ajudar, me guiar e contribuir para o aprimoramento da pesquisa e por permitir a apresentação deste trabalho de grande importância a mim e à Odontologia.

Ao professor **Ricardo de Souza Magini**, por permitir o meu engajamento neste projeto que resultou de um Trabalho de Conclusão de Curso feito com muito cuidado e carinho. Sou eternamente grata.

Ao colega e cirurgião dentista **Abraão Moratelli Prado**, pelos ensinamentos incríveis dentro da área da pesquisa odontológica, pela disposição em me ajudar sempre que necessário e por se tornar uma inspiração na profissão. Obrigada por todo teu envolvimento com a pesquisa e tua ajuda que foi crucial.

Ao professor **Marco Aurélio Bianchini** por ter sempre me inspirado dentro da Periodontia e Implantodontia.

Ao **Guilherme Colla** por todo auxílio e gentileza durante o desenvolvimento e obtenção dos resultados da pesquisa no IntelAB - UFSC. Obrigada por todos os esclarecimentos de sempre e por me fazer aproximar da área da pesquisa.

Ao cirurgião dentista **Raí Heidenreich** por ter me auxiliado e me ensinado tanto durante todo o projeto de pesquisa. Muito obrigada.

A todos vocês meu muito obrigada. Vocês me inspiram e foram essenciais nessa etapa da minha vida profissional que está apenas iniciando.

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”*

**Charles Chaplin**

## RESUMO

Este estudo teve como finalidade analisar a viabilidade celular de fibroblastos gengivais de ratos provenientes de cultura primária, semeados sobre duas membranas diferentes: matriz de nanocelulose bacteriana (BNC) e matriz dérmica acelular (ADM - SureDerm®).

Cinco ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) foram selecionados para a coleta de células para o estabelecimento da cultura primária. Para tal, foi realizada biópsia da mucosa ceratinizada proveniente do palato dos animais em questão, que posteriormente foi removido. O material obtido foi cultivado em garrafas de cultura e a proliferação e crescimento posteriormente verificados através de microscópio óptico no Laboratório de Tecnologias Integradas (IntelAB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Após estabelecimento da cultura primária de fibroblastos, células da quinta passagem foram suplementadas com PRP (Plasma Rico em Plaquetas) provenientes dos ratos e semeadas sobre as membranas em placas de cultura. Para a verificação da viabilidade celular, foi realizado teste por método colorimétrico MTS.

A cultura primária foi estabelecida de maneira satisfatória e verificou-se a proliferação dos fibroblastos sobre a placa. Ambas membranas foram classificadas como viáveis e demonstraram respostas semelhantes entre si. Através da análise estatística One-way (ANOVA) seguida pelo teste de Tuckey não houve diferença entre ADM e BNC ( $p > 0,05$ ).

Conforme estabelecimento de fibroblastos sobre as membranas de BNC e ADM pôde-se concluir que ambas são potenciais arcabouços para fibroblastos. Apesar dos resultados positivos é necessária a realização de novos testes para a comprovação do teste *in vivo*, sendo assim alternativas em quadros clínicos com necessidade de utilização de enxertia de tecido mole.

Palavras-chave: membranas, arcabouço, fibroblastos, ratos.

## ABSTRACT

The aim of this study was to analyze the cellular viability of gingival fibroblasts from rats from primary culture, seeded on two different membranes: Bacterial Nanocellulose (BNC) and Acellular Dermal Matrix (ADM - SureDerm®).

Five Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*) were selected for collection of cells to establish a primary culture. For this, a biopsy of the keratinized mucosa from the palate of the animals in question was performed, which was later removed. The material obtained was cultured in culture bottles and the proliferation and growth were verified by optical microscope at the Integrated Technologies Laboratory (InteLAB) of the Federal University of Santa Catarina (UFSC).

After the establishment of the primary culture of fibroblasts, cells from the fifth passage were supplemented with PRP (Platelet Rich Plasma) from rats and seeded onto membranes in culture dishes. For verification of cellular viability, a MTS colorimetric test was performed.

The primary culture was established satisfactorily and proliferation of the fibroblasts was seen on the plate. Both membranes were classified as viable and demonstrated similar responses among themselves. A statistical analysis One-way (ANOVA) followed by the Tuckey test showed no difference between ADM and BNC ( $p > 0.05$ ).

According to the establishment of fibroblasts on the membranes of BNC and ADM it was concluded that both are potential scaffolds for fibroblasts. Despite the positive results it is necessary to carry out new tests for the *in vivo* comprobation, thus being alternatives in clinical settings that need the use of soft tissue grafting.

Key-words: membranes, scaffolds, fibroblasts, rats.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Triângulo da Engenharia de tecidos.....	18
<b>Figura 2</b> – Centrífuga (INTELAB UFSC).....	33
<b>Figura 3</b> – Animal posicionado e imobilizado em três pontos na posição de decúbito ventral para realização adequada da cirurgia.....	34
<b>Figura 4</b> – Remoção do explante do palato do animal.....	35
<b>Figura 5</b> – Membrana de Nanocelulose Bacteriana (INTELAB - UFSC).....	36
<b>Figura 6</b> – Meio de cultura celular DMEM.....	37
<b>Figura 7</b> – Meio de cultura celular DMEM.....	37
<b>Figura 8</b> – Explante do palato do animal.....	38
<b>Figura 9</b> – Placa de leitura de 96 poços.....	40
<b>Figura 10</b> – Câmara de Neubauer para avaliação da viabilidade celular em microscopia.....	40
<b>Figura 11</b> – Imagem de lâmina histológica de Fibroblastos proliferando sobre a placa após realização da 4 <sup>a</sup> passagem celular observada em microscopia de fase invertida.....	41
<b>Figura 12</b> – Segunda imagem de lâmina histológica de Fibroblastos proliferando sobre a placa após realização da 4 <sup>a</sup> passagem celular, observada em microscopia de fase invertida.....	42
<b>Figura 13</b> – Gráfico - Atividade metabólica dos fibroblastos de gengiva de rato após 48 horas de cultivo.....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADM – Matriz Dérmica Acelular

ANOVA – *Analysis of variance* (Análise de variância)

BNC – Nanocelulose bacteriana

ClCa – Cloreto de Cálcio

CO<sub>2</sub> – Gás carbônico

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium

HA – Hidróxiapatita

INTELAB – Laboratório de Tecnologias Integradas

MTS – corante 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio

O<sub>2</sub> – Oxigênio

PBS – Tampão Fosfato Salino

PLGA – ácido poli (ácido lactico-co-glicólico)

PMS – Metassulfato de Fenazina

PRP – Plasma Rico em Plaquetas

SFB – Soro Fetal Bovino

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

atm – atmosfera

cm<sup>2</sup> – centímetros quadrados

g – gramas

g.L<sup>-1</sup> – grama por litro

min – minutos

mm – milímetros

mm<sup>2</sup> – milímetros quadrados

mol.L<sup>-1</sup> – mol por litro

mL – mililitros

nm – nanômetros

rpm – repetições por minuto

mL/cm<sup>2</sup> – mililitros por centímetros quadrados

NaOH – Hidróxido de Sódio

pH – potencial hidrogeniônico

## LISTA DE SÍMBOLOS

® – Marca Registrada

°C – Grau Celsius

X – Vezes

β – Beta

% – Por cento

μL – Microlitos

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 ENGENHARIA TECIDUAL.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2 FIBROBLASTOS.....</b>	<b>20</b>
<b>2.3 MEIOS DE CULTURA CELULAR.....</b>	<b>21</b>
2.3.1 Cultura primária e Passagens Celulares.....	22
2.3.2 Fatores de Crescimento .....	23
2.3.3 Plasma Rico em Plaquetas .....	24
<b>2.4 ARCABOUÇOS CELULARES .....</b>	<b>25</b>
2.4.1 Nanocelulose Bacteriana.....	26
2.4.2 Matriz Dérmica Acelular .....	28
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1 OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>30</b>
<b>3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>30</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
<b>4.1 SELEÇÃO DA AMOSTRA .....</b>	<b>31</b>
<b>4.2 PROCEDIMENTOS PRÉ-OPERATÓRIOS .....</b>	<b>32</b>
<b>4.3 AQUISIÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP).....</b>	<b>32</b>
<b>4.4 COLETA DO TECIDO .....</b>	<b>34</b>
<b>4.5 AQUISIÇÃO DAS MEMBRANAS .....</b>	<b>35</b>
<b>4.6 MEIO DE CULTURA UTILIZADO .....</b>	<b>36</b>
<b>4.7 ESTABELECIMENTO DA CULTURA PRIMÁRIA.....</b>	<b>37</b>
<b>4.8 TESTE COLORIMÉTRICO.....</b>	<b>39</b>
4.8.1 Viabilidade celular por MTS.....	39
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>8 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>47</b>
<b>9 ANEXOS.....</b>	<b>55</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Enxertos de tecido mole autógeno são considerados padrão-ouro atualmente na Odontologia por possuírem alta capacidade cicatricial. Esses materiais são utilizados com a finalidade de substituir um tecido perdido para que ocorra uma regeneração tecidual mais eficaz. Contudo, nesses procedimentos, há a necessidade de uma segunda área doadora, o que justifica a procura por uma técnica reconstrutiva menos invasiva, podendo assim evitar uma nova área cirúrgica. Para tal, a engenharia tecidual visa a criação de um arcabouço de material absorvível ou não, capaz de armazenar células e fatores de crescimento que possam auxiliar no desenvolvimento de melhores técnicas dentro da odontologia, mais especificamente na área da periodontia e implantodontia.

A busca pela saúde periodontal em associação com uma estética favorável é uma questão muito visada atualmente. Em procedimentos cirúrgicos odontológicos, alguns tecidos podem ser lesionados, além da possibilidade de ocorrência de recessões, retrações gengivais e a própria ausência de mucosa ceratinizada, não conseguindo se restabelecer de maneira adequada ou não se assimilando à naturalidade e padrões estéticos (PEREIRA, A., 2010). Conforme citado por Coura (2004), os tecidos moles que circundam a cavidade oral são manipulados com bastante frequência pelo cirurgião-dentista e devido a isso, a busca pela obtenção de análogos teciduais para restabelecer a função, forma e estética constitui uma necessidade tanto clínica como socioeconômica. Além disso, não há apenas a preocupação do paciente com o resultado final, mas também do cirurgião-dentista para com seu paciente, buscando evitar um pós-operatório desconfortável e desfavorável e buscando uma menor morbidade (COURA et al., 2005).

A engenharia tecidual é uma área de estudos que aprofunda os conhecimentos realizando testes desses diferentes materiais, auxiliando grandiosamente o cirurgião-dentista nas técnicas reconstrutivas e trazendo novos conhecimentos, tornando a odontologia mais conservadora. Quanto à utilização de enxertos, a engenharia de tecidos institui uma tríade que diz respeito aos fatores necessários para o estabelecimento e viabilidade de uma membrana, para possível utilização como enxerto de origem artificial; esta tríade assim se compõe: células

cultivadas, matrizes “*scaffolds*” e mediadores solúveis, a exemplo dos fatores de crescimento (UEDA et al., 2000).

Como já citado por Coura (2005, p.191 *apud* TEN CATE, 1989), os fibroblastos são as células responsáveis pela formação e manutenção da matriz extracelular e produção de fibras colágenas do ligamento periodontal. Na busca pela regeneração de tecido mole periodontal ou peri-implantar, a manipulação e cultivo destas células permite o estabelecimento ou não de uma cultura adequada e viável para a formação de um arcabouço celular.

Para tal, neste estudo o objetivo principal foi avaliar dois diferentes e potenciais arcabouços para fibroblastos gengivais provenientes de ratos: a nanocelulose bacteriana (BNC) e uma matriz dérmica acelular (ADM – Surederm®).

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

Com o passar dos anos, aumentou-se a procura pela descoberta de um meio adequado de substituição tecidual que não necessitasse de uma segunda área doadora. Esta tentativa deve-se ao fato de que alguns inconvenientes podem estar relacionados à necessidade de uma segunda cirurgia. Conforme citado por Coura, G., (2004) a área doadora pode apresentar desde uma própria limitação tecidual, até o desenvolvimento de cicatrizes e áreas de hemorragia que podem levar à morbidade e desconforto pós-operatório, isso podendo ser bastante prejudicial ao paciente.

Langer et al., 1993 alavancaram o tema de engenharia tecidual com o objetivo de regenerar tecidos perdidos porém, só posteriormente os estudos foram levados à área da Odontologia na tentativa de restabelecer esses tecidos. Diversas pesquisas vêm sendo realizadas no intuito de verificar qual o melhor biomaterial a ser utilizado para armazenar células e fatores de crescimento, podendo possibilitar a regeneração almejada.

Para a utilização destes materiais de origem alógena e objetivando o restabelecimento de tecido mole periodontal (gengiva e ligamento periodontal), faz-se necessário a aquisição de células adequadas para tal (COURA et al., 2005). Os fibroblastos gengivais são fundamentais na produção e manutenção do ligamento periodontal (TEN CATE, 1989), portanto, são as células mais adequadas para estudos e testes *in vitro* visando um arcabouço ideal para a reconstrução dos

tecidos moles periodontais. Bem como demonstrado por Pini Prato et al. (2003), fibroblastos cultivados sobre uma matriz de ácido hialurônico resultaram em grande sucesso quando a membrana foi transportada ao sítio receptor do paciente. Pôde-se observar clinicamente o restabelecimento de mucosa ceratinizada e posteriormente houve confirmação histológica do sucesso dos testes.

Conforme citado por Pereira, A. (2010, p.25) os arcabouços devem apresentar algumas características específicas para que seu funcionamento se dê de maneira adequada: resistência mecânica para a adesão celular, biocompatibilidade e reabsorção pelo organismo sem causar qualquer tipo de alteração, porosidade para o estabelecimento da cultura celular, possibilitar adesão e multiplicação celular e finalmente, serem capazes de carrear fatores de crescimento. Simplificadamente e corroborando com a proposição de Ueda et al. (2000), uma tríade deve ser estabelecida para a produção de um tecido *in vitro*, que assim se define: (1) cultivo celular adequado, (2) fatores de crescimento para guiar a proliferação e vascularização e (3) um arcabouço celular biocompatível (Muschler; Nakamoto; Griffith, 2004)

Dentre as membranas disponíveis para a realização de estudos clínicos *in vitro* existem duas, já analisadas pela literatura que são a nanocelulose bacteriana (BNC) e a SureDerm® (ADM). A BNC consiste em um polímero derivado do hidrogel que possui diversas características favoráveis como “flexibilidade, alta força de elasticidade e capacidade de reter água, uma permeabilidade considerável para gases e líquidos e uma ótima compatibilidade com tecidos vivos” (CZAJA et al., 2006). Já a ADM (SureDerm®) consiste em um material já disponível no mercado, obtido através do tecido natural humano que sofre um processo de congelação após a remoção das células imunitárias da derme e epiderme, mantendo a estrutura tridimensional da derme; além disso a membrana permite a realização de revascularização e breve crescimento e influxo de fibroblastos. (Disponível em: <[www.hansgbr.com/eng/product/professional/skin\\_surederm.asp](http://www.hansgbr.com/eng/product/professional/skin_surederm.asp)>. Acesso em 23 jan. 2017).

Algumas matrizes já foram testadas e comprovadas cientificamente da sua possibilidade de utilização como substituto de tecido mole, como foi demonstrado por Harris, R.J., (1998) que realizou estudo comparativo entre o uso de enxertos autógenos e matrizes dérmicas acelulares e pôde concluir, satisfatoriamente, que não existe diferença estatística entre os dois materiais, trazendo assim, ambas as

técnicas como possíveis de serem utilizadas na clínica odontológica. Henderson, et al., (2001) também obtiveram resultados positivos, assegurando novamente o uso de enxertos alógenos.

Outro estudo ainda mais recente avaliou a matriz de PLGA (poli ácido láctico-co-glicólico – Boehringer Ingelheim) associada à partículas de hidroxiapatita e novamente os resultados foram satisfatórios, caracterizando tal membrana como “mais consistente para servir de arcabouço na engenharia de tecidos” (Pereira, A., 2010).

A partir dessa análise, o presente estudo tem por objetivo avaliar as membranas matriz dérmica acelular (SureDerm®) e nanocelulose bacteriana, verificando suas respectivas viabilidades como arcabouços celulares para a engenharia de tecidos no ramo da periodontia e implantodontia.

## 2.1 ENGENHARIA TECIDUAL

A busca por uma regeneração tecidual de forma artificial foi sempre visada, objetivando principalmente, uma menor morbidade ao paciente quando submetido a uma cirurgia de enxertia. Inicialmente conceituado por Langer e Vacanti no ano de 1993, o termo “engenharia tecidual” vem cada vez sendo mais utilizado na área da saúde e tem como premissa a criação de materiais de origem artificial que contenham células, matrizes (“scaffolds”) e fatores de crescimento, para a utilização como substituto tecidual (Langer e Vacanti, 1993). Estes elementos geralmente são representados com um triângulo, visto que a ausência de um das pontas impede o estabelecimento e sucesso do biomaterial (LYNCH et al., 1999).

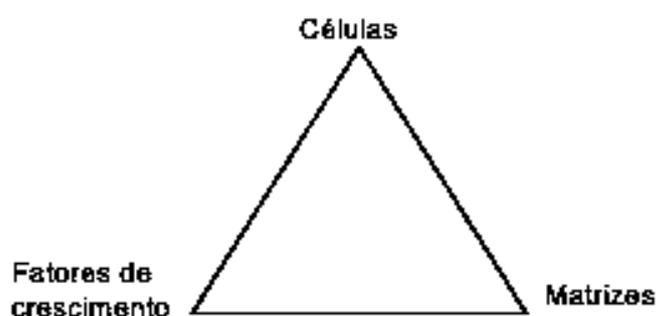


Figura 1 - Triângulo da Engenharia de tecidos

A engenharia tecidual vem se mostrando mais presente e necessária no que diz respeito a reparo, substituição e regeneração de tecidos, aplicando princípios básicos de química, física e biologia às necessidades da medicina e odontologia (Muschler; Nakamoto; Griffith, 2004).

A busca por técnicas minimamente invasivas - como é o caso da periodontia e implantodontia - fez com que a engenharia tecidual evoluísse de tal maneira, que apesar de suas limitações ainda existentes, tecnologias de ponta vêm sendo aplicadas na busca da inovação e descoberta de novos biomateriais (IWATA, T., 2013).

Ueda et al. (2000) reafirmam a necessidade da tríade de elementos - células, arcabouços ou matrizes e mediadores (como os fatores de crescimento), como pré-requisitos para o sucesso de um biomaterial, este que, na maioria das vezes é derivado de polímeros biodegradáveis de origem sintética ou natural (WIKESJO et al., 2003; SALGADO et al., 2004; RAI et al., 2007). Estas matrizes, também denominadas em inglês “scaffolds” devem se apresentar íntegras para que os tecidos se desenvolvam (LEE et al., 2000).

Usualmente a engenharia de tecidos busca realizar testes *in vitro* com a utilização de células capazes de se diferenciar em outros tipos celulares, como acontece com os osteoblastos e células do ligamento periodontal, os fibroblastos (LIN et al., 2008). Como alternativa às cirurgias de remoção de tecido autógeno para enxertia de tecido mole, testes com fibroblastos vêm sendo realizados pois são células capazes de serem cultivadas sobre matrizes biocompatíveis e essa associação é passível da utilização como substituto tecidual (PINI PRATO et al., 2000).

Apesar das dificuldades de estudos *in vitro* devido a necessidade de se obter um meio asséptico de trabalho e de pesquisadores treinados para a realização dos testes, há uma facilidade de padronização da cultura celular pois fatores como temperatura, pH, pressão osmótica, tensão de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> conseguem ser controlados precisamente. Além disso, o custo para realização deste tipo de estudo é baixo, o que permite o acesso facilitado à pesquisa (FRESHNEY, 1990).

## 2.2 FIBROBLASTOS

Os fibroblastos são células encontradas em grande predominância no tecido conjuntivo, responsáveis pela produção e manutenção da matriz extracelular (TEN CATE, 1989) e quando são submetidas a um procedimento de cultura celular, são estas que permanecem durante grande período de tempo com atividade viável, sendo assim consideradas as células proliferativas sobreviventes (COURA., 2004). Os fibroblastos que alcançam as regiões em processos inflamatórios ativos auxiliam na formação do tecido de granulação que são de suma importância para a contração final da ferida no processo de renovação epitelial (BRITO FILHO et al., 2006). Considerados um dos mais importantes componentes para o reparo de feridas, os fibroblastos se proliferam e produzem colágeno e outros componentes essenciais para a reconstituição tecidual (LIU et al., 2002).

Em terapias peri-implantares e periodontais, o uso de matrizes associadas a fibroblastos passa a ser uma alternativa de grande potencial quando se objetiva diminuir a chance de morbidade, ou seja, reduzir os riscos de danos teciduais com uma segunda e invasiva cirurgia para remoção de tecidos do palato, túber ou áreas edentadas para enxertia de tecido mole (PINI PRATO et al., 2000).

Estudos *in vitro* vêm sendo realizados com o objetivo de verificar a sobrevivência dos fibroblastos gengivais humanos. Kent et al. (1996) realizaram testes *in vitro* com uma cultura de fibroblastos gengivais e puderam verificar que até a sétima passagem as células permaneciam viáveis numa porcentagem acima de 90 e o declínio de sua viabilidade começava a ocorrer a partir da oitava passagem. Isto permite com que sejam estabelecidos protocolos quanto ao uso destas células, obtendo resultados satisfatórios em pesquisas *in vitro* e *in vivo*.

Há de se salientar uma grande vantagem da utilização de fibroblastos, pois são de fácil obtenção e manuseio em ambiente de cultura celular e apresentam grande capacidade proliferativa (PEREIRA NETO, 2010). Quando da utilização de fatores de crescimento associados aos fibroblastos, como por exemplo o PDGF, este é capaz de promover o aumento da proliferação destas células no ligamento periodontal, permitindo uma recuperação mais satisfatória ao paciente que apresenta algum tipo de lesão periodontal, conforme citado por Filho, JS (2002 apud MATSUDA, et al., 1992, GAMAL et al., 1998; HAASE et al., 1998).

### 2.3 MEIOS DE CULTURA CELULAR

Um meio de cultura é conceituado como um material (líquido ou gel) que tem por finalidade favorecer o crescimento de microrganismos, células, etc (MEENAKSHI, 2013). Para que o crescimento celular seja adequado e o êxito seja obtido, é necessária a correta escolha do meio a ser utilizado, seja ele artificial ou natural e que a linhagem celular adequada seja associada ao meio escolhido.

Os experimentos com meios de cultura celular começaram a ser realizados no início do século XX, mas dificuldades foram observadas devido ao fato de que os mesmos eram estritamente obtidos de fontes naturais que apresentavam condições variáveis e instáveis quando utilizados mais de uma vez. Devido a isso, os meios artificiais começaram a ser desenvolvidos e foi na década de 50 que houve a formulação do primeiro meio artificial, que tinha em sua composição diversos elementos essenciais como carboidratos e vitaminas (EAGLE, 1955). Contudo, percebeu-se que o meio era insuficiente e acreditou-se da necessidade de utilização de soro para o fornecimento de mais nutrientes, uma vez que é fonte rica de aminoácidos, proteínas, carboidratos e gorduras. Foi descoberto que o soro viabilizava o fornecimento de fatores de crescimento e mais que isso, que o soro fetal era capaz de realizar a replicação celular e crescimento de células mais sensíveis, tornando-se assim, um meio muito conhecido (HORNSBY P., et al., 1983).

Um meio comumente utilizado em pesquisas na área da Odontologia é o Soro Fetal Bovino (SFB), isto porque apresenta baixo custo e é capaz de carrear fatores de crescimento necessários para o desenvolvimento e proliferação celular. O soro de origem bovina é utilizado, além dos motivos já citados anteriormente, pois permite que em estudos *in vitro* possa ser realizada a inibição por contato e é capaz de aumentar a viscosidade do meio fazendo a proteção celular em possíveis danos mecânicos (MEENAKSHI, A., 2013). Quando não utilizado isoladamente, o SFB pode complementar meios que necessitem do mesmo.

O meio conhecido como Dulbecco ou DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) também está entre um dos mais utilizados. Com a presença de grande quantidade de aminoácidos e vitaminas, foi utilizado primariamente no cultivo de células embrionárias de ratos. Considerado como um meio basal, ou seja, não

possui proteínas ou fatores de crescimento, é comumente associado ao SFB, estando assim enriquecido por fatores de crescimento. (MEENAKSHI, A., 2013).

Na cultura de fibroblastos, é comum a utilização do meio DMEM seja ele acompanhado por uma suplementação ou não. É o que demonstra o estudo de Mazlyzam et al. (2008) onde os autores afirmam que o soro fetal bovino também é um dos suplementos mais utilizados na literatura para o estabelecimento de culturas *in vitro*, devido ao fato de o mesmo possuir fatores de crescimento diversos, citocinas, proteínas, hormônios e vitaminas que permitem a proliferação de fibroblastos de forma facilitada. Apesar de sua eficiência na cultura de fibroblastos, há de se atentar para o fato de que há o risco, mesmo que mínimo, de uma possível transmissão de príons e outros vírus, devendo-se assim, optar por um outro meio de suplementação para que haja a possibilidade de utilização no ser humano (MAZLYZAM et al., 2008).

Devido a problemática do uso do SFB, opta-se muitas vezes pela utilização do plasma rico em plaquetas (PRP), este que além de permitir o aumento da concentração de fatores de crescimento no sangue, é altamente utilizado em pacientes com problemas ósseos ou periodontais, auxiliando no processo de recuperação, liberando grande quantidade de fatores essenciais e sendo biocompatível e de baixo custo ao paciente (TRAVASSOLI-HOJJATI et al., 2016).

### **2.3.1 Cultura primária e Passagens Celulares**

Desde o início do século XX o estabelecimento de culturas celulares e teciduais foram introduzidas como meios de análise do comportamento de células verificando suas interações, diferenciações e mecanismos de ação (FERREIRA, 2003).

Para o cultivo celular, muitos estudos optam por realizar um cultivo primário de células que é aquele estabelecido a partir do crescimento de células provenientes do fragmento de tecido estudado e é amplamente utilizada em testes *in vitro* pois suas características fenotípicas e genotípicas se mantêm, caracterizando o tecido em questão por um período de tempo, antes de ocorrer a apoptose. Para o estabelecimento da cultura primária e das linhagens subsequentes são necessárias condições ideais de cultivo com suplementações (FRESHNEY, 2000).

O estabelecimento da subcultura normalmente irá implicar em subdivisão celular por meio do processo de tripsinização de modo que elas possam se soltar da base do frasco de cultura e assim serem transportadas para outro frasco para o crescimento celular. As subculturas conseguintes são necessárias quando o crescimento celular ultrapassa a quantidade de substrato presente (FERREIRA, 2003).

Para que as características sejam replicadas e as células se mantenham vivas e viáveis para pesquisas *in vitro*, linhagens celulares contínuas são estabelecidas e as passagens celulares podem ser realizadas até oitenta vezes com chance destas células manterem seus aspectos iniciais. Contudo, estudos com fibroblastos demonstram que após a 5ª passagem estas culturas se estabilizam e assim permanecem até a 35ª passagem e de acordo com o estudo realizado por Kent et al. (1996) a viabilidade dos fibroblastos permaneceu acima de 90% até a 7ª passagem, enquanto nas passagens posteriores já era percebido o declínio da taxa, que na 10ª passagem já representava 87%.

### **2.3.2 Fatores de Crescimento**

Fatores de crescimento são classificados como polipeptídeos com capacidade de ação local ou sistêmica possibilitando a proliferação de células por meio da regulação, proliferação, migração e diferenciação celular. Desta forma, a regeneração de tecidos moles por meio de materiais de origem artificial necessitam da presença de fatores de crescimento que possibilitem a proliferação e diferenciação celular em tecido epitelial e conjuntivo (BARTOLD et al., 2000).

Diversos fatores de crescimento vêm sendo estudados como é o caso das BMPs (Proteínas morfogenéticas ósseas), FGF (Fator de crescimento de fibroblastos) e o PDGF (Fator de crescimento derivado de plaquetas) um dos primeiros a ser identificado (PAIVA & ALMEIDA, 2005). Do plasma rico em plaquetas consegue-se obter diversos fatores de crescimento, dentre eles o PDGF que é o fator primário de crescimento no processo de regeneração e tem a capacidade de atrair células como os fibroblastos (NANNEY LB., 1990). Devido a isso, sabe-se que o PDGF tem papel fundamental no processo de reparo tecidual e cicatrização de lesões (ROSS et al., 1978)

Os fatores de crescimento além de serem capazes de promover a angiogênese, o que facilita ainda mais o processo cicatricial, tem ação indireta na síntese de colágeno, que permite a maior resistência das feridas em processo de cicatrização (KNIGHTON et al., 1990). Vários estudos *in vivo* realizados por Okada & Muramaki (1998), Bikfalvi et al. (1997) e Werner & Groose (2003) demonstraram a importância e necessidade da presença de fatores de crescimento durante estes processos regenerativos.

### 2.3.3 Plasma Rico em Plaquetas

Constituído basicamente por plasma, leucócitos e plaquetas, o plasma rico em plaquetas (PRP) é formado pela associação de fatores de coagulação com soro sanguíneo. Dentre os componentes presentes, as plaquetas são destaque por serem responsáveis pela liberação dos fatores de crescimento, cruciais para a iniciação do processo de reparo (MARX, 1999). Além da presença de componentes plasmáticos (plasma, leucócitos e plaquetas), a presença de proteínas como um dos componentes do PRP é crucial para que o mecanismo de cicatrização de tecidos conjuntivos se dê de forma correta (ARNOCZKY *et al.*, 2011). O PRP é a porção plasmática caracterizada como material rico em fatores de crescimento como o PDGF e TGF- $\beta$  que são importantes componentes para o reparo tecidual (FERREIRA, 2003).

Obtido do sangue autógeno, o plasma rico em plaquetas vêm sendo muito utilizado dentro da Odontologia conforme já demonstrado em estudos anteriores, principalmente por possuir propriedades de regeneração tecidual (MACEDO, A., 2004). A engenharia de tecidos vem observando grandes resultados no que diz respeito a reparação e regeneração tecidual em pacientes que necessitam de menor tempo para cicatrização e por meio da contribuição do PRP estes resultados vem se consolidando através de pesquisas *in vitro* e *in vivo* (FERREIRA VBC, 2012).

Estudos recentes demonstram com satisfação a capacidade de aceleração do reparo dos tecidos por meio do uso do PRP que através de seus fatores de crescimento - como PDGF, TGF- $\beta$ s, IGF-I e II e BMPs - presentes nas plaquetas, permitem que o processo se dê efetivamente (FILHO JS, 2002). Arnoczky *et al.* (2011) explicam a grande utilização do PRP na área odontológica corroborando com

as proposições de diversos autores, ressaltando seu potencial reparador e regenerador, grande eficácia e a capacidade de trazer segurança ao paciente e ao cirurgião-dentista. Lekovic (2002) realizou estudo associando o PRP com produtos de origem xenógena e obteve resultados satisfatórios em 21 pacientes que apresentavam defeitos periodontais.

Conforme mencionado por Marx (2004), o PRP auxilia na cicatrização da mucosa e tecidos moles e devido a isso é muito utilizado em associação a membranas como material de enxertia. Devido ao fato de ser um material autógeno, o PRP pode ser utilizado com segurança e tem grande aceitação pelos pacientes (MARX, 2004).

Dentre as técnicas existentes para obtenção do PRP, a venipuntura e a cardiopunção são comentadas frequentemente na literatura e para a presente pesquisa optou-se pela realização da punção intra-cardíaca baseando-se no protocolo fornecido pelo Biotério USP - Manual de Normas Técnicas (TABORDA et al., 2004).

Normalmente a técnica da cardiopunção é escolhida quando há a necessidade de obtenção de volume sanguíneo considerável e é considerada uma “coleta final” visto que após o procedimento o animal normalmente é sacrificado. Realiza-se a anestesia geral, coloca-se o animal em uma superfície plana para que seja realizada a punção e a agulha deve então ser inserida em um ângulo de 10 a 30° acima do abdômen (TABORDA et al., 2004).

## 2.4 ARCABOUÇOS CELULARES

Um arcabouço celular é um material com capacidade de carrear células e fatores de crescimento (PEREIRA, 2010). Classificado como um biomaterial, este deve interagir com sistemas biológicos que objetivam o tratamento, aumento ou substituição de qualquer tecido ou órgão do corpo e para sua correta escolha, requisitos como a biocompatibilidade com tecidos, biodegradabilidade e velocidade de degradação devem ser considerados (TABATA, 2009).

Dentre os biomateriais disponíveis existem os materiais alógenos e xenógenos. Aloenxertos são aqueles obtidos de materiais de outro indivíduo da mesma espécie, enquanto os xenoenxertos são compostos provenientes de

espécies diferentes (PRECHEUR, 2007). A literatura apresenta uma vasta quantidade de arcabouços como hidroxiapatita (HA), fosfato de cálcio, ácido polilático (PLA), ácido poli-glicólico (PGA), fosfato tricálcico, colágeno tipo I, entre outros. Contudo atualmente não há um consenso sobre qual biomaterial é considerado o melhor arcabouço para a engenharia tecidual (PEREIRA, 2010).

As matrizes derivadas do colágeno 2D e 3D são opções bastante estudadas na literatura e vêm sendo vistas como alternativas para utilização como materiais xenógenos, devido sua biocompatibilidade, envolvimento em processos fisiológicos, propriedades semelhantes ao tecido humano e importância fundamental na constituição da matriz do tecido conjuntivo (HARKNESS, 1961). Bell et al., (1981) demonstraram em seu estudo com fibroblastos cultivados em matriz colágena de arranjo tridimensional, que houve formação de estrutura semelhante ao tecido dérmico. Já Hillman et al., (2002) verificaram que sobre matrizes colágenas sintéticas bioabsorvíveis, a migração de células foi reduzida, enquanto matrizes frouxamente organizadas houve migração total.

Apesar da literatura atual estudar matrizes de colágeno com frequência, não há consenso sobre o melhor material e dentre a disponibilidade dos mesmos, a matriz dérmica acelular (ADM) é uma opção de substituto de origem alógena que vem amplamente sendo utilizada como arcabouço celular para a engenharia de tecidos. Sua biocompatibilidade e capacidade de promoção de adesão, migração e proliferação fibroblástica, conforme demonstrado em estudo realizado por Rodrigues (2008), faz com que a mesma seja visada em procedimentos de enxertia, principalmente no recobrimento de raízes expostas em quadros de deiscência (HENDRSON 2000; PINI PRATO et al., 2012).

Outra opção de arcabouço é a nanocelulose bacteriana (BNC), assim denominada devido a presença de fibras nanométricas. Como características predominantes, possui ótima capacidade de absorção e retenção de água e boa elasticidade (MACEDO LR, 2008).

#### **2.4.1 Nanocelulose Bacteriana**

A nanocelulose Bacteriana é um polímero que vem sendo amplamente utilizada para o tratamento de lesões em tecido mole e queimaduras (Sulaeva et al.,

2015) e historicamente é caracterizada como um material de sucesso por ser rápido e eficiente (Czaja et al., 2006). Proveniente de bactérias dos gêneros *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Salmonella*, *Escherichia*, and *Sarcina*, possui “flexibilidade, alto módulo de força de elasticidade e capacidade de reter água, uma permeabilidade considerável para gases e líquidos e uma ótima compatibilidade com tecidos vivos” (Czaja et al., 2006). Além dessas características vantajosas para a recuperação tecidual, Shah et al. (2013) citado por Sulaeva et al. (2015) também afirmam os benefícios de possuir uma alta porosidade que permite que outros medicamentos e materiais biológicos diferenciados possam ser introduzidos à membrana. A estabilidade mecânica, transparência, biocompatibilidade e a não toxicidade do material protegem de certa forma, o estabelecimento de um processo infeccioso.

A biocompatibilidade com os tecidos biológicos, citada previamente, é característica fundamental para os materiais xenógenos. A BNC, conforme publicado em estudos *in vivo*, apresentou ótima biocompatibilidade principalmente devido a alta taxa de adesão aos tecidos, proliferação de células do tecido conjuntivo, ausência de reação de corpo estranho e baixa taxa de reação inflamatória (Sulaeva et al., 2015).

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a BNC é capaz de realizar com sucesso a disseminação e proliferação de variadas células. Conforme citado por Morgado et al. (2015) “interações aprimoradas com células vivas podem permitir uma maior migração de células epiteliais e fibroblastos e então, conseguir uma maior rapidez na substituição tecidual”.

Dentre tantos materiais existentes no mercado, a BNC possui propriedades importantíssimas que fazem da mesma uma ótima escolha de material, como foi demonstrado em estudo *in vitro* por Chiaoprakobkij et al. (2011) citado por Sulaeva et al. (2015), podendo confirmar o benefício de sua utilização pela presença de características como estabilidade estrutural e boa resistência à ruptura. Além das propriedades biológicas como alta capacidade de proliferação de células humanas, como os fibroblastos, e ser biocompatível com os tecidos humanos, há também uma grande vantagem de ser considerada mais econômica devido sua alta durabilidade (Schmitz et al., 2014 *apud* Sulaeva et al., 2015).

### 2.4.2 Matriz Dérmica Acelular

A matriz dérmica acelular (ADM) vem cada vez mais sendo utilizada quando há necessidade de realização de enxertia com substituto de origem alógena, isto porque descarta a necessidade de uma segunda cirurgia para obtenção de tecido autógeno (REINO DM, 2011). Inicialmente esta matriz era aplicada como enxerto não-vital para pacientes em quadros de queimaduras severas, preservando o tecido do paciente e reduzindo a sua morbidade (WAINWRIGHT DJ, 1995).

A ADM é uma matriz acelular de tecido conjuntivo humano e biocompatível conforme vários estudos já demonstraram, tornando-a assim, um dos materiais alógenos mais estudados em periodontia atualmente (REINO DM et al., 2011). Ela é formulada a partir de uma preparação de pele humana e desta é realizada a remoção das células e outros componentes celulares sem prejudicar a organização da matriz extracelular e a membrana basal, podendo assim manter as fibras elásticas e colágenas (WAINWRIGHT DJ, 1995). Conforme citado por Rodrigues (2008), a ADM favorece a formação de uma estrutura biocompatível onde os fibroblastos terão maior facilidade de adesão, proliferação e migração. Para o bom funcionamento da mesma, é necessária a realização de um retalho favorável ao material, que por ser de origem alógena, requer um aporte sanguíneo considerável para que o processo de revascularização se dê com sucesso. Langer (1985) confirmou o sucesso da utilização de retalhos estendidos na maioria dos casos quando comparados à aplicação técnica clássica.

Esta matriz é indicada como recobrimento tecidual nas mais diversas áreas da medicina e odontologia. Dentre as indicações clínicas orais, Lino e Rosa (2006) citaram o aumento de gengiva queratinizada, coberturas radiculares e aumento e correção de defeitos de tecido mole em rebordo alveolar como possibilidades do uso da ADM.

Pesquisas revelam ótimos resultados quando do uso da ADM, principalmente no que diz respeito ao recobrimento de raízes expostas, apresentando resultados estéticos altamente satisfatórios (HENDRSON 2000; PINI PRATO et al., 2012). Vantagens são claramente visíveis quando da utilização da ADM, como já confirmado em diversos estudos, a mesma leva à ocorrência da diminuição da morbidade pós-operatória, redução do tempo cirúrgico e fácil obtenção do material, o que permite seu uso em ampla escala (REINO DM, 2011). Henderson et al (2001)

apresentaram resultados bastante satisfatórios quanto ao uso da ADM, frisando a possibilidade da utilização do material em áreas estéticas, visto que a cor e textura se mantêm semelhantes ao tecido. Comparando a utilização da ADM com enxerto de tecido conjuntivo subepitelial, não houve diferença significativa entre os mesmos (Harris 2000; Novaes et al., 2001).

Quando da escolha da utilização da ADM, há de se decidir qual dos produtos disponíveis no mercado será utilizado, uma vez que existem diversos fabricantes. Uma das opções é a SureDerm®, um material que pode ser transportado em temperatura ambiente (25°C) com auxílio de refrigeração e imersa em antibióticos (SILC, J., 2013).

A SureDerm® foi primeiramente implementada para o uso em cirurgias plásticas em quadros de queimaduras graves, bem como a maioria das matrizes dérmicas acelulares; posteriormente foi introduzida à periodontia como alternativa em cirurgias periodontais demonstrando sucesso (CHO, 2012).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar as membranas de nanocelulose bacteriana e matriz dérmica acelular (SureDerm®) como potenciais arcabouços celulares quando utilizada cultura primária de fibroblastos

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Estabelecer a cultura primária de fibroblastos proveniente de ratos
- Avaliar a viabilidade dos fibroblastos de cultura primária quando cultivados sobre as membranas Surederm® e nanocelulose bacteriana através de teste colorimétrico MTS

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa utilizou de 5 ratos da espécie *Rattus norvegicus albinus*, todos do sexo masculino e pelagem branca. A utilização foi permitida mediante aprovação do Comitê de Ética de Animais da UFSC (Anexo A). O estudo baseou-se na seleção aleatória de 5 ratos onde foram submetidos à coleta de PRP por punção intracardíaca e realizada coleta de tecido gengival/epitelial do palato, no qual o palato foi removido posteriormente. A biópsia e preparo do material coletado foi realizado com a anestesia dos ratos e auxílio de lâmina de bisturi para realização dos defeitos. O local escolhido foi uma câmara de segurança biológica de modo a evitar a contaminação e após a cirurgia houve direto encaminhamento para o Laboratório de Tecnologias Integradas (IntelAB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Foi estabelecida cultura primária utilizando do meio Dulbecco que posteriormente foi complementado com Plasma Rico em Plaquetas (PRP) do sangue animal obtido anteriormente à cultura celular instituída. A cultura de fibroblastos foi semeada em uma placa e em 48 horas de incubação foi realizada a leitura da mesma.

Houve realização do teste MTS a fim de contabilizar as células que permanecem vivas e viáveis após a imersão.

### 4.1 SELEÇÃO DA AMOSTRA

Para a seleção da amostra foram utilizados 5 ratos machos, albinos, adultos jovens, pesando em média 180g, da espécie *Rattus norvegicus albinus* e linhagem Wistar. Deste Universo de 50 ratos (utilizados para os testes *in vitro* deste estudo e estudo *in vivo* posterior) 5 animais foram selecionados no que se caracteriza como um método de seleção de amostragem probabilística – amostra aleatória simples, onde todos os animais tinham chance de serem selecionados.

Para que a pesquisa pudesse ser realizada, os animais foram submetidos a tratamentos profiláticos (vacinação e dieta conforme recomendações feitas pelo Biotério da UFSC) e um veterinário esteve responsável pelos cuidados pré, trans e pós-cirúrgicos. Os animais foram armazenados e cuidados pelo Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação - UFSC (LANDI).

## 4.2 PROCEDIMENTOS PRÉ-OPERATÓRIOS

Anteriormente à submissão dos animais ao procedimento cirúrgico, foi administrada uma dose de antibiótico de 40.000 U/kg de peso do animal (Pentabiótico® - Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP).

Os animais foram anestesiados via intraperitoneal com associação de dois produtos: 90mg/kg de Cloridrato de Cetamina 10% - (Cetamin, Syntec, Cotia – São Paulo) e 10mg/kg de Cloridrato de Xilazina 2% (Xilazin, Syntec, Cotia – São Paulo).

## 4.3 AQUISIÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)

O processo de aquisição envolve o sequestro e concentração de plaquetas com seus fatores de crescimento que auxiliam diretamente e universalmente os processos de cicatrização tecidual. Após a realização de anestesia geral nos animais, foram retirados 8mL de sangue de cada animal por meio de punção intracardíaca.

Após a aquisição do sangue animal por meio da técnica de punção intracardíaca, procedeu-se o processo de aquisição do PRP, para tal uma unidade de sangue foi acondicionada a uma tripla bolsa coletora padronizada e devidamente identificada contendo anti-coagulante CPDA-1, obtendo-se um volume total de 200 mL, devendo ser processadas em um período de até 6 horas após a coleta. A tripla bolsa de sangue foi posicionada na centrífuga, para promover a separação dos componentes sanguíneos por ordem de densidade, a uma velocidade de 2.200 rpm por 5 minutos a 22°C.

Após a primeira centrifugação retirou-se as bolsas do interior da máquina e removeu-se o sobrenadante diretamente para a segunda bolsa coletora, sendo separada a bolsa contendo eritrócitos das outras duas. Esta bolsa contendo eritrócitos foi enviada ao banco de sangue. A bolsa tripla passa a ser dupla, onde uma das partes apresenta o plasma pobre em plaquetas e a última bolsa que até o presente momento não apresenta nada.

As bolsas retornaram à centrífuga, onde foram submetidas a um novo processo de centrifugação, na velocidade de 4.100 rpm, por 10 minutos a 22 °C. Retirou-se a bolsa do interior da máquina e extraiu-se o sobrenadante diretamente para a última

bolsa coletora. Separou-se a bolsa e assim foram obtidos o PRP e o plasma pobre em plaquetas.



Figura 2 - Centrífuga (IntelLAB UFSC)

A bolsa contendo PRP foi pesada para certificar se a relação peso volume apresentava-se proporcional entre 60 g para 70 mL. Esta bolsa foi colocada em um agitador para homogeneização das plaquetas, ficando por 1 hora em temperatura de 20 a 22°C onde ocorreu a desagregação espontânea das plaquetas, para finalização do PRP.

A centrifugação deve ser eficiente para a obtenção de bons resultados e para isso o PRP deve apresentar ao menos 70% das plaquetas do Sangue total. Além disso, o processo de estocagem deve ser realizado em temperatura de 22°C e agitação constante, permitindo assim que hajam trocas gasosas com o meio (facilitada pela composição da bolsa: cloreto de polivinila e di-2-etil-hexil-ftalato), evitando a acidificação do pH.

Foram coletados 8 mL do PRP em seringa descartável de 20mL, sendo colocado 1 mL em tubo de microcentrifuga devidamente identificado, recebendo a sigla I, onde a partir de então foi denominado PRP puro. Seguindo o procedimento clínico normal, na seringa o qual restava os 7 mL de PRP foi incorporado 1mL de CICa a 10% passando a ter uma proporção de 7 para 1. Após o período de 1 minuto para que ocorresse a reação de quebra plaquetária foram coletados outro 1 mL

desta mistura e colocado em tubo de microcentrífuga devidamente identificado, recebendo a sigla II, que então foi denominado de PRP ativado.

#### 4.4 COLETA DO TECIDO

Para a realização da coleta do tecido epitelial e conjuntivo do palato, os animais foram posicionados em decúbito ventral e com auxílio de uma mesa para estereotaxia, as cabeças foram imobilizadas em dois pontos, evitando qualquer eventual movimentação do animal durante a cirurgia (Figura 1).

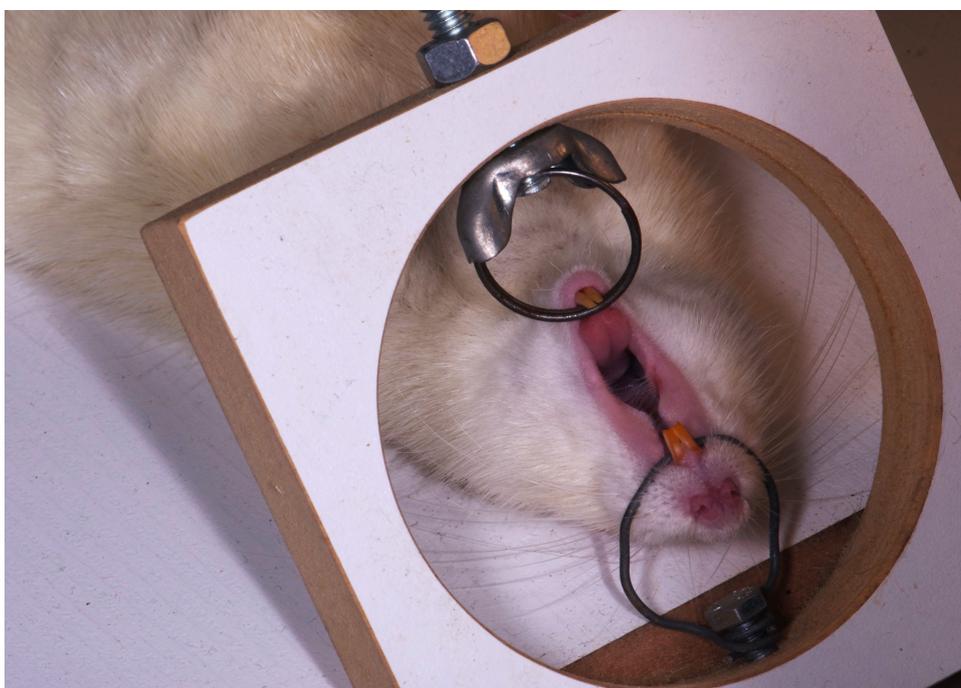


Figura 3 - Animal posicionado e imobilizado em dois pontos na posição de decúbito ventral para realização adequada da cirurgia

Foi realizada desinfecção com Clorexidina 0,12%, anestesia geral via intraperitoneal com carpule e agulha longa e realização de biópsia (explante) de mucosa queratinizada do palato do animal (epitélio e tecido conjuntivo) com dimensões aproximadas de  $5\text{mm}^2$  (2,0 x 2,5mm). Para a coleta do explante foram utilizados cabo de bisturi número 3 e lâmina cirúrgica número 15 (Figura 3).

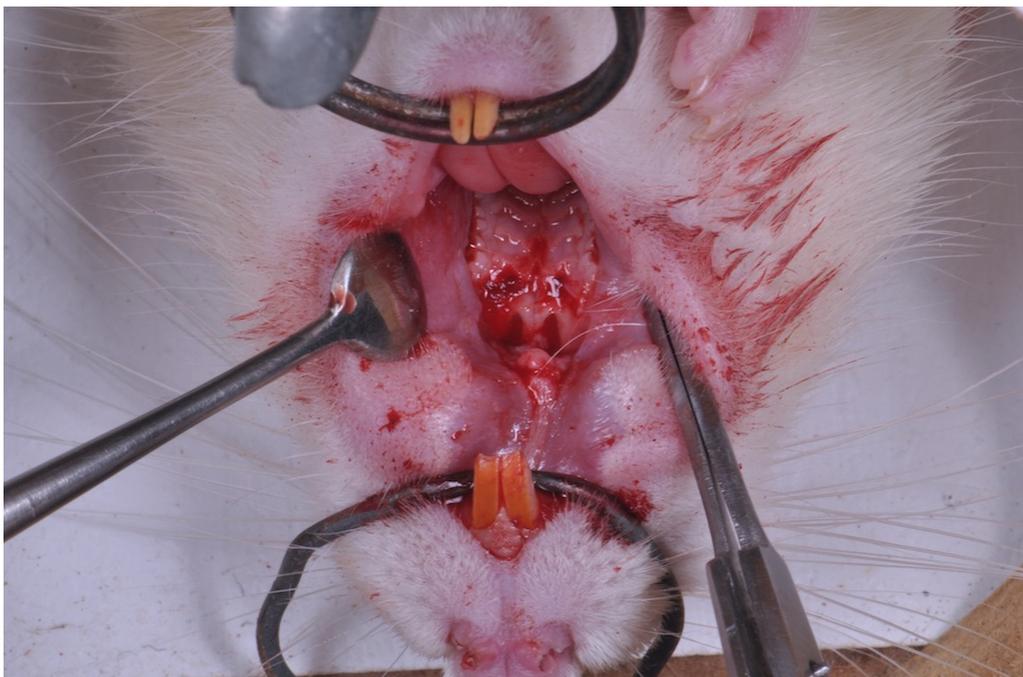


Figura 4 - Remoção do explante do palato do animal

Todos os procedimentos de cultura primária de fibroblastos realizados nesta pesquisa foram baseados na dissertação “Protocolo preliminar da cultura de fibroblastos da gengiva humana. Avaliação da viabilidade celular e dos possíveis danos causados ao DNA” (COURA, 2004).

#### 4.5 AQUISIÇÃO DAS MEMBRANAS

Para a produção da membrana de BNC que foi realizada no IntelLAB – UFSC, preparou-se um pré-inóculo em um tubo cônico com 10% do volume total de inóculo de meio manitol ( $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de manitol,  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de extrato de levedura e  $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de peptona bacteriológica) e 5 colônias da bactéria *Gluconacetobacter hansenii* por mL de pré-inóculo. O pré-inóculo foi agitado em vórtex durante 1 minuto e, após isso, leu-se a absorbância do meio em placa de 96 poços com alíquota de  $200 \mu\text{L}$  no comprimento de onda de  $660\text{nm}$  até que a absorbância se estabelecesse em aproximadamente  $0,150$ . As membranas foram produzidas em placas de 96 poços onde foi colocado  $200 \mu\text{L}$  de inóculo por poço. O crescimento bacteriano aconteceu em condição estática a  $26^\circ\text{C}$ . Após 7 dias de cultivo, as membranas foram retiradas e purificadas em solução  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de NaOH a  $50^\circ\text{C}$  durante 24 horas. Após esse

período, as membranas foram lavadas com água destilada até que o pH da água de enxágue equivalesse ao da água usado na lavagem. Por fim, esterilizou-se o material em autoclave (121 °C e 1,1 atm).

Já a membrana matriz dérmica acelular, comercialmente vendida pela empresa Hans Biomed com o nome de Surederm® foi adquirida no mercado estrangeiro.



Figura 5 - Membrana de nanocelulose Bacteriana (IntelLAB - UFSC)

#### 4.6 MEIO DE CULTURA UTILIZADO

O meio de cultura escolhido para o cultivo dos fibroblastos gengivais foi o meio DMEM suplementado por PRP.

O meio de soro fetal bovino (SFB) - como preconizado por Coura (2004) e mais atualmente por Meenakshi et al. (2013) - foi optado por não ser utilizado nesta pesquisa para que houvesse maior fidedignidade aos resultados esperados em humanos, sendo assim substituído pelo Plasma Rico em Plaquetas.

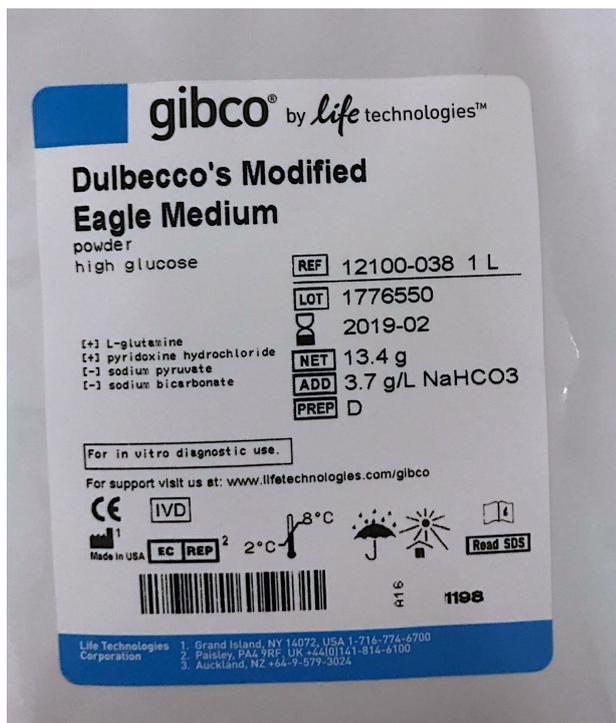


Figura 6 - Meio de cultura celular DMEM

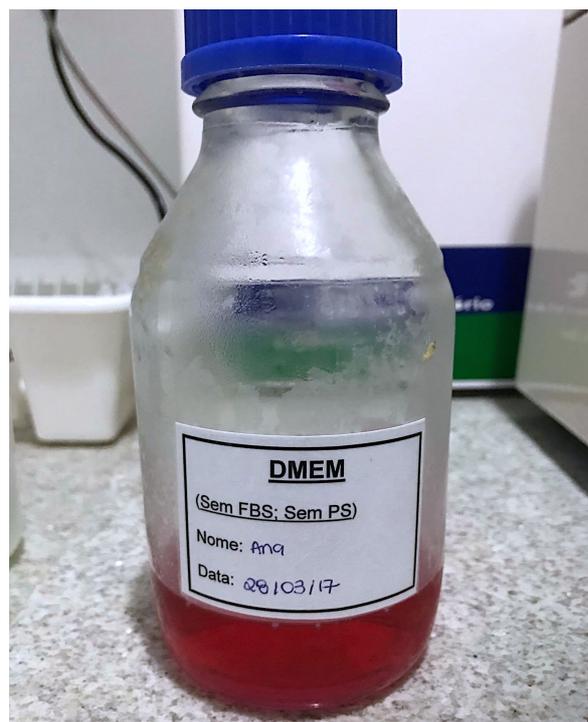


Figura 7 - Meio de cultura celular DMEM

#### 4.7 ESTABELECIMENTO DA CULTURA PRIMÁRIA

Para a obtenção da cultura primária dos fibroblastos gengivais, os procedimentos foram realizados dentro de uma câmara de segurança biológica em temperatura ambiente (25 – 28°C). O laboratório de segurança onde os procedimentos de cultura foram realizados, caracterizado como do tipo P2, foi assim escolhido para que houvesse adequada e cautelosa manipulação de microrganismos pertencentes ao grupo de risco 2 (risco individual moderado e risco coletivo limitado; microrganismos que podem provocar doenças ao homem, com pouca probabilidade de alto risco para os profissionais de laboratório).

O explante de 5mm<sup>2</sup> foi lavado duas vezes em solução de Tampão Fosfato Salino (PBS) e o tecido epitelial presente na amostra foi removido posteriormente com auxílio de lâmina de bisturi número 15 e cabo de bisturi número 3, em placas de Petri de 60mm de diâmetro com 5mL do meio de cultura. A escolha da remoção do tecido epitelial é sustentada por Loe et al. (1971) que demonstrou que os queratinócitos presentes no epitélio bucal tem sua função controlada por estímulos

morfogenéticos do tecido conjuntivo subepitelial e devido a isso a melhor escolha foi a utilização de fibroblastos presentes no tecido conjuntivo da mucosa ceratinizada.

Após a remoção do tecido epitelial (desepitelização), a amostra foi fragmentada em 5 partes, obtendo-se assim 5 explantes de 1mm<sup>2</sup>. Estes foram colocados em placas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> incubadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, com 2 mL do meio de cultura devidamente suplementado com PRP, antibiótico e antimicótico, para equilíbrio da fase gasosa. As placas de cultura foram acompanhadas diariamente através de um microscópio óptico (40x 200x, Olympus, Japão).

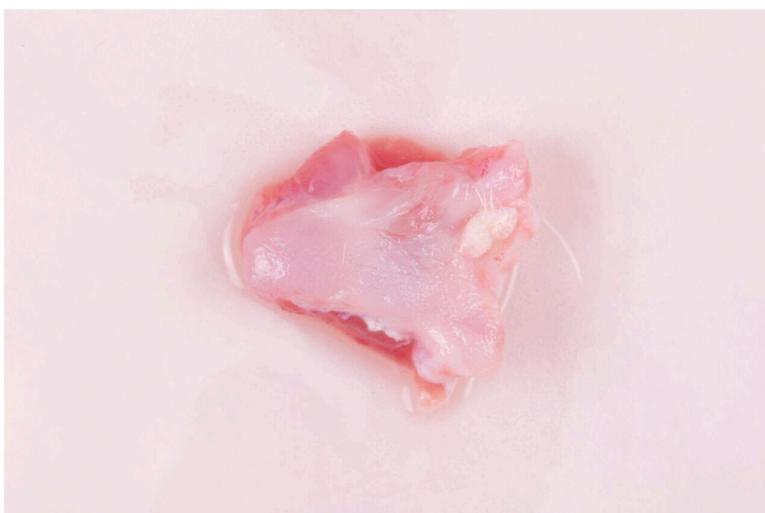


Figura 8 - Explante do palato do animal

Quando verificada confluência de aproximadamente 70%, as células foram então tripsinizadas a fim de obter a individualização das mesmas e essa cultura primária originou uma nova subcultura na proporção de 1:1. Nesta primeira “passagem” – que caracteriza o número de vezes que uma cultura foi subcultivada – os explantes foram removidos. A transferência de uma passagem ou subcultura de uma garrafa para outra geralmente causa uma subdivisão de uma população celular proliferativa capaz de perpetuação através do estabelecimento de uma linhagem celular.

A cada 4 (quatro) dias o meio era trocado, realizando a substituição de apenas metade do conteúdo das placas de cultura. A alteração de coloração do meio de cultura, que indica a atividade metabólica celular e alteração do pH, foi controlada diariamente.

O meio de cultura foi removido para dar continuidade à linhagem celular e as células foram lavadas 2 (duas) vezes com PBS (0,2mL/cm<sup>2</sup>) e retiradas de seu

substrato pela ação da tripsina (500µl) durante o período de 5min a 37°C – processo nomeado tripsinização. A inativação da tripsina foi realizada adicionando meio de cultura DMEM suplementado. Após todo o procedimento, as placas foram recolocadas na estufa de CO<sub>2</sub> onde permaneceram incubadas e monitoradas diariamente até que a nova subconfluência fosse atingida. Na 6<sup>a</sup> passagem as amostras celulares foram removidas das 5 (cinco) placas de cultura.

#### 4.8 TESTE COLORIMÉTRICO

Foi escolhido o teste com corante MTS para avaliar a cultura celular. Este procedimento consiste na utilização do corante MTS em associação do agente acoplador de elétrons Metassulfato de Fenazina (PMS) que juntos facilitam a leitura, visualização e contabilização das células de fibroblastos, podendo assim os caracterizar como viáveis ou não.

##### 4.8.1 Viabilidade celular por MTS

A viabilidade das células sobre as membranas de BNC e SureDerm® foram avaliadas pelo método colorimétrico com MTS. Foram semeadas  $1 \times 10^5$  células (contadas na câmara de Neubauer) por poço e em membranas de BNC e SureDerm. Após o tempo de cultura de 48 horas, as membranas e o controle placa, contendo as células foram lavadas com Tampão Fosfato Salino (PBS) três vezes e as membranas transferidas para uma nova placa de 96 poços. Sobre cada membrana foi adicionado 100 µL de meio DMEM e 20 µL do reagente MTS. As membranas foram incubadas por 2 horas em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, a 37 °C. Após a incubação, a solução foi homogeneizada e 100 µL de solução foi transferida para uma nova placa de 96 poços. A absorbância foi determinada a 490 nm em espectrofotômetro (Molecular Devices, EUA). O grupo do controle positivo foi constituído de células cultivadas sobre a placa de cultura de tecidos (TPP, Switzerland). Através da câmara de Neubauer foi realizada a contagem de células que foram introduzidas entre a lâmina e a câmara e se preencheram por capilaridade. A leitura foi feita em microscópio óptico.



Figura 9 - Placa de leitura de 96 poços



Figura 10 - Câmara de Neubauer para avaliação da viabilidade celular em microscopia

## 5 RESULTADOS

O estabelecimento da cultura primária de fibroblastos se deu de forma eficaz e satisfatória onde as células conseguiram sobreviver ao processo de desagregação e aderiram à placa, formando então uma monocamada primária de fibroblastos.

Mediante análise do teste com o corante MTS foi possível qualificar a atividade metabólica dos fibroblastos após 48 horas de cultivo, verificando que as membranas apresentam viabilidade semelhante. Foi possível notar através da análise por meio de microscopia óptica, a presença de proliferação de fibroblastos que se encontraram espalhados na placa (Figura 11 e 12). Desta forma as membranas ADM e BNC foram classificadas como biocompatíveis para utilização como potenciais arcabouços celulares (Figura 13).

Foi realizada análise estatística de variância não paramétrica (ANOVA) porém não houve diferença significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

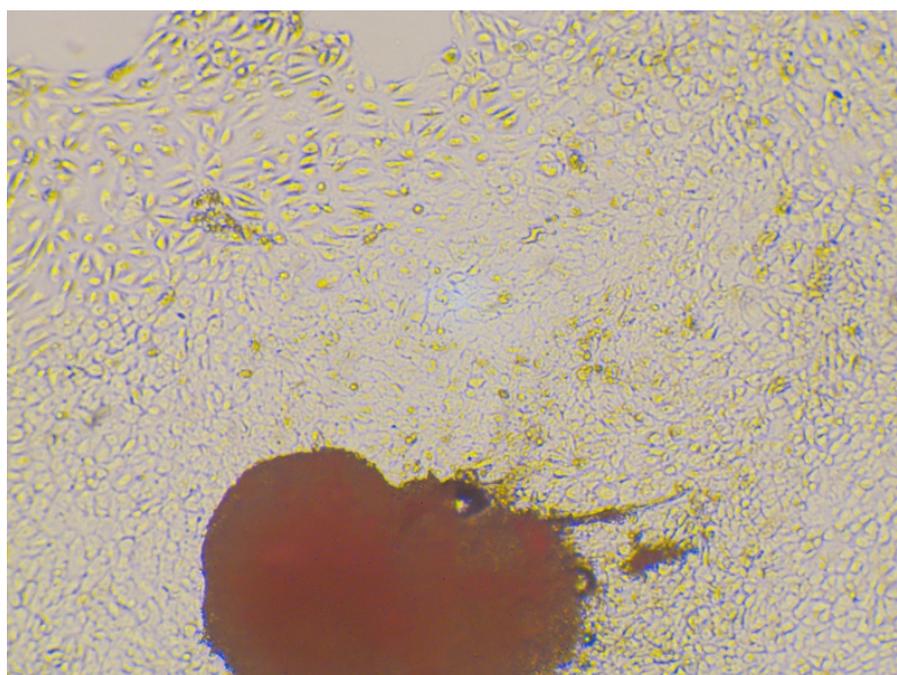


Figura 11 - Imagem de microscopia óptica do explante de fibroblastos proliferando sobre a placa

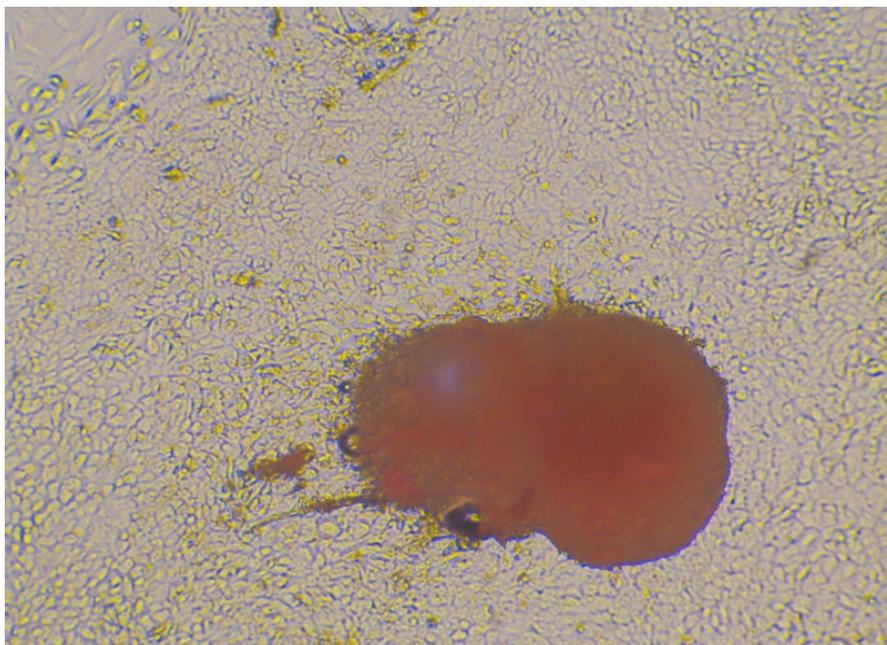


Figura 12 - Segunda Imagem de microscopia óptica do explante de fibroblastos proliferando sobre a placa

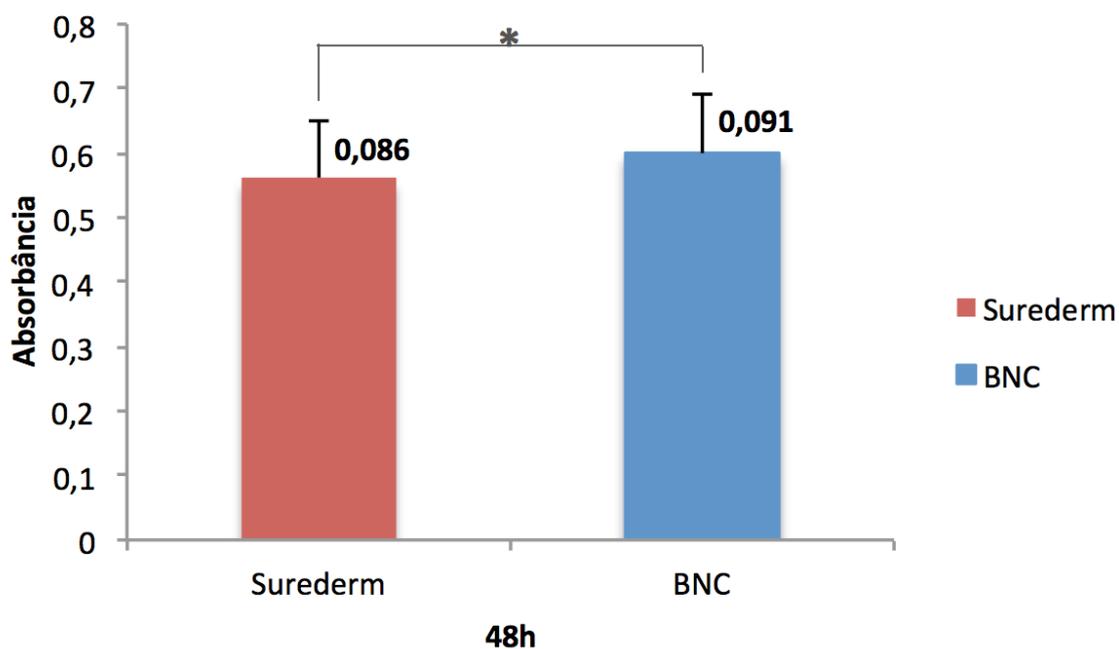


Figura 13 - Gráfico - Atividade metabólica dos fibroblastos de gengiva de rato após 48 horas de cultivo. (\*) Não apresentam diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre si, utilizando-se variância one-way (ANOVA) seguida do teste de Tukey.

## 6 DISCUSSÃO

O uso de materiais de origem xenógena ou alógena vem sendo cada vez mais estudado, com o objetivo de confirmar a possibilidade de utilização de substitutos para enxertos de tecido autógeno, trazendo maior conforto ao paciente. Pini Prato et al. (2000) demonstraram em seu estudo com associação de técnicas baseadas na engenharia de tecidos, que o cultivo primário de fibroblastos em uma matriz de ácido hialurônico pode ser uma alternativa viável para obtenção de mucosa ceratinizada. As membranas de BNC e ADM utilizadas neste trabalho demonstraram resultados semelhantes entre si e foram classificadas como positivas e de acordo com o que consta na literatura atual, uma vez que ambas puderam ser consideradas possíveis arcabouços para a engenharia de tecidos.

Os fibroblastos devem ser as células de escolha uma vez que se apresentam em predominância no tecido conjuntivo, sendo as primeiras opções de cultivo (COURA, 2002). Apresentam também facilidade de manuseio, fácil obtenção e capacidade proliferativa (ARMANDO, 2010). Através da análise microscópica deste estudo, notou-se a presença de fibroblastos espalhados na placa e verificou-se que a cultura primária celular se deu de maneira satisfatória corroborando com os resultados de Coura (2002) e Armando (2010), onde este último analisou o comportamento destas células em quatro matrizes diferentes: PLGA, PLGA + HA, Osseoguard® e Genrderm®. Moraes et al. (2007) em seu livro preconizaram a importância da formação de uma única e primária camada de fibroblastos, o que foi percebido na placa de cultura na presente pesquisa.

A utilização da membrana de ADM é justificada em diversos estudos devido sua biocompatibilidade, capacidade de promover adesão, migração e proliferação de fibroblastos e ser assim almejada em cirurgias de enxertia que necessitam o recobrimento radicular em casos de recessões e retrações (HENDERSON, 2000; RODRIGUES, 2008; PINI PRATO et al., 2012). Já a membrana de BNC foi utilizada devido sua alta taxa de sucesso, conforme demonstrado em estudo *in vitro* por Chiaoprakobkij et al. (2011) citado por Sulaeva et al. (2015). Além disso absorção e retenção de água e boa elasticidade são características dominantes desta membrana, justificando seu uso como opção de xenoenxerto (MACEDO LR, 2008).

Apesar de diversas membranas estarem sendo estudadas atualmente (como é o caso das matrizes de PLGA, HA, ADM e colágeno tipo I), não existe um

consenso na literatura de qual o melhor material para utilização como possível arcabouço celular. As matrizes derivadas do colágeno vêm sendo vistas como alternativas para utilização como materiais xenógenos, principalmente devido sua biocompatibilidade, envolvimento em processos fisiológicos, propriedades semelhantes ao tecido humano e importância fundamental na constituição da matriz do tecido conjuntivo (HARKNESS, 1961). Em estudo de Hillman et al., (2002) os autores verificaram que sobre matrizes colágenas sintéticas bioabsorvíveis, a migração de células foi reduzida, enquanto sobre matrizes frouxamente organizadas houve migração celular total. Comparativamente, a ADM é um material acelular de tecido conjuntivo humano e biocompatível conforme vários estudos já demonstraram, tornando-a assim, um dos materiais alógenos mais estudados em periodontia atualmente e devido a isso, foi uma das escolhas para utilização no presente estudo (REINO DM et al., 2011). Já a membrana de BNC possui características de flexibilidade, alto módulo de força de elasticidade e ainda ótima compatibilidade com tecidos vivos, além de possuir alta capacidade proliferativa para fibroblastos e ser econômica devido sua durabilidade e pouca necessidade de substituição, o que justifica seu estudo (CZAJA et al., 2006; SCHMITZ et al., 2014 *apud* Sulaeva et al., 2015).

No presente estudo, através do teste de viabilidade celular por MTS verificou-se a proliferação e sobrevivência dos fibroblastos sobre ambas as membranas. Quando comparadas entre si, a ADM e a BNC demonstraram resultados satisfatórios e à análise estatística não apresentaram diferença entre si, onde  $p > 0,05\%$  através da utilização do teste de variância one-way (ANOVA) seguida do teste de Tukey. Resultados semelhantes e adequados em relação à proliferação fibroblástica foram encontrados em diversos estudos quando utilizadas matrizes de origem xenógena e alógena (COURA, 2004; RODRIGUES, 2008; ARMANDO, 2010). De acordo com estudo realizado por Rodrigues (2008), verificou-se que o cultivo de fibroblastos gengivais semeados sobre uma membrana de ADM por 14 dias funcionaria como arcabouço celular ideal, uma vez que permitiu adesão, espraiamento, proliferação e migração fibroblástica. No estudo de Schmitz et al., (2014) a BNC foi classificada como uma membrana biocompatível e de alta capacidade de proliferação celular, podendo ter os fibroblastos como células de escolha.

Conforme a verificação do estabelecimento da cultura primária de fibroblastos sobre as membranas de SureDerm® e nanocelulose bacteriana, conclui-se que ambas possuem potencial para servirem como arcabouços de fibroblastos gengivais.

## 7 CONCLUSÃO

A proliferação de fibroblastos sobre ambas as membranas demonstra potencial da ADM e BNC como possíveis arcabouços celulares para a engenharia de tecidos, podendo proporcionar o aumento de tecido gengival queratinizado e permitindo um pós-operatório mais confortável ao paciente. Assim, as membranas podem ser classificadas como viáveis, contudo, apesar dos resultados satisfatórios e do potencial das membranas de ADM e BNC como arcabouços celulares, há necessidade de novos testes para comprovação do teste *in vivo*.

## 8 REFERÊNCIAS

ARNOCZKY SP, DELOS D, RODEO SA. **What is platelet-rich plasma?** Oper Tech Sports Med. 2011;19:142–8.

BARTOLD MP, MCCULLOCH CAG, NARAYANAN AS, PITARU S. **Tissue Engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology.** Periodontolog'y 2000 2000,24; 253-269.

BELL E, EHRLICH HP, BUTTLE DJ, NAKATSUJI T. **Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness.** Science, p 1052-1054, 1981.

BIKFALVI A, KLEIN S, PINTUCCI G, RIFKIN, DB. **Biological roles of fibroblast growth factor – 2.** Endocr. Rev. 18(1): 26-45, 1997.

CHO MY, LEE SH, HAN KA, LEE JY, JEON HR, KANG NR, KIM MR. **Experimental Study on the SureDerm (Acellular Dermal Matrix) Graft for Root Coverage in Dog.** Tissue Engineering and Regenerative Medicine, vol 6. Seoul, Korea, 2012

COURA, Gustavo dos Santos. **Protocolo preliminar da cultura de fibroblastos de gengiva humana. Avaliação da viabilidade celular e dos possíveis danos causados ao DNA.** Dissertação (Mestrado em Odontologia – Opção Implantodontia) – Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 95f., 2004

COURA G dos S, Zortéa Jr. AJ, Savi LA, Simões CMO, Magini R de S. **Protocolo Preliminar de Cultura de Fibroblastos Gengivais Humanos.** Rev Bras Implantodont Prótese Implant, 2005

CZAJA, W., Krystynowicz, A., Bielecki, S., Brown Jr., R.M., **Microbial cellulose – the natural power to heal wounds.** Biomaterials, 2006.

EAGLE, H. **Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture**. Science, v. 122, p.43-46, 1955

FERREIRA, Cimara Fortes. **Avaliação incipiente da influência do plasma rico em plaquetas na proliferação de osteoblastos humanos: estudo “in vitro”**. 2003, 70f. Dissertação (Mestre em Odontologia, opção Implantodontia) – Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

FERREIRA, Vanessa Borges Costa. **Protocolo para obtenção do plasma rico em plaquetas de cães**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária - Opção Ciência Animal) - Programa de pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Araçatuba, 2012).

FILHO, JS. **Avaliação do Plasma Rico em Plaquetas na Proliferação Celular - Estudo “in vitro”**. Tese (Doutorado em Odontologia - Opção Implantodontia) – Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 85f., 2002

FRESHNEY, RI. **Biology of the cultured cell: a manual of basic technique**. 2.ed. NewYork: Wiley-Liss,. p.347, 1990.

FRESHNEY, R.I. **Culture of Animal Cells – A Manual of Basic Technique**. 4 ed. New York: Wiley-Liss, 2000. 577p.

HANS GBR BIOMATERIAL. Disponível em: <[www.hansgbr.com/eng/product/professional/skin\\_surederm.asp](http://www.hansgbr.com/eng/product/professional/skin_surederm.asp)>. Acesso em: 15/05/2017.

HARKNESS RD. **Biological functions of collagen**. Biol Rev Camb Philos Soc. p. 399-463, 1961.

HARRIS, RJ. **Root coverage with a connective tissue with partial thickness double pedicle graft and acellular dermal matrix graft: a clinical and**

**histological evaluation of a case report.** Journal of Periodontology, p. 1305-1311, 1998.

HENDERSON, R. D. **Root coverage using Alloderm® acellular dermal graft material.** Contemp. Dent. Pract., Cincinnati, v. 2, n. 1, p. 1-10, 2000.

HENDERSON Robin, JONES Margaret, STARE Janez. **Accuracy of point predictions in survival analysis.** Statistics in Medicine, vol 20, 2001.

HILLMAN G, STEINKAMP-ZUCHT A, GEURSTEN W, GROSS G, HOFFMAN A. **Culture of primary human gingival fibroblasts on biodegradable membranes.** Biomaterials, 2002.

HORNSBY P, STUREK M, HARRIS S, SIMONIAN M. **Serum and growth factor requirements for proliferation of human adrenocortical cells in culture: comparison with bovine adrenocortical cells. In Vitro.** 1983;19:863-9.

IWATA T., YAMATO M., ISHIKAWA I., ANDO T., OKANO T. **Tissue Engineering in Periodontal Tissue.** The Anatomical Record, 2013.

KARRING, T., OSTERGAARD, E.; LÖE, H. **Conservation of tissue specificity after heterotopic transplantation of gingival and alveolar mucosa.** J. Periodont. Res., Chicago, v.6, p.282-293, 1971.

KENT, L.W.; DYKEN, R.A.; RAHEMTULLA, F.; ALLISON, A.C.; MICHALEK, S.M. **Effect of in vitro passage of healthy human gingival fibroblasts on cellular morphology and cytokine expression.** Archs. Oral Biol., v. 41, n. 3, p. 262-270, 1996.

KNIGHTON D, PHILIPS G, FIEDEL V. **Wound healing angiogenesis: indirect stimulation by basic fibroblast growth factor.** J Trauma 1990; 30:s1134-s144

LANGER B, LANGER L. **Subepithelial connective tissue graft technique for root coverage.** J Periodontol 1985;56:715-20.

LANGER R., VACANTI JP. **Tissue engineering**. Science 1993; 260p

LEE, K. Y., ROWLEY, J. A, EISELT, P., MOY, E., BOUHAIR, K., MOONEY, D. Controlling mechanical and swelling properties of alginate hydrogels independently by crosslinker type and cross-linking density. **Macromolecules**, v. 33, p. 4291-4294, 2000.

LEKOVIC, V. et al. **Comparison of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral, and guided tissue regeneration versus platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects: a reentry study**. J. Periodontol. v. 2, n. 73. p. 198-205, 2002.

LIN NH, GRONTHOS S, BARTOLD PM. 2008. **Stem cells and periodontal regeneration**. *Aust Dental J* **53**:108–121.

LINO, M. D. M.; ROSA, F. P. **Matriz dermal acelular em cirurgia periodontal: aplicações clínicas**. Rev. Periodontia, Piracicaba, v. 26, n. 1, p. 89-94, mar. 2006.

LIU B.A.Y.; ANDERS KALÉN M.D.; RISTO OLOF, MD.; WHALSTROM OLA, MD. **Fibroblast proliferation due to exposure to a platelet concentrate in vitro is pH dependent**. Wound Repair and Regeneration vol. 10, no. 5, 2002.

LYNCH, Samuel E.; MARX, Robert E.; NEVINS, Myron; WISNER-LYNCH, Leslie A. **Tissue Engennering: Aplicacions in maxillofacial surgery and periodontics**. Illinois: Quintessence Books, 1999. c. 4. p. 71-82, 1999.

MACEDO, Adriana P. **Plasma Rico em Plaquetas: Uma Análise Quantitativa e Qualitativa de Dois Protocolos de Obtenção**. Florianópolis, 2004. 61p. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu – Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

MACEDO, L. R. **Emprego de membrana de celulose microfibrilar na ceratoplastia lamelar em coelhos (O. cuniculus, LINNAEUS, 1758) : aspectos**

clínicos, morfológicos e imunoistoquímicos. 2008. 79 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

MARX R.E. **Platelet-Rich Plasma: A source of multiple autologous growth factors for bone grafts.** *Tissue Engeneering: Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics.* Illinois: **Quintessence Books**, 1999, p.71-82.

MARX R.R. **Platelet-Rich Plasma: Evidence to Support Its Use.** *J Oral Maxillofac Surg*, p 489-496, 2004.

MAZLYZAM A.L., AMINUDDIN B.S., SAIM L., RUSZYMAH B.H.I. **Human Serum Is an Advantageous Supplement for Human Dermal Fibroblast Expansion: Clinical Implications for Tissue Engineering of Skin.** *Archives of Medical Research*, 2008, p. 743-752.

MEENAKSHI A. **Cell Culture Media: A Review.** *Labome, Mater Methods*, 3:175, University of Pittsburgh Medical Center, 2013

MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos à terapia gênica.** São Paulo: Rocca, 503p, 2007.

MORGADO, Patrícia I., AGUIAR-RICARDO, Ana., CORREIA, Ilídio J. **Asummetric membranes as ideal wound dressings: An overview on production methods, structure, properties and performance relationship.** *Journal of Membrane Science.* Portugal, 2015.

MUSCHLER, George F.; NAKAMOTO, Chizu; GRIFFITH, Linda G. **Engineering Principles of Clinical Cell-Based Tissue Engineering.** *The Journal of Bone & Joint Surgery*, vol. 86-A, 200

NAKAHARA, Taka. **A Review of New Developments in Tissue Engineering Therapy for Periodontitis.** *Dent Clin N Am*, 2006.

NANNEY LB. **Epidermal and dermal effects of epidermal growth factor during**

**wound repair.** J Invest Dermatol. 1990;94(5):624–629.

NOVAES Jr. AB, SOUZA SLS. **Acellular dermal matrix graft as a membrane for guided bone regeneration: a case report.** Implant Dent 2001;10:192–6

NUAIRE CO2 INCUBATORS. Disponível em: <<http://www.nuaire.com/products/co2-incubators>>. Acesso em 03/04/2017.

OKADA H, MURAMAKI S. **Cytokine expression in periodontal health and disease.** Crit. Rev. Oral. Biol. 9(3): 248-266, 1998.

PAIV'A JS, ALMEIDA RV (ORGANIZADORES). VÁRIOS AUTORES. **Periodontia: A atualização clínica baseada em evidências científicas.** São Paulo: Artes Médicas, 2005.

PINI PRATO, G.P.; ROTUNDO, R.; MAGNANI, C.; SORANZO, C. **Tissue engineering technology for gingival augmentation procedures: A case report.** Int. J. Periodont. Rest. Dent., v.20, p.553-559, 2000.

PINI PRATO, G.P.; ROTUNDO, R.; MAGNANI, C.; SORANZO, C.; MUZZI, L.; CAIRO, F. **An autologous cell hyaluronic acid graft technique for gingival augmentation: A case series.** J. Periodontol., Chicago, v.74, n.2, p.262-267, 2003.

PINI PRATO, Giovanpaolo; CORTELLINI, Pierpaolo. **Coronally advanced flap and combination therapy for root coverage. Clinical strategies based on scientific evidence and clinical experience.** Periodontology 2000, vol. 59, p 158-184, 2012.

PEREIRA-NETO, Armando Rodrigues Lopes. **Análise do comportamento de fibroblastos gengivais cultivados sobre diferentes tipos de membranas reabsorvíveis.** Dissertação (Mestrado em Odontologia – Opção Implantodontia) – Programa de pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 33f, 2010.

PRECHEUR, H. V. **Bone graft materials.** Dent. Clin. North Am., Philadelphia, v. 51, n. 3, p. 729-746, Jul. 2007.

RAI B, HO KH, LEI Y, SI-HOE KM, TEO CMJ, BIN YACOB K, CHEN FL, NG FC, TEOH, SH. **Polycaprolactone-20% tricalcium phosphate scaffolds in combination with platelet-rich plasma for the treatment of critical-sized defects of the mandible: a pilot study.** *J Oral Maxillofac Surg* 65:2195–2205, 2007.

REINO, Daniel Maeda; AYUB, Lauro Garrastazu; RAMOS, Umberto Demoner; NOVAES JR, Arthur Belém. **Uso de substitutos de enxertos de tecido mole na odontologia.** *Braz J Periodontol.* Volu 21, 2011.

RODRIGUES, Annelissa Zorzeto. **Avaliação in vitro do cultivo de fibroblastos gengivais humanos em matriz dérmica acelular.** Dissertação (Mestrado em Odontologia – Opção Periodontia) – Programa de pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

ROSS, R.; GLOMSET, J.; KARIYA, B.; RAINES, E. **Role of platelet factors in the growth of cells in culture.** *Natl. Cancer Inst. Nonogr.*, v.48, p.103-108, 1978.

SALGADO AJ, COUTINHO OP, REIS RL. **Bone tissue engineering: state of the art and future trends.** *Macromol Biosci* 4:743–765, 2004.

SANTOS, Thiago de Santana. **Efeitos da terapia celular com a associação de células-tronco mesenquimais e osteoblastos no reparo do tecido ósseo.** 2014. Tese (Doutorado em Cirurgia Buco-Maxilo-Facial) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Schmitz, M., Eberlein, T., Andriessen, A. **Wound treatment costs comparing a biocellulose dressing with moist wound healing dressings and conventional dressings.** *Wound Med.* 6, 11–14, 2014.

SILC, Jennifer; PETRUNGARO, Paul. **Acellular Dermal Matrix Grafts for Root Coverage Procedures: Review of Products and Introduction of a New Tchnique.** *Nmr.* 6, Vol 34, Compendium, 2013.

SULAEVA, L., et al., **Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications**. A review, *Biotechnol Adv*, 2015.

TABATA, Y. **Biomaterial technology for tissue engineering applications**. *J. R. Soc. Interface*, v.6, p. S311- 324, 2009.

TABORDA, Carlos; MEHNERT Dolores U.; DA SILVA Carlos Augusto. **Manual de Normas Técnicas**. Biotério de Experimentação Animal - Departamento de Microbiologia - Instituto de Ciências Biomédicas USP, 25p, 2004.

TEN CATE AR. **The fibroblast and its products**. In: **Oral Histology. Development structure and function**. Toronto: C. V. Mosby, p.90-105, cap. 6, 1989.

TRAVASSOLI-HOJJATI, S.; SATTARI M., GHASEMI T., AHMADI R., MASHAYEKHI A. **Effect of platelet-rich plasma concentrations on the proliferation of periodontal cells: An *in vitro* study**. *European Journal of Dentistry*. 2016.

UEDA, M.; SUMI, Y.; MIZUNO, H.; HONDA, M. ODA, T.; WADA, K.; BOO, J.S.; KEN- ICHIRO, H. **Tissue engineering: applications for maxillofacial surgery**. *Mater. Sci. Eng.*, v.13, p.7-14, 2000.

WAINWRIGHT DJ. **Use of an acellular dermal matrix (AlloDerm) in the management of full-thickness burns**. *Burns* 1995.

WERNER S & GROSE R. **Regulation of wound healing by growth factors and cytokines**. *Physiol. Rev.* 83: 835–870, 2003.

WIKESJO UME, LIM WH, THOMSON RC, HARDWICK WR. **Periodontal repair in dogs: gingival tissue occlusion, a critical requirement for GTR**. *J Clin Periodontol* 30:655–664, 2003.

## 9 ANEXOS

Anexo A – Resultado Solicitação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA – UFSC).

### Resultado de Solicitação de Protocolo

**Protocolo**

PP00908

**Título**

Cultura Primária de Fibroblastos: Avaliação In Vivo

**Data de Entrada**

20/02/2014

**Resultado:**

Aprovado

**Data/Prazo**

29/05/2014

**Considerações**

Ofício nº 145/CEUA/PROPESQ/2014

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

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Cesar Augusto Benfatti - Departamento de Odontologia - CCS

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao projeto de pesquisa sob sua responsabilidade o presidente da CEUA deliberou ad referendum, considerando o parecer de dois relatores, pela:

- APROVAÇÃO para a utilização de 50 ratos (*Rattus norvegicus*) pelo período de 2 anos a partir da data de credenciamento.
- vide parecer em anexo.

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

Data 29/08/2016

Data 29/05/2014

**Parecer(es):**

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

## Anexo B – Ata de apresentação do Trabalho de Conclusão de Curso



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
CURSO DE ODONTOLOGIA  
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE ODONTOLOGIA

**ATA DE APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

Aos 20 dias do mês de outubro de 2017, às 9 horas,  
em sessão pública no (a) auditório do CCS desta Universidade, na presença da  
Banca Examinadora presidida pelo Professor

Ubir Augusto Magalhães Benfatti  
e pelos examinadores:

1- Abraão Moratelli Prado

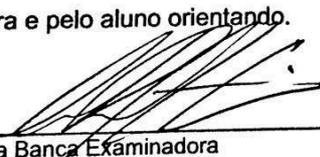
2- Mário Aurélio Bianchini

o aluno Manuela Broring Leborbenchon

apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação intitulado:

Avaliação dos membranos de monocelulose bacteriana e  
matriz de ímua alveolar (sundrem) como criobancos para engenharia tecidual

como requisito curricular indispensável à aprovação na Disciplina de Defesa do TCC e a integralização do Curso de Graduação em Odontologia. A Banca Examinadora, após reunião em sessão reservada, deliberou e decidiu pela aprovação do referido Trabalho de Conclusão do Curso, divulgando o resultado formalmente ao aluno e aos demais presentes, e eu, na qualidade de presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais componentes da Banca Examinadora e pelo aluno orientando.

  
Presidente da Banca Examinadora

Abraão Moratelli Prado  
Examinador 1

Mário Aurélio Bianchini  
Examinador 2

Manuela Broring Leborbenchon  
Aluno