

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

LUCIANO JOSE EIGIO ISAKA

**RETRAÇÃO CICATRICAL E ATOXICIDADE DE MEMBRANAS DE
NANOCELULOSE VEGETAL EM FERIDAS CUTÂNEAS DE RATOS *Rattus rattus***

(Wound contracture and non-toxicity of vegetal nanocellulose films on skin lesions of
rats *Rattus rattus*)

CURITIBA

2019

LUCIANO JOSE EIGIO ISAKA

**RETRAÇÃO CICATRICAL E ATOXICIDADE DE MEMBRANAS DE
NANOCELULOSE VEGETAL EM FERIDAS CUTANEAS DE RATOS *Rattus rattus***

(Wound contracture and safety of vegetal nanocellulose films skin lesions of rat
Rattus rattus)

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, área de concentração Saúde, Tecnologia e Produção Animal, da Escola de Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal em Saúde, Tecnologia e Produção Animal Integrada.

Orientador: Prof. Dr. José Ademar Villanova Jr.

CURITIBA

2019

TERMO DE APROVAÇÃO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, expresso meus agradecimentos a todos os animais utilizados nessa pesquisa e os profissionais responsáveis por criá-los e fornecê-los, agradeço especialmente à bioterista Luana da Silva Mazepa, do biotério da UFPR (Campus Curitiba). Ao bioterista Rafael Zotz e a todos os funcionários do biotério da PUCPR (Campus Curitiba), por cuidarem dos animais e não medirem esforços para o bem-estar dos mesmos durante o experimento.

À equipe executora desse estudo: os pesquisadores da Embrapa Florestas, Prof. Dr. Washington Luiz Esteves Magalhães e M.Sc. Francine Ceccon Claro, pelo desenvolvimento das membranas de celulose vegetal, pelas ideias e contribuições dadas em diversas reuniões, agradeço também, aos amigos e colegas médicos veterinários M.Sc. Bruno Massa de Viveiros e M.Sc. Tainah Dorado Cereja de Souza.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Ademar Villanova Junior, por guiar os meus passos e me orientar, para que eu me tornasse um grande profissional.

Agradeço também aos profissionais envolvidos na realização deste estudo, os funcionários Misael Gomes Barbosa por todo o auxílio e simpatia durante os procedimentos no Laboratório de Técnica Operatória da PUCPR; Lúcia Retka Renzi, pelo processamento das amostras histopatológicas e frequente auxílio no laboratório de Patologia Experimental da PUCPR, à Med. Vet. Iara Brandão pela confecção e avaliação das lâminas histopatológicas, à Med. Vet. Jéssica Fagundes do Reis pelas análises bioquímicas, ao técnico do Laboratório de Patologia da PUCPR, Seigo Nagashima pela digitalização de lâminas histopatológicas, à Farmacêutica Salete Haluche Paul pelo processamento de materiais utilizados e disponibilização de seu laboratório. Ainda, ao Prof. Dr. Saulo Henrique Weber pelas avaliações estatísticas e ao Prof. Dr. Jair Rodini Engracia Filho pela disponibilização do laboratório de Patologia da Clínica Veterinária Escola da PUCPR, e auxílio durante o processamento de amostras histopatológicas.

Agradeço imensamente os meus pais Neuseli Maria Polak Isaka e Oscar Eigio Isaka por sempre apoiarem meus estudos, desde os primeiros degraus e me incentivarem sobremaneira a buscar o conhecimento ao longo da minha caminhada.

Agradeço também a minha amada esposa Luana Carpovicz, por todo apoio durante todo meu caminho pessoal e profissional, sem você tudo teria sido mais difícil.

Dedico esta tese aos animais nela estudados, pois sem eles, perguntas jamais teriam respostas. Que o seu sacrifício beneficie o caminho de futuros pesquisadores e pacientes

RESUMO GERAL

O retardo cicatricial constitui um desafio clínico e cirúrgico extremamente recorrente, culminando em limitações físicas, sofrimento emocional e maiores custos de tratamento a sistemas de saúde por todo o mundo. Estudos recentes buscam materiais que permitam acelerar o processo de reparação, por fornecer ambiente ideal para a proliferação celular. A celulose vegetal é um polímero natural renovável e amplamente disponível na natureza, que apresenta características físicas únicas, e que pode ser produzida na forma de membrana. O presente estudo teve como objetivo avaliar a biossegurança e o estímulo cicatricial da membrana de celulose vegetal (MCV) em lesões cutâneas de ratos. No total, foram avaliados 117 ratos Wistar, machos com idade padronizada (adultos jovens). Em nove animais foi avaliada diariamente a biossegurança do uso da MCV com a implantação de discos de 6 mm no tecido celular subcutâneo, avaliação da presença de reação a corpo estranho como prurido, eritema e presença de fistula, além da manutenção, ganho ou perda de peso dos animais. Após 15 dias os animais foram submetidos à eutanásia para coleta de amostras séricas e de fragmentos de pele para exame histopatológico. A retração cicatricial foi avaliada em 108 animais, distribuídos aleatoriamente em três grupos de 36 animais cada: Grupo Controle Negativo (GC-), onde não foram utilizados tratamentos; Grupo Controle Positivo (GC+), tratado com membrana comercial de celulose bacteriana; Grupo Tratamento (GT) onde foi utilizado tratamento com MCV. Cada grupo foi anestesiado e uma lesão cutânea padrão de 3 cm de diâmetro foi criada cirurgicamente no dorso dos animais, que foram acompanhados durante 14 dias. Nestes animais foram avaliadas as características macroscópicas das feridas durante o processo cicatricial e parâmetros histológicos de reepitelização, inflamação, neovascularização, contagem celular específica, avaliação qualitativa e quantitativa de colágeno, e avaliação imuno-histoquímica com marcador de anti-fator VIII. Na avaliação macroscópica das lesões, os grupos tratados apresentaram feridas com melhor aspecto e sem a formação de crosta exuberante. O grupo tratado com MCV apresentou maior retração da ferida aos 14 dias com maior proliferação de colágeno. O grupo tratamento apresentou melhores resultados, na retração cicatricial, menor mobilização celular inflamatória, proliferação de colágeno tipo I e proliferação total de colágeno quando comparada ao grupo controle. Não foram observadas

alterações séricas ou cutâneas no grupo com o implante subcutâneo. Além da melhor retração da ferida no tempo final da avaliação (14 dias) e maior proliferação de colágeno, o grupo tratado com MCV não apresentou resultado deletério a ferida em nenhum dos parâmetros avaliados demonstrando seu potencial para uso de maneira tópica.

Palavras-chave: Biotecnologia. Celulose. Cicatrização. Curativos hidrocoloides.

ABSTRACT

Wound closure is a recurrent clinical and surgical challenge, culminating in physical limitations, emotional distress, and increased treatment costs to health care systems worldwide. Recent studies are looking for materials that can accelerate the repair process by providing the ideal environment for cell proliferation. Vegetable cellulose is a naturally occurring and widely available natural polymer, which has unique physical characteristics and can be produced in the form of a membrane. The present study aimed to evaluate biosafety and cicatricial stimulation of the use of vegetable cellulose membrane (VCM) in cutaneous lesions of rats. A total of 117 Wistar rats, males, with standardized age (young adults), were used throughout the experiment. In nine animals, the biosafety of VCM was evaluated daily. In these animals, 6mm MCV discs were implanted in the subcutaneous tissue, where it was evaluated the presence of foreign body reactions such as pruritus, erythema and presence of fistula, besides maintenance, gain or loss of body weight. After 15 days the animals were submitted to euthanasia for collection of skin lesion and blood samples. Scar retraction was evaluated in 108 animals, randomly distributed into three groups of 36 animals each: Negative Control Group (GC-), no treatments were used; Positive Control Group (GC +), treated with commercial bacterial cellulose membrane; Treatment group (GT) where VCM treatment was used. Each group was anesthetized and a cutaneous lesion of 3 cm diameter was surgically created on the back of the animals being the healing wound followed for 14 days. In these animals the macroscopic characteristics of the wounds during the healing process and histological parameters of reepithelialization, inflammation, neovascularization, specific cell counting, qualitative and quantitative collagen evaluation, and immunohistochemical evaluation with anti-factor VIII marker were evaluated. In the macroscopic evaluation of the lesions, the treated groups presented wounds with better appearance and without the formation of exuberant crust. The VCM treated group had a greater retraction of the wound at 14 days with greater collagen proliferation. There was no statistical difference between the histopathological scores and in the immunohistochemical analysis evaluation. No serum or cutaneous changes were seen in the subcutaneous implant group. In addition to better wound retraction at the end of the assessment (14 days) and increase collagen proliferation, the VCM treated group did not present deleterious results to the wound in any of the evaluated parameters demonstrating its potential for use topically.

Keywords: **Biotechnology.** Cellulose. Hydrocolloid dressings. Wound healing.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Imagem fotográfica do moinho Masscoloider Masuko Sangyo (A), em funcionamento (B), e do disco de pedra rotativo necessário para o preparo de celulose nanofibrilada (C).....39
- Figura 2. Micrografias do filme de nanocelulose. Magnificação 500x (A), e magnificação 10 kx (B).....40
- Figura 3 – Lesão cutânea circular de 3cm de diâmetro em rato Wistar.....42
- Figura 4 – Aspecto da membrana de celulose bacteriana (Membracel®) (A). A imagem (B) refere-se a membrana aplicada sobre a lesão cutânea em rato Wistar.....42
- Figura 5 – Aspecto da membrana de celulose vegetal (A). A imagem (B) refere-se a membrana aplicada sobre a lesão cutânea em rato Wistar.....42
- Figura 6 – Implantação do disco da membrana de celulose vegetal no tecido celular subcutâneo de rato Wistar.....43
- Imagem 7 – Fórmula utilizada para cálculo da área de retração da ferida expressa em porcentagem. A_0 corresponde a área inicial da ferida e A_t corresponde a área no momento da aferição.....43
- Figura 8 – Planimetria em programa de imagem IMAGE J 1.51K, para análise da retração cicatricial das feridas cutâneas em ratos Wistar.....44
- Figura 9 - Aspecto histológico de corte transversal de cicatriz cutânea de rato Wistar. Nota-se o colágeno sendo corado em azul claro com o uso da coloração de Tricrômio de Mallory no aumento de 20x.....46
- Figura 10 – Aspecto histológico de corte transversal de cicatriz cutânea de rato Wistar. Sob luz polarizada e coloração de Sirius Red é possível observar fibras de colágeno tipo I (cor vermelha) e tipo III (cor verde)46
- Figura 11 – Aspecto histológico de corte transversal de cicatriz cutânea de rato Wistar. A reação imuno-histoquímica com antifator VIII, caracterizada pela coloração marrom no aumento de 20x.....47
- Figura 12 - Porcentagem da retração cicatricial cutânea nos diferentes tempos avaliados (4, 7, 11 e 14) dos grupos GC- (controle negativo), GC+ (controle positivo) e GT (tratamento – membrana de celulose vegetal)50
- Figura 13 - Aspecto histológico de corte transversal de cicatriz cutânea de rato Wistar, em aumento de 20x. Nota-se coloração vermelha a serem contados pelo

programa Image-Pro Plus 4.5.0.29 para definição de área total de colágeno.
.....52

Figura 14. A imagem demonstra a máscara aplicada pelo programa Image-Pro Plus 4.5.0.29 para contagem das áreas dos diferentes tipos de colágeno, tipo I (azul) e tipo III (amarelo).....53

Figura 15. A imagem demonstra contagem de área aplicada pelo programa Image-Pro Plus 4.5.0.29 (vermelho) para aferição da área onde houve reação com o antifator VIII.....55

Figura 16. Aspecto macroscópico da região dorsal de rato Wistar, após 21 dias da implantação de disco de 0,5 cm de celulose vegetal no tecido subcutâneo.....57

Figura 17. Imagem de granuloma encapsulado (seta) da membrana de celulose vegetal com a presença de material basofílico celular implantado no subcutâneo de ratos Wistar (seta). Na porção superior nota-se presença de tecido cutâneo com as camadas da epiderme, derme, hipoderme e muscular sem presença de fistulação ou reação cutânea características de corpo estranho.....57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Testes físicos da membrana-base de celulose vegetal.....	40
Tabela 2 - Imagens fotográficas das cicatrizes cutâneas dos grupos GC-, GC+ E GT em diferentes tempos de observação (dias 4, 7, 11 e 14).....	49
Tabela 3 - Médias das porcentagens de retração das lesões dos grupos GC-, GC+ e GT nos dias 4, 7, 11 e 14.	50
Tabela 4 - Medianas dos escores de inflamação dos grupos GC-, GC+ e GT nos dias 4, 7, 11 e 14.....	50
Tabela 5 - Medianas dos escores de angiogênese dos grupos GC-, GC+ e GT nos dias 4, 7, 11 e 14.....	51
Tabela 6 - Medianas dos escores de colágeno dos grupos GC-, GC+ e GT nos dias 4, 7, 11 e 14.....	51
Tabela 7 - Média da área total de colágeno, expresso em micrometros quadrados, dos grupos GC-, GC+ e GT nos dias 4, 7, 11 e 14.....	52
Tabela 8 - Média da área total de colágeno tipo I, expresso em porcentagem, dos grupos GC-, GC+ e GT nos dias 4, 7, 11 e 14.....	53
Tabela 9 - Média da área total de colágeno tipo III, expresso em porcentagem, dos grupos GC-, GC+ e GT nos dias 4, 7, 11 e 14.....	53
Tabela 10 - Média da quantidade absolutas de neutrófilos dos grupos GC-, GC+ e GT nos dias 4, 7, 11 e 14.....	54
Tabela 11 - Quantidade absoluta de macrófagos dos grupos GC-, GC+ e GT nos dias 4, 7, 11 e 14.....	54
Tabela 12 - Média da quantidade absolutas de linfócitos dos grupos GC-, GC+ e GT nos dias 4, 7, 11 e 14.....	54
Tabela 13 - Média da quantidade absolutas de fibroblastos dos grupos GC-, GC+ e GT nos dias 4, 7, 11 e 14.....	55
Tabela 14. Média da área total da imuno-histoquímica que reagiu ao fator VIII em micrometros quadrados, dos grupos GC-, GC+ e GT nos dias 4, 7, 11 e 14.....	56

LISTA DE ABREVIações

CB – Celulose bacteriana

CV – Celulose vegetal

EGF - Fator de crescimento epidérmico

FGF - Fator de crescimento derivado de fibroblastos

GC- - Grupo controle negativo

GC+ - Grupo controle positivo

GT – Grupo tratamento

HGF - Fatores de crescimento de hepatócitos

IL 1 – Interleucina 1

IL13 – Interleucina 13

KGF - Fator de crescimento dos queratinócitos

MCB – Membrana de celulose bacteriana

MCV – Membrana de celulose vegetal

MEC – Matriz extracelular

PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas

pH – Potencial de hidrogênio

PPARs - Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma

TGF- α – Fator de crescimento transformador alfa

TGF- β - Fator de crescimento transformador beta

VEGF - Fator de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	20
1. REVISÃO LITERÁRIA.....	20
1.1. Pele.....	20
1.2. Cicatrização cutânea.....	21
2.Cicatrização.....	22
2.1 Fase inflamatória.....	22
2.2. Fase proliferativa.....	23
2.3. Remodelamento.....	25
3. MEMBRANAS BIOATIVAS A BASE DE CELULOSE	26
3.1. Celulose.....	26
3.2. Curativos passivos e membranas bioativas	26
3.3. Celulose bacteriana.....	27
3.4. Celulose vegetal.....	29
4. OBJETIVOS.....	29
4.1. Objetivos gerais.....	29
4.2. Objetivos específicos.....	30
4.3. Hipóteses.....	30
CAPÍTULO 2.....	37
1. INTRODUÇÃO.....	37
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
2.1 Membrana de celulose vegetal e caracterização.....	39
2.2 Experimentação animal.....	40
2.3 Avaliação da retração cicatricial.....	44
2.4 Avaliação histológica.....	45
2.5 Avaliação da área de colágeno.....	46
2.6 Avaliação celular específica.....	47
2.7 Avaliação imuno-histoquímica.....	48
2.8 Análise de biocompatibilidade e biossegurança no grupo membrana subcutâneo.....	48
3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
4. RESULTADOS.....	49

4.1. Resultados da avaliação macroscópica da ferida e retração cicatricial.....	51
4.2 Avaliação histológica.....	52
4.3 Avaliação qualitativa e quantitativa do colágeno.....	54
4.4 Avaliação celular específica.....	55
4.5 Imuno-histoquímica expressão do fator VIII.....	56
4.7 Análise de biocompatibilidade e biossegurança.....	57
5. DISCUSSÃO.....	58
6. CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS.....	65
ANEXO.....	70

CAPÍTULO 1

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 PELE

A pele constitui o maior órgão presente no organismo dos mamíferos, correspondendo por aproximadamente 16% de todo seu peso. Anatomicamente a pele é dividida em epiderme, derme e hipoderme, região também conhecida como subcutâneo. A pele possui várias funções, entre outras destacam-se: 1) ser a primeira barreira de proteção contra agressões físicas, mecânicas e infecciosas; 2) impedir a desidratação e efeitos nocivos de raios ultravioletas; 3) termorregulação como na sudorese e 4) nutricional como na síntese de vitamina D.

Por ser constantemente agredida, a pele necessita de rápida reparação e substituição dos tecidos lesionados para poder desempenhar seu papel com eficiência (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013; CHEONG e MACGRATH, 2017).

A epiderme é constituída principalmente por epitélio pavimentoso estratificado corneificado ou queratinizado e dividida histologicamente nos estratos: basal, espinhoso, lúcido, granuloso e córneo (ZACHARY e MACGAVIN, 2012). O estrato córneo é caracterizado pela presença de várias camadas de células queratinizadas e achatadas denominadas corneócitos. Abaixo do estrato córneo está localizado o estrato granuloso, porção caracterizada pela presença de grânulos cerato-hialinos biofílicos celulares (PAUL e SHARMA, 2015). O estrato espinhoso é formado por células de formato cuboides achatados, unidas entre si por desmossomos, as pontes de Schultz, e caracterizadas por apresentar o citoplasma repleto por filamentos de queratina. O estrato basal é a porção mais interna da epiderme, é a área responsável principalmente pela constante renovação da pele pois apresenta grande quantidade de células-tronco e intensa atividade mitótica (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013).

A derme é uma camada denominada conectiva, com função de unir a pele ao tecido subcutâneo, nesta camada estão presentes os anexos cutâneos como glândulas sebáceas e sudoríparas, folículos pilosos, vasos sanguíneos e linfáticos, feixes nervosos e grande quantidade de células, como mastócitos, linfócitos, macrófagos e polimorfonucleares como neutrófilos entre outros (JUNQUEIRA e

1 CARNEIRO, 2013). Anatomicamente a derme é dividida em duas camadas: a
2 camada papilar, que está localizada na porção superior da derme e é composta por
3 papilas de tecido conjuntivo frouxo, e a camada reticular, que está localizada abaixo
4 da papilar e é composta principalmente por tecido conjuntivo denso (PAUL e
5 SHARMA, 2015).

6 A hipoderme é a porção mais interna da pele e tem como função unir a derme
7 aos órgãos subjacentes como a camada muscular. A hipoderme é constituída
8 principalmente por tecido conjuntivo frouxo e apresenta uma variável camada de
9 tecido adiposo denominado panículo adiposo, que possui como funções a proteção
10 térmica e a reserva energética do organismo (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013; LAI-
11 CHEONG e MACGRATH, 2017).

12

13 **1.2 CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA**

14 A lesão tecidual é um processo onde há a quebra da barreira fisiológica dos
15 tecidos e início de uma ordenada cascata de eventos celulares, moleculares e
16 bioquímicos. O processo cicatricial tem como objetivo a formação de tecido com
17 estrutura e função semelhantes à pele íntegra (KURACH et al., 2015).

18 O processo cicatricial pode ocorrer por primeira ou segunda intenção. A
19 cicatrização por primeira intenção ocorre quando as bordas da ferida estão próximas
20 e bem cooptadas, fazendo com que ocorra rápida revitalização e conseqüentemente
21 cicatrização tecidual sem formação tecidual exuberante (NOVAES et al., 2014;
22 SILVA et al., 2016). A cicatrização por segunda intenção ocorre quando há grande
23 área de lesão com importante perda tecidual, não havendo tecido suficiente para
24 aproximação das bordas da ferida. Neste caso ocorre síntese de tecido conjuntivo
25 de forma aleatória e desorganizada, que retarda a migração celular e
26 conseqüentemente a formação de novo tecido com exuberante cicatriz (KURACH et
27 al., 2015).

28 Carrel (1910) descreveu o processo cicatricial pela primeira vez, dividindo-o
29 em cinco fases distintas: inflamação, proliferação celular, formação de tecido de
30 granulação, contração e remodelamento da ferida. Atualmente, destacam-se duas
31 classificações do processo cicatricial, a de Clark (2005), dividida em três fases: fase
32 inflamatória, fase proliferativa/granulação, e fase de remodelamento/maturação, e a
33 de Brassolatti et al. (2016) que classificaram o processo cicatricial em quatro fases:
34 hemostasia, inflamação, proliferação e remodelamento.

2. CICATRIZAÇÃO

2.1 FASE INFLAMATÓRIA

A fase inflamatória tem duração de aproximadamente quatro dias, é caracterizada por fenômenos vasculares e celulares, característicos de inflamação aguda como dor, rubor, calor, tumor e perda funcional (OLIVEIRA e DIAS, 2012).

Quando o tecido é lesionado, há extravasamento de sangue, que preenche a lesão com hemácias, plaquetas e fibrinogênio. O contato do sangue com as membranas celulares faz a liberação de substâncias vasoconstritoras como tromboxano A₂, serotonina e prostaglandinas, concomitantemente a ativação da cascata de coagulação, que tem como função a hemostasia. As plaquetas são ativadas pelo contato com a matriz extracelular e se agregam as trombinas e ao colágeno para formar o coágulo, que age como tampão na contenção da hemorragia local, auxilia como matriz provisória para a migração celular, atua como reservatório de fatores de crescimento e protege a ferida da invasão de possíveis patógenos do meio externo (TAZIMA et al., 2008; OLIVEIRA e DIAS, 2012).

Ao mesmo tempo que participam da hemostasia, as plaquetas liberam inúmeros mediadores químicos. Após serem degranuladas pela trombina, as plaquetas liberam: fator de crescimento transformador beta (TGF- β), fator de crescimento transformador alfa (TGF- α), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento derivado de fibroblastos (FGF), fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (Quadro 1). Todas essas substâncias estimulam o aumento da permeabilidade vascular associada à vasodilatação e migração de neutrófilos e monócitos para a ferida (MENDONÇA e COUTINHO-NETTO, 2009).

Os neutrófilos são as primeiras células a chegar ao local da lesão, tendo sua maior concentração 24 horas após a lesão. Os neutrófilos migram para ferida aderindo ao endotélio vascular mediante ligação com as selectinas, ou pela ação de proteases que agem diretamente sobre o endotélio vascular. Os neutrófilos têm como funções: fagocitar microrganismos, remover restos celulares e degradar macromoléculas do sítio de lesão por meio da liberação de proteases e espécies reativas de oxigênio (LAUREANO e RODRIGUES, 2011).

1

Quadro 1. Função e origem dos fatores de crescimento da cicatrização cutânea.

Nome	Função	Origem
Fator de crescimento de transformação alfa	Proliferação de fibroblasto e quimiotaxia de neutrófilos e monócitos	Monócitos, neutrófilos e linfócitos
Fator de transformação alfa (TGF- α)	Proliferação celular	Matriz extracelular
Fator de transformação beta (TGF- β)	Plaquetas e a matriz extracelular	Proliferação fibroblástica e formação do tecido de granulação
Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)	Plaquetas	Quimiotaxia para neutrófilos, monócitos e fibroblastos
Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF)	Queratinócitos e macrófagos	Angiogênese e a proliferação de células endoteliais

Fonte: Campos et al., 2007

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

2.2 FASE PROLIFERATIVA

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

A fase proliferativa inicia-se a partir do quarto dia de lesão e estende-se durante aproximadamente dez dias. Esta fase tem como objetivo a formação de uma nova barreira (reepitelização), formação de novos vasos sanguíneos (neoangiogênese) e reestruturação da integridade da derme (fibroplastia) (SIEFERT e SARKAR, 2012).

A reepitelização tem o objetivo de reestabelecer a integridade da epiderme lesionada. Nesta fase ocorre a migração de queratinócitos, formação de novo epitélio e estruturação da membrana basal. A migração dos queratinócitos ocorre primeiramente com a alteração estrutural das células que se alongam e perdem o contato célula-célula e célula-matriz, em seguida há retração dos filamentos intracelulares e formação dos filamentos de actina. A migração é estimulada principalmente pelos receptores de integrinas presentes nos queratinócitos, pela

1 metaloproteinases produzidas pelos próprios queratinócitos em migração e pela
2 matriz provisória (LAUREANO e RODRIGUES, 2011).

3 Após a migração, a reepitelização ocorre pela ligação das células ao
4 substrato presente na matriz, e pela presença de fatores de crescimento de
5 hepatócitos (HGF), fator de crescimento dos queratinócitos (KGF) e pelos receptores
6 ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) associados a presença de
7 campo elétrico sobre a ferida, originada pelas moléculas de sinalização celular
8 (BROUGHTON et al., 2006; RAINKE e SORG, 2012).

9 Os fatores de crescimento dos hepatócitos atuam na proliferação de
10 queratinócitos, enquanto as citocinas pró-inflamatórias estimulam as PPARs, que
11 diminuem a apoptose local e estimulam os queratinócitos. O campo elétrico atua
12 sobre os queratinócitos fazendo com que os mesmos se dirijam para as margens da
13 ferida onde ocorre a maior diferenciação celular (BROUGHTON et al., 2006;
14 OLIVEIRA e DIAS, 2012).

15 A neoangiogênese é essencial para o processo cicatricial, que depende de
16 adequado suprimento de oxigênio e nutrientes. A formação de novos vasos
17 sanguíneos é estimulada principalmente por macrófagos que secretam VEGF,
18 principalmente em locais onde há baixa pressão de oxigênio e pH ácido (SIEFERT e
19 SARKAR, 2012). A ativação das citocinas que influenciam a neoangiogênese fazem
20 com que ocorra a clivagem do plasminogênio e da pró-colagenase em plasmina e
21 colagenase, substâncias que têm como função a degradação dos capilares para
22 serem preenchidos por células endoteliais da derme adjacente a ferida, desta
23 maneira ocorre o crescimento da rede capilar sobre o tecido de granulação livre,
24 formando o plexo capilar superficial e eficiente (ZACHARY e MCGAVIN, 2012).

25 A fibroplasia é caracterizada pela ação e proliferação dos fibroblastos e
26 consequente síntese de colágeno. A migração fibroblástica ocorre pela atuação das
27 quimiocinas FGF, TGF- β , PDGF, IL-13 e PDGF que faz com que os fibroblastos
28 saiam do estado de quiescência e migrem para a ferida e sua proliferação é
29 mediada pelos fatores de crescimento PDGF, EGF, TGF- β , FGF e as citocinas IL-1 e
30 TNF (KUMAR et al., 2015). O TGF- β e o PDGF estimulam a diferenciação dos
31 fibroblastos em miofibroblastos, células com grande capacidade de contração,
32 expansão e movimentação pela ferida e com função de retração das bordas da
33 ferida (KIERSZENBAUM, 2004; QING, 2017).

1 O colágeno é a proteína mais abundante no tecido conectivo durante a
2 cicatrização. Sua deposição confere à ferida a resistência necessária para que não
3 haja novas rupturas do tecido cutâneo. Primeiramente ocorre deposição de grande
4 quantidade de colágeno tipo III, secretada pelos fibroblastos, que ocorre de maneira
5 desorganizada e aleatória seguindo as orientações da fibronectina. Com a evolução
6 do processo cicatricial o colágeno desorganizado é digerido pela ação da
7 colagenase e resintetizado na forma de colágeno tipo I, obedecendo a organização
8 das fibras do tecido conjuntivo, provendo à ferida grande resistência mecânica
9 (CAMPOS et al., 200; OLIVEIRA e DIAS, 2012).

10 O colágeno é uma proteína de alto peso molecular, composta principalmente
11 por glicina, prolina, hidroxiprolina, lisina e hidroxilisina. Organizado em longas
12 cadeias de três feixes polipeptídicos em forma de hélice, esse arranjo confere ao
13 colágeno grande força tênsil, sendo esta sua principal função na cicatriz. Na derme
14 existem duas formas de colágeno, os tipos I e III, que correspondem a 80% e 20%
15 respectivamente do total dessa proteína. Na ferida há maior quantidade de colágeno
16 tipo III, de feixes finos e desorganizados que atuam junto aos miofibroblastos na
17 contração da ferida. O término desta fase é caracterizado pelo início da formação do
18 tecido de granulação (CAMPOS et al., 2007; OLIVEIRA e DIAS, 2012).

20 **2.3 REMODELAMENTO**

21 A fase de remodelamento é caracterizada pela diminuição da atividade
22 celular e vascular e deposição e organização do colágeno associado a deposição de
23 novos elementos na matriz extracelular (MEC). Inicialmente, ocorre deposição de
24 fibronectina, colágeno, ácido hialurônico e proteoglicanos na derme. No tecido de
25 granulação o colágeno tipo III vai sendo substituído por fibras largas e organizadas
26 de colágeno tipo I, mais resistente em relação às do tipo III, em um lento processo
27 que pode se estender por anos. Com aproximadamente um mês após a lesão, a
28 força tênsil da cicatriz corresponde a aproximadamente 40% da pele íntegra, após
29 um ano a força tênsil pode chegar a 70%. Essa substituição ocorre pela secreção de
30 colagenases de fibroblastos e leucócitos. O processo cicatricial é efetivo quando há
31 maior deposição da nova matriz no sítio de lesão, porém a força tênsil jamais
32 retornará a 100%, atingindo aproximadamente 80% da força original após um ano de
33 lesão (SINGH et al., 2017).

3 MEMBRAMAS BIOATIVAS À BASE DE CELULOSE

3.1 CELULOSE

Nos últimos anos polímeros naturais têm despertado grande interesse médico por apresentarem propriedades superiores aos polímeros sintéticos. Por estarem naturalmente presentes em organismos vivos, polímeros naturais como quitosana, amido, colágeno e celulose vêm sendo amplamente utilizados na biomedicina, por apresentarem boas propriedades adaptativas aos tecidos onde são aplicados com mínima reação e boa integração (RAJWADE et al., 2015).

A celulose é um dos biopolímeros mais abundantes e são encontrados na natureza em plantas, madeira, algodão e em derivados vegetais. A celulose foi descrita pela primeira vez pelo químico francês Ansolme Payen em 1838. A celulose é composta por cadeias lineares não ramificadas, formadas por ligações β -1,4-glicosídicas com unidade estrutural de celobiose, composta por duas moléculas de glicose (SHEYKHNAZARI et al., 2011).

3.2 CURATIVOS PASSIVOS E MEMBRANAS BIOATIVAS

Com o envelhecimento da população humana e o grande aumento de doenças crônicas como diabetes, os gastos com o tratamento de feridas crônicas têm aumentado significativamente. Nos Estados Unidos por exemplo, estima-se gastos anuais de aproximadamente 50 bilhões de dólares, afetando cerca de 2% da sua população, ou seja, 6,5 milhões de pessoas (JUNG et al., 2016). No Brasil estima-se que aproximadamente 4 milhões de pessoas são acometidas por feridas crônicas sendo a diabetes a principal (SOUZA et al., 2013; CAMPOI et al., 2019).

Curativos tópicos têm sido amplamente utilizados no tratamento de ferimentos cutâneos. Materiais como gaze e algodão foram amplamente usados para promover proteção física, absorver a exsudação e prevenir a infecção bacteriana e acreditava-se ser esse o caminho para uma boa cicatrização. Com o desenvolvimento de novas tecnologias, o curativo tópico deve prover um microambiente ideal à ferida, estimulando assim, a rápida revitalização e cicatrização dos tecidos lesionados. O curativo ideal deve prover isolamento térmico e biocompatibilidade, manter a hidratação da ferida, cobrir a ferida de maneira anatômica, absorver a exsudação, permitir a troca de gases na ferida, ter fácil aplicação e evitar infecções secundárias (ABRIGO et al., 2014).

1 Van Der Pol et al. (2016) demonstraram a necessidade da pele apresentar
2 permeabilidade à água, porém, uma pele com lesão pode apresentar evaporação 20
3 vezes maior que pele íntegra, quando exposta diretamente ao ambiente e
4 apresentar maior quantidade de patógenos aprisionados na crosta, podendo levar à
5 desidratação e maior chance de infecção secundária. Winter (2006) relatou que a
6 mobilidade celular pode ser até três vezes maior em ferida com adequada
7 hidratação, quando comparada a feridas ressecadas, porém, o excesso de
8 exsudação pode resultar em maceração dos tecidos e infecções secundárias.
9 Portanto, a cicatrização ideal está diretamente relacionada à umidade balanceada
10 da ferida (McCOLL et al., 2007).

11 Há uma grande variedade de curativos que podem ser encontrados na forma
12 de gel, hidrogel, filme, esponja e compostos de polímeros sintéticos e/ou naturais
13 (MORAES et al., 2016). Objetiva-se a utilização de materiais que após implantados
14 apresentem respostas imunológicas mínimas, sendo este o principal desafio na
15 utilização de polímeros sintéticos. A utilização de curativos à base de polímeros
16 naturais tem demonstrado efeito promissor quando utilizados de maneira tópica por
17 apresentarem boa biocompatibilidade, biodegradabilidade, não interferindo de
18 maneira maléfica sobre o processo cicatricial e com o benefício de após aplicado,
19 serem gradativamente absorvidos ou descolados da ferida, restando apenas a
20 cicatriz natural e saudável (BAE et al., 2012).

21

22 **3.3 CELULOSE BACTERIANA**

23 A celulose bacteriana foi sintetizada pela primeira vez por Brown em 1886
24 com o uso da bactéria *Acetobacter xylinum*. A celulose bacteriana (CB) apresenta
25 eficiente arranjo espacial em 3D, o que dá a ela características físicas únicas (UI-
26 ISLAM et al., 2012). A celulose bacteriana apresenta uma rede de nanofibrilas
27 dispostas de maneira aleatória, livres de lignina e hemicelulose, com porosidades
28 com diâmetro entre 1,0 e 3,5 µm e uma rede molecular com forte interação entre os
29 grupos hidroxila e pontes de hidrogênio, que permite a confecção de finas folhas de
30 celulose com grande resistência mecânica, grande área de superfície e alta
31 porosidade, cristalinidade, flexibilidade, propriedades hidrofílicas, permeabilidade a
32 gases e biocompatibilidade aos tecidos vivos com boa adesão celular (SHAH et al.,
33 2013). Por apresentar características únicas, a celulose bacteriana vem sendo
34 amplamente utilizada em áreas da biomedicina como na produção de pele artificial,

1 vasos sanguíneos artificiais, curativos tópicos em casos de queimaduras e em
2 úlceras crônicas (KUCINSKA-LIPKA et al., 2015).

3 O primeiro relato de membrana de CB como curativo tópico foi realizado por
4 Fontana et al. (1990). Desde então, de forma gradativa, as membranas de CB veem
5 sendo utilizadas em lesões abrasivas, úlceras de pressão, queimaduras, lesões
6 vasculares isquêmicas, feridas diabéticas, e em locais doadores de enxertos
7 cutâneos entre outros usos (KOWALSKA-LUDWICKA et al., 2013).

8 As membranas podem reduzir o potencial de contaminação se nelas forem
9 incorporados princípios ativos como antibióticos, antissépticos, anti-inflamatórios e
10 fitoterápicos como a calêndula, entre outras substâncias, que vão sendo liberadas
11 gradativamente na ferida. O uso de tais princípios pode inclusive acelerar a
12 cicatrização (BARUD et al., 2013).

13 Legeza et al. (2004) impregnaram à membrana superóxido de dismutase para
14 utilização em pacientes com queimaduras, tendo como resultado menor tempo de
15 cicatrização.

16 Chiechanska (2004) e Czaja et al. (2007) demonstraram que a membrana de
17 CB associada à quitosana apresenta propriedade de liberação lenta da água da
18 membrana, evitando desta maneira o ressecamento da ferida durante o processo
19 cicatricial e Lin et al. (2013) demonstraram que a mesma associação apresentou
20 menor tempo de cicatrização em feridas cutâneas em ratos, quando comparada a
21 membranas de CB pura.

22 Saibuatong e Phisalaphong (2010) incorporaram gel de Aloe vera 30% à
23 membrana e obtiveram maior resistência, cristalinidade, permeabilidade ao vapor e
24 capacidade de absorção de água da membrana em comparação à membrana de CB
25 pura.

26 Barud et al. (2013) sintetizou membrana de CB associada a própolis obtendo
27 bons resultados principalmente em feridas contaminadas.

28 Os resultados clínicos associados ao menor tempo de cicatrização das feridas
29 e menor dor relatadas pelos pacientes, estão no fato da membrana prover ambiente
30 ideal para cicatrização associado a menor inflamação local (BARUD et al., 2016).

31 Por necessitar de tecnologia e grandes laboratórios, a produção e
32 manipulação dos curativos à base de CB apresentam alto custo (KUCIŃSKA-LIPKA
33 et al., 2015); por esse motivo tem-se estudado formas alternativas de obtenção de
34 celulose como a celulose de origem vegetal que está presente em grande

1 abundância e pode ser purificada em grandes quantidades por meio de processos
2 químicos.

3

4 **3.4 CELULOSE VEGETAL**

5 A celulose vegetal (CV) é um dos mais abundantes polímeros naturais
6 presentes na natureza, podendo ser obtido em madeira, plantas, resíduos da
7 agricultura e algas. Por estar presente em grande abundância, a CV pode ser
8 extraída em grandes quantidades na sua forma bruta, sendo um material
9 amplamente utilizado na medicina na forma de algodão (ABRIGO, 2014). Por
10 apresentar grande quantidade de lignina e hemicelulose, a CV precisa ser purificada
11 por meio de processos químicos e/ou mecânicos. A CV pura possui características
12 físicas e moleculares semelhantes à da CB, sendo composta por uma rede de
13 nanofibras, dando ao material rigidez e superfície lisa com diâmetro das fibras
14 inferiores a 20 nm (CHINGA-CARRASCO e SYVERUD, 2014). Essa conformação
15 permite a manipulação e a fabricação de filmes/membranas (FUKUZUMI et al.,
16 2009), hidrogéis e aerogéis hidrofílicos de alta porosidade (CHINGA-CARRASCO e
17 SYVERUD, 2014). Por ser um polímero natural, atóxico, renovável, proveniente de
18 fonte abundante e sustentável, a CV se enquadra como material economicamente
19 viável para ser utilizado como método de curativo a ser usado especialmente em
20 doenças crônicas, que são cada vez mais volumosas, a um baixo custo de produção
21 quando comparado à produção da celulose bacteriana (BASU et al., 2018). Estudo
22 realizado por NORDLI et al. (2016) demonstrou que as membranas compostas por
23 CV não apresentam toxicidade a linhagens celulares como queratinócitos e
24 fibroblastos, demonstrando o potencial deste material em curativos tópicos.

25 A CV e a CB devido à similaridade molecular, apresentam as seguintes
26 semelhanças: capacidade de absorção de exsudatos; maleabilidade; baixa resposta
27 imunogênica; permeabilidade a gases e inibição de crescimento bacteriano quando
28 associadas a alguns princípios ativos (CHINGA-CARRASCO e SYVERUD, 2014;
29 REES, 2015; POWEL, 2016).

30

31 **4 OBJETIVOS**

32 **4.1 Objetivo geral**

33 O objetivo deste estudo é avaliar a eficácia e biossegurança do emprego de
34 membranas de CV sobre a cicatrização de feridas cirúrgicas em ratos Wistar.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21

4.2 Objetivos específicos

- Observar os aspectos estruturais macro e microscópicos das feridas, após o uso de membranas de CV até sua degradação.
- Determinar o tempo de biodegradabilidade da membrana;
- Avaliar a reação imunológica local após implantação da membrana de CV no tecido subcutâneo;
- Observar se a CV é capaz de causar alterações metabólicas tóxicas (renais e hepáticas) séricas;
- Observar se durante o uso da membrana de CV há redução no tempo de cicatrização.

4.3 Hipóteses

- A membrana de CV induz melhor atividade cicatricial comparada à membrana de CB e a cicatrização espontânea;
- A membrana de CV não produz toxicidade renal ou hepática ao organismo, nem induz reação imunológica local ao implante subcutâneo;
- A membrana de CV apresenta boa degradabilidade quando aplicada de maneira cutânea;
- A membrana de CV é segura e eficaz quando utilizada em feridas cutâneas.

1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

2
3 ABRIGO, M.; MCARTHUR, S. L.; KINGSHOTT, P. Electrospun nanofibers as
4 dressings for chronic wound care: advances, challenges, and future prospects.
5 **Macromolecular Bioscience**, v14, p. 772–792, 2014.

6
7 BAE, H.; PURANIK, A. S.; GAUVIN, R.; EDALAT, F.; CARRILLO-CONDE. B.;
8 PEPPAS, N. A.; KHADEMHOSEINI, A. Building Vascular Networks. **Science**
9 **Translational Medicine**, v.14, n. 4, p. 160, 2012.

10
11 BARUD, H. S. DE ARAÚJO JÚNIOR; A. M., SASKA, S.; MESTIERI, L. B.; CAMPOS,
12 J. A. D. B.; DE FREITAS, R. M.; FERREIRA, N. U.; NASCIMENTO, A. P.; MIGUEL,
13 F. G.; VAZ, M. M. O. L. L.; BARIZON, E. A.; MARQUELE-OLIVEIRA, F.; GASPAR,
14 A. M. M.; RIBEIRO, S. J. L.; BERRETTA, A. A. Antimicrobial Brazilian propolis (EPP-
15 AF) containing biocellulose membranes as promising biomaterial for skin wound
16 healing. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1 - 10,
17 2013.

18
19 BARUD, H. G.; DA SILVA, R. R.; DA SILVA BARUD, H.; TERCJAK, A.;
20 GUTIERREZ, J.; LUSTRI, W. R.; RIBEIRO, S. J. L. A multipurpose natural and
21 renewable polymer in medical applications: Bacterial cellulose. **Carbohydrate**
22 **Polymers**, v. 153, p. 406–420, 2016.

23
24 BASU, A.; HEITZ, K.; STRØMME, M.; WELCH, K.; FERRAZ, N. Ion-crosslinked
25 wood-derived nanocellulose hydrogels with tunable antibacterial properties:
26 Candidate materials for advanced wound care applications. **Carbohydrate**
27 **Polymers**, v. 180, p. 345–350, 2018.

28
29 BRASSOLATTI, P.; BOSSINI, P. S.; OLIVEIRA, M. C. D.; KIDO, H. W.; TIM, C .R.;
30 ALMEIDA-LOPES, L. Comparative effects of two different doses of low-level laser
31 therapy on wound healing third-degree burns in rats. **Microscopy Research and**
32 **Technique**, v. 79, n.4, p. 313–320, 2016.

1 BROWN, A. J. On an acetic ferment which forms cellulose. **Journal of the Chemical**
2 **Society**, v. 49, p. 432-439, 1886.
3
4 CAMPOI, A. L. M.; ALVES, G. A.; MARTINS, L. C. N.; BARBOSA, L. B.;
5 FELICIDADE, P. J.; FERREIRA, L. A. Assistência de enfermagem a pacientes com
6 feridas crônicas: um relato de experiência. **REFACS**, v. 7, n. 2, p. 248-255, 2018.
7
8 CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Wound healing. **Arquivo**
9 **Brasileiro de Cirurgia Digestiva**, v. 20, n.1, p. 51–58, 2007.
10
11 CARREL, A. The treatment of wounds. **Journal of the America Medical**
12 **Association**, v. 55, p. 2148, 1910.
13
14 CHINGA-CARRASCO, G.; SYVERUD, K. Pretreatment-dependent surface chemistry
15 of wood nanocellulose for pH-sensitive hydrogels. **Journal of Biomaterials**
16 **Applications**, v. 29, n. 3, p. 423-432, 2014.
17
18 CLARK, R. A. F. Wound repair. In: Kumar, Robbins, Cotran: **Pathologic Basis of**
19 **Disease**, 7th ed., Ed. Saunders, p.112, 2005.
20
21 CZAJA, W.; YOUNG, D. J.; KAWECKI, M.; BROWN, J. R. M. The future prospects of
22 microbial cellulose in biomedical applications. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 1-12,
23 2007.
24
25 FONTANA, J. D.; DE SOUZA, A. M.; FONTANA, C. K.; TORRIANI, I. L.;
26 MORESCHI, J. C.; GALLOTTI, B. J.; DE SOUZA, S. J.; NARCISCO, G. P.;
27 BICHARA, J. A.; FARAH, L. F. Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin
28 substitute. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 24, p. 253-264, 1990.
29
30 FUKUZUMI, H.; SAITO, T.; IWATA, T.; KUMAMOTO, Y.; ISOGAI, A. Transparent
31 and high gas barrier films of cellulose nanofibers prepared by TEMPO-mediated
32 oxidation. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 1, p. 162–165, 2009.
33

1 JUNG, K.; COVINGTON, S.; SEN, S. K.; JANUSZYK, M.; KIRSNER, R. S.;
2 GURTNER, G. C.; SHAH, N. H. Rapid identification of slow healing wounds. **Wound**
3 **Repair & Regeneration**, v. 24, n.1, p. 181-188, 2016.
4
5 JUNQUEIRA L., CARNEIRO J. **Histologia Básica** – texto e atlas. 12º ed. Rio de
6 Janeiro: Guanabara Koogan; 2013. 527 p.
7
8 KIERSZENBAUM, K. L. **Histologia e biologia celular: uma introdução à**
9 **patologia**. 3a. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil; 2004. 720 p.
10
11 KOWALSKA-LUDWICKA, K.; CALA, J.; GROBELSKI, B.; SYGUT, D.; JESIONEK-
12 KUPNICKA, D.; KOLODZIEJCZYK, M.; BIELECKI, S.; PASIEKA, Z. Modified
13 bacterial cellulose tubes for regeneration of damaged peripheral nerves. **Archives of**
14 **Medical Science**, v. 9, p. 527-534, 2013.
15
16 KUCIŃSKA-LIPKA, J.; GUBANSKA, I.; JANIK, H. Bacterial cellulose in the field of
17 wound healing and regenerative medicine of skin: recent trends and future
18 prospectives. **Polymer Bulletin**, v. 72, n.9, p. 527-534, 2015.
19
20 KUMAR, V.; ASTER, J. C.; ABBAS, A. ROBBINS & COTRAN. **Patologia-Bases**
21 **Patológicas das Doenças**. 9ª ed. Rio de Janeiro. Elsevier Brasil; 2015. p. 71.
22
23 KURACH, L. M.; STANLEY, B. J.; GAZZOLA, K. M.; FRITZ, M. C.; STEFICEK, B. A.;
24 HAUPTMAN J.G. The Effect of Low-Level Laser Therapy on the Healing of Open
25 Wounds in Dogs: Low-Level Laser on Open Wounds in Dogs. **Veterinary Surgery**,
26 v. 44, n.8, p. 988–989, 2015.
27
28 LAI-CHEONG, J. E.; MCGRATH, J. A. Structure and function of skin, hair and nails.
29 **Basic Science Medicine**, V. 45, n. 6, p. 347-351, 2017.
30
31 LEGEZA, V. I.; GALENKO-YAROSHEVSKII, V. P.; ZINOV'EV, E. V.; PARAMONOV,
32 B. A.; KREICHMAN, G. S.; TURKOVSKII, I. I.; GUMENYUK, E. S.; KARNOVICH, A.
33 G.; KHRIPUNOV, A. K. Effects of new wound dressings on healing of thermal burns

1 of the skin in acute radiation disease. **Bulletin of Experimental Biology and**
2 **Medicine**, v. 138, p. 311-315, 2004.

3

4 LIN, W. C.; LIEN, C. C.; YEH, H. J.; YU, C. M.; HSU, S. H. Bacterial cellulose and
5 bacterial cellulose-chitosan membranes for wound dressing applications.
6 **Carbohydrate Polymers**, v. 94, p. 603-611, 2013.

7

8 MCCOLL, D., CARTLIDGE, B.; CONNOLLY, P. Real-time monitoring of moisture
9 levels in wound dressings in vitro: an experimental study. **International Journal of**
10 **Surgery**. v. 5, p. 316–322, 2007.

11

12 MENDONÇA, R. J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização.
13 **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 84, n.3, p.257–62, 2009.

14

15 MORAES, P. R. F. S.; SASKA, S.; BARUD, H. S.; LIMA, L. R.; MARTINS, V. C. A.;
16 PLEPIS, A. M. G.; RIBEIRO, S. J. L.; GASPAR, A. M. M. Bacterial
17 Cellulose/Collagen Hydrogel for Wound Healing. **Materials Research**, v. 19, p. 106-
18 116, 2016.

19

20 NORDLI, H. R.; CHINGA-CARRASCO, G.; ROKSTAD, A. M.; PUKSTAD, B.
21 Producing ultrapure wood cellulose nanofibrils and evaluating the cytotoxicity using
22 human skin cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 150, p. 65–73, 2016.

23

24 NOVAES, R. D.; GONÇALVES, R. V.; CUPERTINO, M. C.; ARAÚJO, B. M.;
25 REZENDE, R. M.; SANTOS, E. C. The energy density of laser light differentially
26 modulates the skin morphological reorganization in a murine model of healing by
27 secondary intention. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 95, n. 2.
28 p.138–146, 2014.

29

30 OLIVEIRA, I.V.P.M.; DIAS, R.V.C. Cicatrização de feridas: fases e fatores de
31 influência. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, p.267-271, 2012.

32

33 PAUL, W.; SHARMA, C. The Anatomy and Functions of Skin. In: Advances in Wound
34 Healing Materials. **Science and Skin Engineering**. United Kingdom. p. 25–32. 2015.

1
2 POWELL, L. C.; KHAN, S.; CHINGA-CARRASCO, G.; WRIGHT, C. J.; HILL, K. E.;
3 THOMAS, D. W. An investigation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm growth on
4 novel nanocellulose fiber dressings. **Carbohydrate Polymers**, v. 137, p. 191-197,
5 2016.
6
7 QING, C. The molecular biology in wound healing & non-healing wound. **Chinese**
8 **Journal of Traumatology**, v. 20, p. 189-193, 2017.
9
10 RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M.; KUMBHAR, J. V. Applications of bacterial
11 cellulose and its composites in biomedicine. **Applied Microbiology and**
12 **Biotechnology**, v. 99, p. 2491-2511, 2015.
13
14 REES, A.; POWELL, L. C.; CHINGA-CARRASCO, G.; GETHIN, D. T.; SYVERUD,
15 K.; HILL, K. E.; THOMAS, D. W. 3D Bioprinting of carboxymethylated-periodate
16 oxidized nanocellulose constructs for wound dressing applications. **BioMed**
17 **Research International**, Article ID 925757, p.7, 2015.
18
19 SAIBUATONG, O. A.; PHISALAPHONG, M. Novo aloe vera-bacterial cellulose
20 composite film from biosynthesis. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 455-460, 2010.
21
22 SHAH, N.; UL-ISLAM, M.; KHATTAK, W. A.; PARK, J. K. Overview of bacterial
23 cellulose composites: a multipurpose advanced material. **Carbohydrate Polymers**.
24 v. 98, p. 1585–1598, 2013.
25
26 SHEYKHNAZARI, S.; TABARSA, T.; ASHORI, A.; SHAKERI, A.; GOLALIPOUR, M.
27 Bacterial synthesized cellulose nanofibers: Effects of growth times and culture
28 mediums on the structural characteristics. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 1187-
29 1191, 2011.
30
31 SIEFERT, S. A.; SARKAR, R. Matrix metalloproteinases in vascular physiology and
32 disease. **Vascular**, v.20, n.4, p. 210-216, 2012.
33

1 SILVA, V. D. U.; RODRIGUEZ, T. T.; ROCHA, I. A. R.; XAVIER, F. A, SANTOS, J.
2 N.; CURY, P. R. Laser phototherapy improves early stage of cutaneous wound
3 healing of rats under hyperlipidic diet. **Lasers in Medical Science**, v.31, n.7, p.
4 1363–870, 2016.
5
6 SINGH, S.; YOUNG, A.; MCNAUGHT, C. E. The physiology of wound healing.
7 **Surgery**, v.35, p. 9, p. 473–477, 2017.
8
9 SOUZA, D. M. S. T.; BORGES, F. R.; JULIANO, Y.; VEIGA, D. F.; FERREIRA, L. M.
10 Qualidade de vida e autoestima de pacientes com úlcera crônica. **Acta Paulista de**
11 **Enfermagem**, v. 26, n. 3, p. 283 - 288, 2013
12
13 TAZIMA, M.; VICENTE, A.; MORIYA, T. Biologia da ferida e cicatrização. **Medicina**
14 **Ribeirão Preto Online**, v. 41, n. 3, p. 259, 2008.
15
16 UL-ISLAM, M.; KHAN, T.; PARK, J. Water holding and release properties of bacterial
17 cellulose obtained by in situ and ex situ modification. **Carbohydrate Polymers**, v.
18 88, p. 596-603, 2012.
19
20 VAN DER POL, E.; MUDDE, Y. D.; COUMANS, F. A.; VAN LEEUWEN, T. G.;
21 STURK, A.; NIEUWLAND, R. Wound scabs protect regenerating tissue against
22 harmful ultraviolet radiation. **Medical Hypotheses**, v. 96, p. 39-41, 2016.
23
24 WINTER, G. D. Some factors affecting skin and wound healing. **Journal of Tissue**
25 **Viability**, v. 16, n. 2, p. 20-23, 2006.
26
27 ZACHARY, J. F.; MCGAVIN, M. D. **Bases da patologia em veterinária**. 5 ed. Rio
28 de Janeiro: Elsevier Brasil; 2012 p.85-189.
29

CAPÍTULO 2

RETRAÇÃO CICATRICIAL E ATOXIDADE DE MEMBRANAS DE NANOCELULOSE VEGETAL

1. INTRODUÇÃO

O tratamento de feridas cutâneas é descrito desde os tempos remotos. No Egito antigo eram realizados procedimentos como limpeza, aproximação de bordas bem como a utilização de unguentos e óleos sobre a lesão com objetivo de aceleração cicatricial (SISPOS et al., 2004).

O processo cicatricial é uma complexa série de eventos que envolvem a interação entre sistemas celulares e bioquímicos com o objetivo de restaurar a integridade da pele (THAKARE, 2011). Atualmente na área médica há uma grande demanda por tratamentos, em que são necessários o uso de pele artificial ou membranas/curativos tópicos, para pacientes vítimas de queimaduras graves, feridas crônicas ou outras causas que necessitem de reparação cutânea extensa (ANDREAU et al., 2015).

Curativos tradicionalmente utilizados como gaze à base de algodão, quando aplicados diretamente sobre a ferida, podem aderir à lesão, o que leva ao debridamento da ferida no momento da troca de curativos, causando dor e retardo cicatricial. O curativo ideal deve possuir capacidade de absorção de exsudato, fácil aplicação, boa degradabilidade, permeabilidade a gases e boa compatibilidade ao tecido onde é aplicado não causando reação imunogênica (LAGANA e ANDERSON, 2010).

Uma grande quantidade de polímeros naturais foi utilizada para confecção de curativos tópicos. A celulose tem sido amplamente utilizada por apresentar características físicas únicas, e ainda poder ser associada a componentes que melhoram o processo cicatricial como óleos essenciais, sais de prata, antissépticos entre outros (SULAEVA et al., 2015).

A celulose é um polímero natural encontrado em grande abundância na natureza. Atualmente, é o principal composto utilizado para a produção de membranas regeneradoras porosas (SULAEVA et al., 2015). A celulose pode ser obtida por fermentação bacteriana e é caracterizada por formar-se de uma rede de

1 nanofibrilas que conferem a ela resistência mecânica, alta porosidade, capacidade
2 absorviva, cristalinidade, maleabilidade, resistência térmica, e por esse motivo a
3 celulose é amplamente utilizada na engenharia de tecidos (UI-ISLAM et al., 2012),
4 com bons resultados cicatriciais quando comparados aos métodos convencionais de
5 curativos (FU et al., 2012). Além de prover ambiente favorável à cicatrização, a
6 celulose bacteriana permite a incorporação de princípios ativos como gel de Aloe
7 vera (SAIBUATONG e PHISALAPHONG, 2010), quitosana e alginato (CHANG e
8 CHEN, 2016), antibióticos (VOLOVA et al., 2018), partículas de prata (TABAIL e
9 EMTIAZI, 2018) entre outros, com o objetivo de potencializar o efeito cicatricial e
10 reduzir as possibilidades de complicações secundárias de uma ferida. No entanto,
11 devido ao alto custo e ao grande tempo de produção necessários para obtenção da
12 celulose bacteriana (CB), outras fontes de celulose têm sido estudadas, sendo a
13 celulose vegetal (CV) uma boa opção por ser uma fonte renovável e com grande
14 disponibilidade na natureza (SINGLA et al., 2017).

15 A celulose de origem vegetal é o componente orgânico mais abundante no
16 meio ambiente (TRIVEDI e FARDIM, 2019), com estimativa de produção mundial
17 anual de $7,5 \times 10^{10}$ toneladas por ano (LEGOWSKI e BONFATI, 2019).

18 A celulose de origem vegetal apresenta grande semelhança à CB, porém
19 para ser obtida na sua forma pura, sem a presença de hemicelulose, pectina, e
20 outras impurezas, são necessários processos químicos de purificação. Na forma
21 pura a CV apresenta uma conformação tridimensional de nanofibrilas e propriedades
22 semelhantes à CB como características hidrofílicas, maleabilidade, porosidade, e
23 possibilidade de ser fabricada na forma de filme, gel e hidrogel. A CV não apresenta
24 toxicidade às linhagens celulares cutâneas (NORDLI, 2016), apresenta bons
25 resultados no auxílio a cicatrização de feridas cutâneas (CHINGA-CARRASCO e
26 SYVERUD, 2014), apresenta efeitos inibitórios no crescimento bacteriano (POWELL
27 et al., 2016) e suporta incorporação de princípios ativos como alginato (DORADO,
28 2019) e óleo essencial de calêndula (MASSA, 2018).

29 O termo nanocelulose refere-se a componentes com escala de tamanho
30 nanométrica (LENGOWSKI, 2019), com fibras com tamanho inferior a 100 nm. Essa
31 estrutura confere ao material características de maior densidade, maior área de
32 contato, maior resistência e rigidez quando comparada à fibra de celulose íntegra.

33

1 O presente estudo teve como objetivo investigar a atividade de retração cicatricial
2 cutânea *in vivo* e a segurança ao uso tópico e interno de uma membrana de
3 nanocelulose vegetal.

4 5 **2. MATERIAL E MÉTODOS**

6 7 **2.1 MEMBRANA DE NANOCELULOSE E CARACTERIZAÇÃO**

8 A membrana de nanocelulose vegetal foi desenvolvida e produzida no
9 Laboratório da Madeira da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
10 (EMBRAPA FLORESTA, local ?), tendo como fonte de celulose o pinheiro *Pinus sp.*
11 A membrana de nanocelulose vegetal foi produzida por Claro (2017), que utilizou a
12 polpa branqueada da madeira do *Pinus sp*, obtida pelo processo Kraft. O processo
13 consistiu na homogeneização do material em liquidificador laboratorial para
14 formação de pasta com 3% de base seca que foi centrifugada em moinho (modelo
15 Super Masscoloider Masuko Sangyo), sob rotação de 1500 rpm e 20 passes para a
16 formação da suspensão em gel de nanofibrilas de celulose (Figura 1).



18
19 Figura 1. Imagem fotográfica do moinho Masscoloider Masuko Sangyo (A), em funcionamento (B), e
20 do disco de pedra rotativo necessário para o preparo de celulose nanofibrilada (C). Fonte: Claro,
21 2017.

22
23 Para a produção de membranas na gramatura de 20 a 60 g/m², foram
24 considerados 0,0294 m² de área total para cada filme. As suspensões foram diluídas
25 em água destilada de até 3 x 10⁻³ g.mL⁻¹, seguidas de agitação por
26 aproximadamente um minuto para completar a homogeneização. Logo após, foi
27 realizada a filtração da suspensão em membrana de nylon de 22 µm em peneira de

1 60 mesh e prensada com placa de vidro, que foi submetida a temperatura de 60°C
2 por 24 horas.

3 A membrana foi caracterizada por microscopia eletrônica (Figura 2); análise
4 térmica por termogravimetria para avaliação da resistência da membrana quando
5 exposta a altas temperatura, resistência mecânica com auxílio de um dinamômetro,
6 por ensaio a tração e arrebentamento; espessura por micrometria; capacidade
7 absorviva pelo método de Cobb e permeabilidade de gases pelo método de Gurley,
8 sendo todos os testes realizados no Laboratório de Polpa e Papel da Universidade
9 Federal do Paraná e descritos na Tabela 1.

10

11 Tabela 1 - Testes físicos da membrana-base de celulose vegetal.

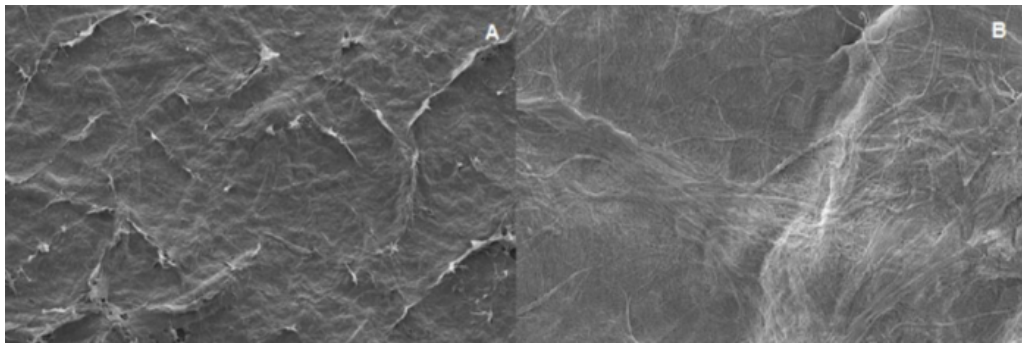
Espessura (μm)	Gramatura (g.m^{-2})	Resistência à tração (MPa)	Degradação térmica (TGA)	Cobb (g.m^{-2})	Gurley (s.100 cm^3)
45 ± 3	40 ± 2	47 ± 6	284 a 382 °C	63 ± 9	0

12 Fonte: Claro, 2017.

13

14 A análise morfológica da membrana foi realizada por meio de microscopia por
15 varredura. As imagens demonstraram que a membrana apresenta superfície
16 uniforme, não porosa e compacta (Figura 2).

17



18

19 Figura 2 – Microscopia eletrônica do filme de nanocelulose de Pinus sp. (membrana base). Aumento
20 de 500x (A), e aumento de 10.000x (B).

21 Fonte: Claro, 2017.

22

23 2.2 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

24 O experimento foi realizado após a aprovação do Comitê de Ética em Uso de
25 Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) sob o
26 protocolo 01117 (Anexo 1). Todos os procedimentos anestésicos e cirúrgicos foram
27 realizados por médicos veterinários no laboratório de técnica operatória da PUCPR.

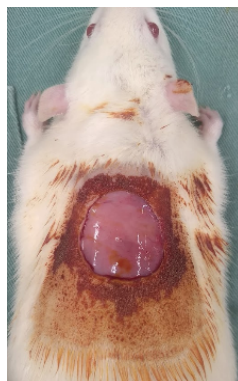
1 Foram utilizados 117 ratos Wistar, machos, com 6 a 8 semanas de idade e
2 peso de aproximadamente 300g, provenientes do biotério da PUCPR. Os animais
3 foram mantidos em ambiente com temperatura e luminosidade controlados, em
4 gaiolas individuais, forradas com maravalha que era trocada diariamente e com
5 fornecimento de água e ração apropriada *ad libitum*.

6 A identificação de cada animal foi realizada por crachás e os grupos foram
7 identificados com cores de crachás distintas. As únicas pessoas com acesso aos
8 animais eram os envolvidos no experimento e os funcionários do biotério.

9 As feridas cirúrgicas foram induzidas por procedimento cirúrgico antecedido
10 por anestesia com associação de cloridrato de cetamina 10% na dose 60mg/kg e
11 cloridrato de xilazina 2% na dose 8mg/kg, administrados por via intramuscular. Após
12 ampla tricotomia envolvendo toda região dorsal do animal, foi realizada antissepsia
13 com iodopolividona tópico 10% (Rioquímica®). Na região cervical caudal e entre as
14 escápulas, foi produzida lesão circular, com tesoura cirúrgica, com diâmetro de 3cm
15 e área total de 7,06cm², onde foi removida pele até o limite da fáscia muscular
16 (Figura 3).

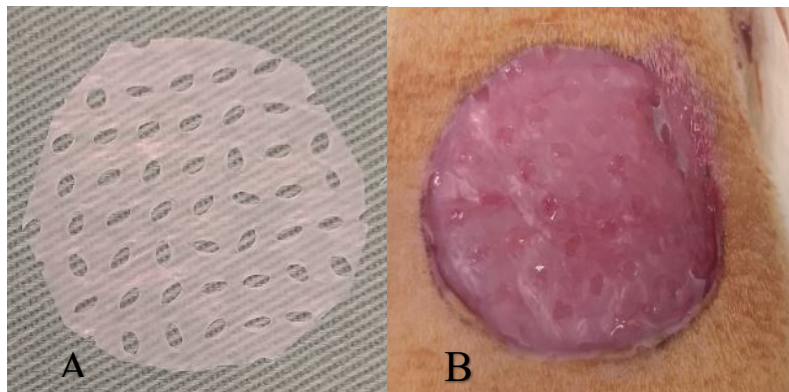
17 Antes de ser aplicada, a membrana foi esterilizada por meio do processo de
18 autoclavagem à temperatura de 120°C por período de 40 minutos, em envelope
19 próprio para esterilização.

20 Dos 117 animais avaliados, 108 foram separados aleatoriamente em três
21 grupos com 36 animais em cada. O Grupo Controle Negativo (GC-) – não recebeu
22 nenhum tratamento tópico, sendo observada a cicatrização espontânea da ferida
23 cutânea; o Grupo Controle Positivo (GC+) – recebeu a aplicação de membrana de
24 CB (MEMBRACEL®) sobre a ferida (Figura 4) e o Grupo Tratamento (GT) – recebeu
25 a aplicação de membrana de CV sobre a ferida cutânea (Figura 5).



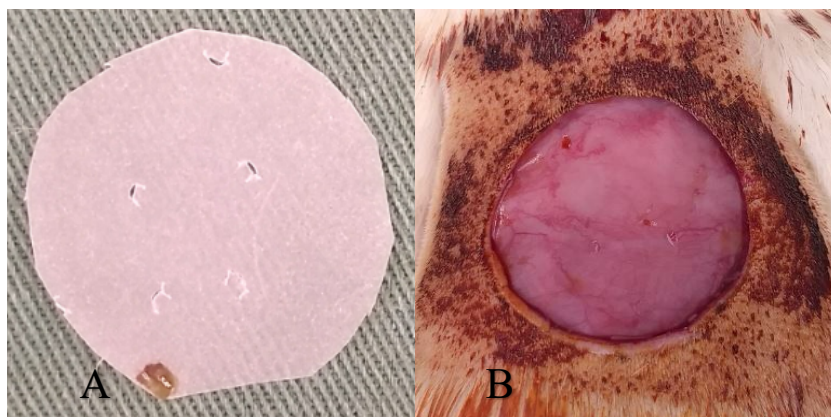
1

Figura 3. Lesão cutânea circular de 3cm de diâmetro em rato Wistar.



2
3
4
5

Figura 4. Aspecto da membrana de celulose bacteriana (Membracel®) (A). A imagem (B) refere-se a membrana aplicada sobre a lesão cutânea em rato Wistar.



6
7
8
9

Figura 5. Aspecto da membrana de celulose vegetal (A). A imagem (B) refere-se a membrana aplicada sobre a lesão cutânea em rato Wistar.

10 Outros nove animais formaram o Grupo Membrana Subcutâneo (GMS). Neles
11 foi realizada incisão em formato de L, com auxílio de um bisturi, no mesmo local da
12 lesão cutânea dos outros grupos. Logo abaixo da incisão (região subcutânea) foi
13 implantado um disco da membrana de CV com 0,5 cm de diâmetro (Figura 6). Após
14 três semanas os animais foram submetidos à eutanásia e o segmento de pele foi
15 removido para análise histopatológica. Durante três semanas, foram observadas
16 reações cutâneas quanto a eritema, dor, prurido ou granulomas cutâneos e
17 fistulização características de reação do tipo corpo estranho.

18 Após a realização dos procedimentos cirúrgicos, todos os animais foram
19 medicados com antibiótico terapia profilática com enrofloxacina na dose de 5mg/kg e
20 analgesia com cloridrato de tramadol 3mg/kg, ambos administrados por via
21 subcutânea a cada 12 horas por três dias consecutivos, e caso fosse percebido
22 mudança de comportamento como perda de apetite, desconforto local, agitação ou
23 apatia, era realizada analgesia de resgate.

1



2

3

Figura 6. Implantação do disco da membrana de celulose vegetal no tecido celular subcutâneo de rato Wistar.

4

5

6

Nos grupos GC-, GC+ e GT foi utilizado como curativo gaze estéril e faixa (atadura creponada) não compressiva ao redor do tórax, durante dois dias para permitir proteção e aderência das membranas de CB e CV sobre as feridas cutâneas. Após este período os animais foram mantidos sem curativos para as aferições das feridas em tempos distintos.

10

11

12 2.3 AVALIAÇÃO DA RETRAÇÃO CICATRICIAL

13

Todos os animais dos grupos GC-; GC+ e GT foram fotografados nos dias 4, 7, 11 e 14 dias, sendo nove de cada grupo, em cada tempo.

14

15

As imagens fotográficas serviram para a realização de medidas das áreas da lesão e cálculo da área de retração da ferida, expressa em porcentagem, pela fórmula apresentada na Figura 7. As áreas das lesões foram calculadas pelo programa IMAGE J 1.51K (Figura 8). Para realização das fotografias todos os animais foram sedados com Isoflurano (Cristália ®) em campânula, e as fotos obtidas, com o auxílio de um tripé próprio para fotografia, que mantinha a câmera a 15 cm de distância da superfície dorsal do animal. As avaliações foram às cegas, medidas em centímetros, com escala em régua, sendo a régua posicionada ao lado da ferida, na mesma distância entre a ferida e a câmera.

20

21

22

23

24

Figura 7. Fórmula utilizada para cálculo da área de retração da ferida expressa em porcentagem, onde A_0 corresponde à área inicial da ferida e A_t corresponde à área no momento da aferição.

26

27

28

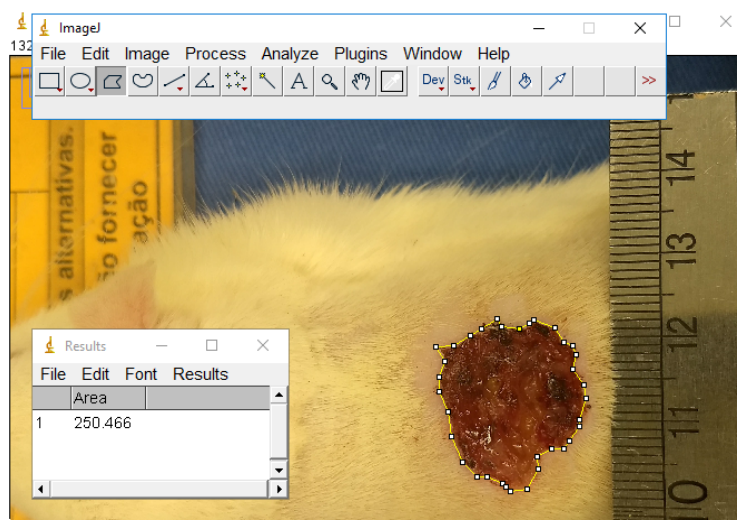
$$\text{Área de retração (\%)} = \frac{(A_0 - A_t)}{A_0} \times 100$$

29

30

Fonte: SINGLA et al., (2017).

1



2
3

4 Figura 8 – Planimetria em programa de imagem IMAGE J 1.51K, para análise da retração cicatricial
5 das feridas cutâneas em ratos Wistar.

6
7

2.4 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

8
9
10
11
12
13

Animais de todos os grupos foram submetidos à eutanásia por meio de super dosagem (5x o valor terapêutico do anestésico) da associação do cloridrato de xilazina e cetamina por via intramuscular e administração de 5mL de cloreto de potássio a 10%, por via intracardíaca. Após a remoção dos fragmentos de pele, as amostras foram mantidas em formol tamponado a 10% e encaminhadas para a análise histológica.

14
15
16
17
18
19
20
21

Para confecção das preparações histológicas as amostras foram clivadas, emblocadas em parafina e seccionadas em micrótomo (Micron HM 325- ZEISS- Brasil) rotativo com navalhas descartáveis (Leica 818 – Alemanha) com secções de 4µm de espessura. Cada amostra gerou três lâminas, as quais foram coradas com Hematoxilina e Eosina para avaliação histológica, com Tricrômio de Mallory para avaliação qualitativa e quantitativa de colágeno, e coloração de Sirius Red para análise quantitativa de colágeno tipos I e III. As análises de colágeno serviram para avaliação de sua proliferação e maturação, características da fase de fibroplasia.

22
23
24
25
26

As lâminas também foram analisadas às cegas por médico veterinário patologista, membro da Associação Brasileira de Patologia Veterinária, que desconhecia a formação dos grupos experimentais. Foram utilizados escores previamente descritos na literatura para inflamação (Quadro 1), angiogênese (Quadro 2) e fibras colágenas (Quadro 3).

27

1
2
3

Quadro 1. Descrição do escore e das características citológicas e histológicas analisadas em relação à inflamação

ESCORE	DESCRIÇÃO HISTOLÓGICA
GRAU 1	Inflamação aguda (formação da membrana piogênica).
GRAU 2	Predomínio de inflamação aguda difusa (predomínio de tecido de granulação)
GRAU 3	Predomínio de inflamação crônica (início da proliferação fibroblástica).
GRAU 4	Cicatrização (desaparecimento de sinais de inflamação com células redondas ocasionais).

4 Fonte: Cotran et al. (2000).

5
6
7

Quadro 2. Descrição do escore e das características histológicas analisadas em relação à angiogênese.

ESCORE	DESCRIÇÃO HISTOLÓGICA
Grau 1	Quantidade de neovasos menor no tecido cicatricial que vista no tecido saudável adjacente
Grau 2	Quantidade similar de neovasos em ambos os tecidos.
Grau 3	Quantidade de neovasos maior no tecido cicatricial que a observada no tecido adjacente.

8 Fonte: Garcia (2009).

9
10
11

Quadro 3. Descrição do escore e das características histológicas analisadas em relação às fibras de colágeno.

ESCORE	DESCRIÇÃO HISTOLÓGICA
GRAU 1	Discreta coloração de Tricrômio de Mallory quando comparada ao tecido saudável adjacente.
GRAU 2	Coloração de Tricrômio de Mallory com intensidade semelhante ao tecido adjacente.
GRAU 3	Coloração de Tricrômio de Mallory com intensidade maior que o tecido adjacente saudável.

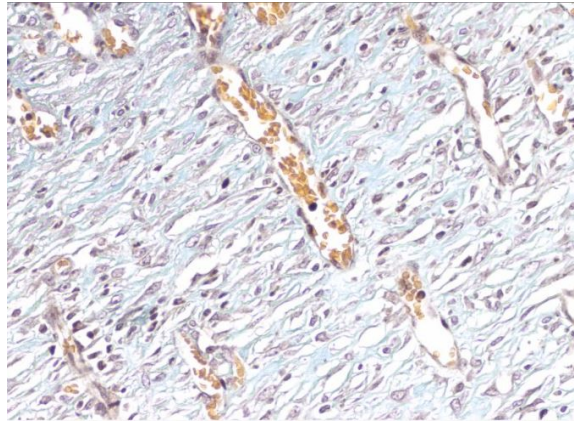
12 Fonte: Garcia (2009).

13

14 2.5 AVALIAÇÃO DA ÁREA DE COLÁGENO

15 Para quantificação da área de colágeno foram utilizadas as lâminas com
16 coloração de Tricrômio de Mallory. A área foi quantificada com o uso do programa
17 Image-Pro Plus 4.5.0.29. Por meio da marcação de cores predefinidas pelo
18 pesquisador, o programa fez a contagem de pixels da cor pré-determinada e
19 expressa a área desta cor em micrometros quadrados. A contagem da área foi
20 realizada em cinco campos microscópicos, da região subcutânea da área central da
21 ferida, observada no aumento de 20x (Figura 9).

22



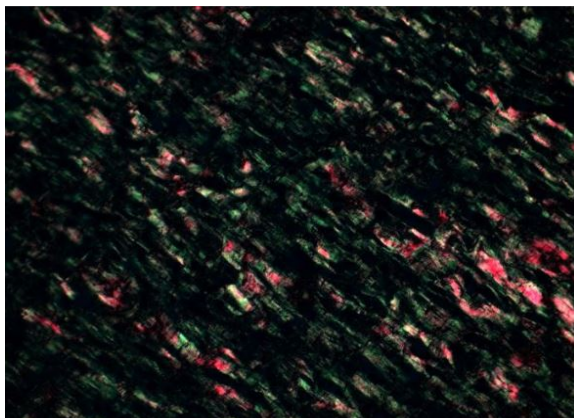
1

2 Figura 9 – Fotomicrografia de corte transversal de cicatriz cutânea em rato Wistar. Nota-se o
3 colágeno sendo corado em azul claro. Coloração Tricrômio de Mallory (Objetiva 20x).

4

5 Para fazer a diferenciação dos colágenos tipo I e tipo III nas amostras, foi
6 usada a coloração de Sirius Red; ela permite que o colágeno tipo I fique de
7 coloração vermelha sob luz polarizada, enquanto o colágeno tipo III fica de
8 coloração verde. Usando o programa Image-Pro Plus 4.5.0.29, foi possível
9 contabilizar as áreas de colágeno tipo I e tipo III nas amostras (Figura 10). A
10 contagem foi realizada em três campos distintos da região subcutânea central da
11 ferida, observada no aumento de 20x.

12



13

14 Figura 10 – Fotomicrografia de cicatriz cutânea em rato Wistar. Sob luz polarizada e coloração de
15 Sirius Red é possível observar fibras de colágeno tipo I (cor vermelha) e tipo III (cor verde). Objetiva
16 20x

17

18 **2.6 AVALIAÇÃO CELULAR ESPECÍFICA**

19 Foram contados em números absolutos o número de macrófagos, neutrófilos,
20 fibroblastos e vasos sanguíneos, em 10 campos da região abaixo da ferida, com
21 objetiva 20x, das lâminas coradas com hematoxilina e eosina.

22

23

2.7 AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

Para a montagem das lâminas para avaliação imuno-histoquímica foram coletadas as áreas centrais de oito feridas de cada grupo nos diferentes tempos, totalizando 96 amostras. As lâminas foram montadas utilizando o método de *tissue microarray* (TMA) constituídas por 20 amostras por lâminas. As amostras foram submetidas à reação de imuno-histoquímica com o anticorpo antifator VIII ou fator de Von Williebrand, um marcador com alta especificidade para tecido vascular, sendo utilizado para quantificação da proliferação vascular. Para avaliação da área corada pela reação, foi utilizado o programa Image-Pro Plus 4.5.0.29, onde os pixels da coloração característica da reação (cor marrom) foram totalizados, e os valores expressos em micrometros quadrados (Figura 11).

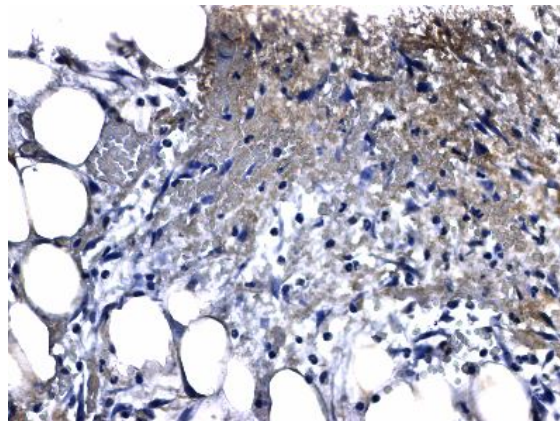


Figura 11 – Fotomicrografia de corte transversal de cicatriz cutânea em rato Wistar, submetida à reação imuno-histoquímica com antifator VIII, caracterizada pela coloração marrom. Objétiua 20x.

2.8 ANÁLISE DE BIOCOMPATIBILIDADE E BIOSSEGURANÇA NO GRUPO MEMBRANA SUBCUTÂNEO (GMS)

Após a implantação por três semanas da membrana de CV nos animais pertencentes ao Grupo Membrana Subcutâneo (GMS) (n=9), foram avaliadas macroscopicamente possíveis reações locais como: presença de eritema, prurido e presença de fistula na região do implante. Após este período de observação, todos os animais foram submetidos à eutanásia e tiveram a área onde a membrana foi implantada removida para análise histológica. A avaliação microscópica foi feita pela presença de cápsula fibrosa, neutrófilos, macrófagos, células gigantes e eosinófilos.

Em todos os animais do GMS, logo após terem sido submetidos à eutanásia, foram coletadas amostras de sangue para avaliações bioquímicas séricas da filtração renal pela ureia e creatinina, e de necrose hepatocelular e colestase, a partir

1 da avaliação de alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina,
2 respectivamente.

3

4 **3. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

5 Para a comparação das porcentagens de retração da ferida, área total de
6 colágeno, área de colágeno tipos I e III, análise da imuno-histoquímica e contagem
7 celular específica foi empregado o teste ANOVA multifatorial tipo III considerando os
8 fatores tratamento e tempo de ferida cirúrgica. Quando observadas diferenças
9 significativas nos fatores ou suas interações, foi realizada ANOVA tipo III para
10 desdobrar os fatores. Fatores com diferenças significativas foram comparados pelo
11 teste de Tukey, sempre que a homogeneidade de variância foi observada (teste de
12 Levene), caso contrário foi aplicado o teste de Bonferroni, que minimiza o erro tipo II.
13 Em todos os casos foi adotado um nível de significância de 0,05.

14 Os parâmetros inflamação, angiogênese e colágeno analisados foram
15 baseados nos escores previamente definidos e suas medianas comparadas entre os
16 grupos do mesmo tempo e tempos do mesmo tratamento, por meio do teste não
17 paramétrico de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

18

19 **4. RESULTADOS**

20

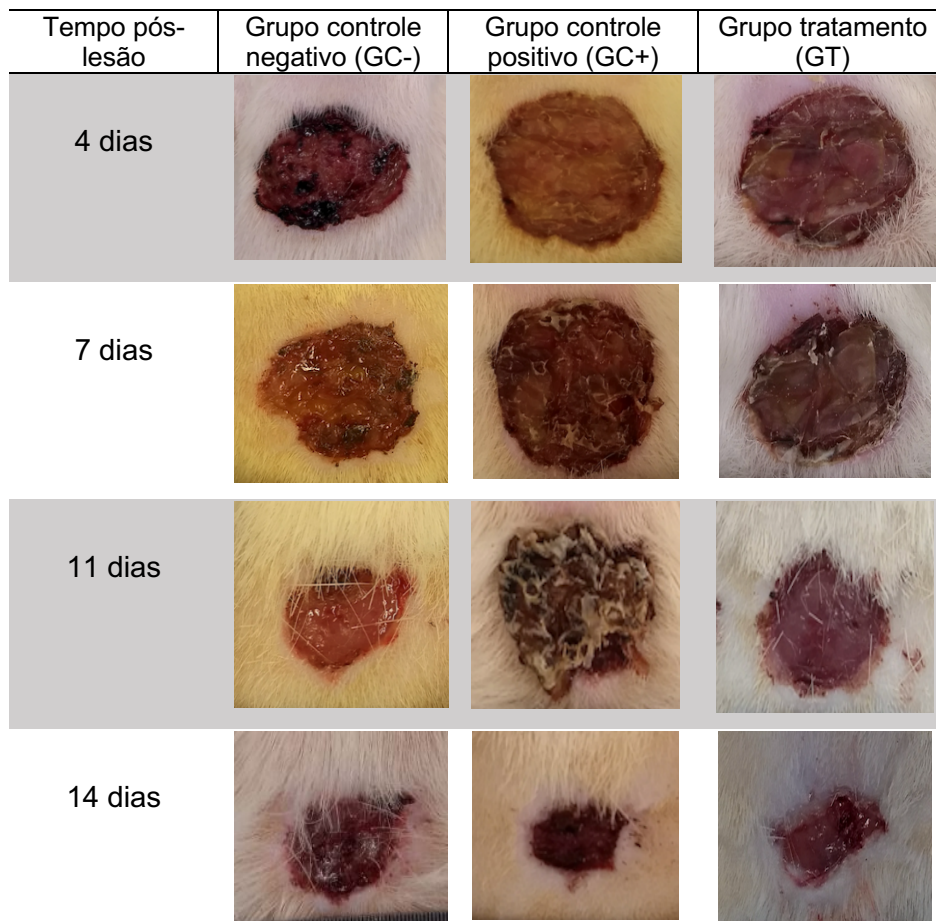
21 **4.1 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DO ASPECTO DA FERIDA E RETRAÇÃO** 22 **CICATRICIAL**

23 No grupo GC- foi observada a presença de crosta exuberante com presença
24 de exsudação até o quarto dia. Não foram observadas formações de crosta nas
25 feridas dos grupos GC+ e GT enquanto a membrana se mantinha aderida ao
26 ferimento. Após a degradação das membranas notou-se formação de crosta fina e
27 delgada. O grupo GT apresentou maior quantidade de exsudação em relação ao
28 grupo GC+. Os grupos GC- e GT apresentaram aderência da ferida nas gazes
29 utilizadas nos curativos, e foi necessário fazer o descolamento da ferida. A
30 degradação da membrana do grupo GC+ foi observada aos 11 dias após aplicação;
31 a membrana do GT manteve-se íntegra e viável até o sétimo dia (Tabela 2).

32

33

1 Tabela 2. Imagens fotográficas das cicatrizes cutâneas dos Grupos GC-, GC+ e GT em diferentes
 2 tempos de observação (dias 4, 7, 11 e 14).
 3

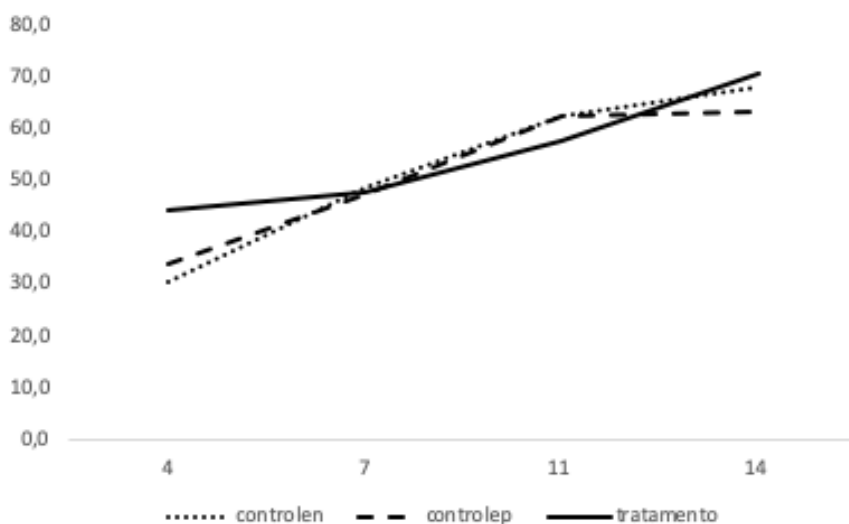


4 Os dados referentes à retração da ferida estão demonstrados na Figura 12 e
 5 na Tabela 3. Na comparação entre os grupos nos diferentes tempos o grupo GT
 6 apresentou maior retração da ferida aos 4 dias quando comparado ao grupo GC-
 7 sendo estatisticamente significativa. Na comparação dos diferentes tempos dentro de
 8 cada grupo, houve diferença estatística no grupo GC- entre os dias 4-11 e 7-14, no
 9 grupo GC+ entre os dias 7 – 11 e no grupo GT entre os dias 11 e 14.
 10

11
 12 Tabela 3 - Médias das porcentagens de retração das lesões dos grupos Grupo GC-, Grupo GC+ e
 13 Grupo GT nos dias 4, 7, 11 e 14.

GRUPOS	4 dias	7 dias	11 dias	14 dias	p
GC-	30,5±15,03 ^{aA}	49,0±18,3 ^{aAB}	62,7±19,1 ^{aBC}	63,5±19,8 ^{aB}	<0,0001
GC+	34,3±7,5 ^{abA}	47,6±11,8 ^{aA}	62,8±16,3 ^{aB}	68,2±23,3 ^{aC}	<0,0001
GT	44,6±9,1 ^{bcA}	48,0±9,9 ^{aA}	58,1±19,9 ^{aA}	70,8±17,5 ^{aB}	<0,0001
P	0,0324	0,9546	0,5637	0,3110	

14 Mediana ± desvio padrão. Valor de p da ANOVA para comparar grupos e tempos. Letras minúsculas
 15 comparam os grupos em cada tempo (análise vertical), letras maiúsculas comparam os tempos
 16 dentro de cada grupo (análise horizontal). Números azuis indicam presença de membrana de
 17 celulose bacteriana, números vermelhos indicam presença de membrana de celulose vegetal.
 18



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

Figura 12 - Porcentagem da retração cicatricial cutânea nos diferentes tempos avaliados (4, 7, 11 e 14) dos grupos GC- (controle negativo), GC+ (controle positivo – membrana de celulose bacteriana) e GT (tratamento – membrana de celulose vegetal).

4.2 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

A tabela 4 mostra os escores de inflamação. Na comparação entre os grupos nos diferentes tempos há diferença estatística aos 7 dias no grupo GT em relação aos demais, o qual demonstrou inflamação difusa com predomínio de tecido de granulação, enquanto os grupos GC- e GC+ apresentavam inflamação crônica com início da proliferação fibroblástica. Na comparação entre os tempos dentro de cada grupo, há diferença estatística do grupo GT entre os dias 4 - 7 dias, enquanto nos grupos GC- e GC+ houve diferença estatística nos dias 7 - 11, demonstrando que houve maior resposta inflamatória no grupo GT.

Tabela 4 - Medianas dos escores de inflamação dos grupos GC-, grupo GC+ e grupo GT nos dias 4, 7, 11 e 14.

GRUPOS	4 dias	7 dias	11 dias	14 dias	P (tempos)
GC-	1 ^{aA}	3 ^{aA}	3 ^{aB}	3 ^{aA}	<0,0001
GC+	1 ^{aA}	3 ^{aA}	3 ^{aB}	3 ^{aB}	<0,0001
GT	1 ^{bA}	2 ^{bB}	3 ^{aB}	3 ^{aB}	<0,0001
p (grupos)	0,1912	0,0012	0,3679	0,3679	

Mediana ± desvio padrão. Valor de p da ANOVA para comparar grupos e tempos. Letras minúsculas comparam os grupos em cada tempo (análise vertical), letras maiúsculas comparam os tempos dentro de cada grupo (análise horizontal). Números azuis indicam presença de membrana de celulose bacteriana, números vermelhos indicam presença de membrana de celulose vegetal.

A tabela 5 demonstra a avaliação de escores de angiogênese. A comparação entre os grupos nos diferentes tempos, mostra que há diferença estatística no grupo

1 GT nos dias 4 e 14, com menor número de neovasos quando comparado ao tecido
 2 adjacente. Na comparação dos tempos dentro de cada grupo, há diferença
 3 estatística entre os grupos GC+ e GT no dia 14 onde ambos apresentaram
 4 diminuição na quantidade de neovasos presente no tecido cicatricial quando
 5 comparado ao tecido saudável adjacente.

6 Tabela 5 - Medianas dos scores de angiogênese dos grupos GC-, grupo GC+ e grupo GT nos dias 4,
 7 7, 11 e 14.

GRUPOS	4 dias	7 dias	11 dias	14 dias	P (tempos)
GC-	1 ^{aA}	2 ^{aA}	2 ^{aA}	2 ^{aA}	<0,0001
GC+	1 ^{aA}	2 ^{aA}	2 ^{aA}	2 ^{aB}	<0,0001
GT	1 ^{bA}	2 ^{aA}	2 ^{aA}	2 ^{bB}	0,0004
p (grupos)	0,011	0,7540	0,5880	0,0004	

8 Mediana ± desvio padrão. Valor de p da ANOVA para comparar grupos e tempos. Letras minúsculas
 9 comparam os grupos em cada tempo (análise vertical), letras maiúsculas comparam os tempos
 10 dentro de cada grupo (análise horizontal). Números azuis indicam presença de membrana de
 11 celulose bacteriana, números vermelhos indicam presença de membrana de celulose vegetal.
 12
 13

14 A tabela 6 demonstra a avaliação de escores de colágeno. A comparação
 15 entre os grupos nos diferentes tempos não demonstrou diferença estatística. Na
 16 comparação dos tempos dentro de cada grupo, há diferença estatística aos 14 dias,
 17 demonstrando que a maturação do colágeno apresentou homogeneidade entre os
 18 grupos com colocação mais intensa, quando comparado ao tecido saudável
 19 adjacente.
 20

21 Tabela 6 - Medianas dos escores de colágeno dos grupos GC-, grupo GC+ e grupo GT nos dias 4, 7,
 22 11 e 14.

GRUPOS	4 dias	7 dias	11 dias	14 dias	p (tempos)
GC-	1 ^{aA}	1 ^{aA}	1 ^{aA}	2 ^{aB}	<0,0001
GC+	1 ^{aA}	1 ^{aA}	1 ^{aA}	2 ^{aB}	<0,0001
GT	1 ^{aA}	1 ^{aA}	1 ^{aA}	2 ^{aB}	<0,0001
p (grupos)	1,0000	1,0000	0,3388	0,2463	

23 Mediana ± desvio padrão. Valor de p da ANOVA para comparar grupos e tempos. Letras minúsculas
 24 comparam os grupos em cada tempo (análise vertical), letras maiúsculas comparam os tempos
 25 dentro de cada grupo (análise horizontal). Números azuis indicam presença de membrana de
 26 celulose bacteriana, números vermelhos indicam presença de membrana de celulose vegetal.
 27

28 4.3 AVALIAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE COLÁGENO

29 A Figura 13 ilustra a aplicação da máscara de contagem de área total de
 30 colágeno realizada pelo programa Image-Pro Plus 4.5.0.29. Na comparação entre os
 31 grupos nos diferentes tempos (Tabela 7), há diferença estatística no dia 11 entre os
 32 grupos GC- e GT. Na comparação dos tempos dentro de cada grupo, há diferença

1 estatística no grupo GC+ entre os dias 4 e 11 e no grupo GT nos dias 7 e 14, com
2 aumento significativo da área de colágeno nos períodos.

3

4 Tabela 7 - Área total de colágeno, expresso em micrometros quadrados, dos grupos GC-, grupo GC+
5 e grupo GT nos dias 4, 7, 11 e 14. Resultados expressos em média ± desvio padrão.

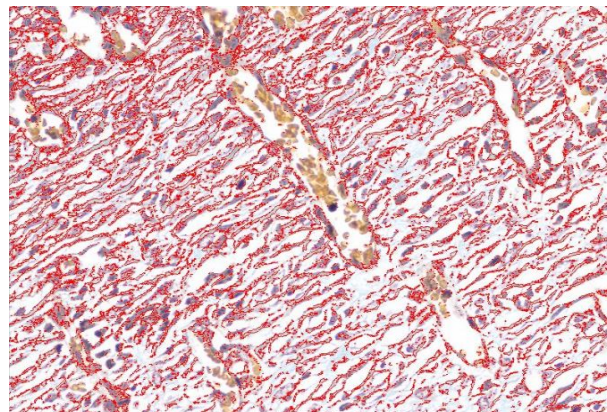
6

GRU	4 dias	7 dias	11 dias	14 dias	P (tempos)
POS					
GC-	15401,4±4417,5 ^{aa}	18560,7±7166,6 ^{aa}	18588,4±5241,6 ^{aa}	23463,9±7928,1 ^{aa}	0,1371
GC+	12653,3±1791,3 ^{aa}	18733±508,5 ^{abAB}	19281,4±4923,9 ^{abAB}	24430,1±3881,9 ^{ab}	0,0041
GT	14053,5±3313,1 ^{aa}	20151,6±1623,1 ^{ab}	23729,7±1459,9 ^{bbBC}	27358,7±1582,1 ^{ac}	<0,0001
p	0,3783	0,8674	0,1425	0,5134	

(grupos)

7 Valor de p da ANOVA para comparar grupos e tempos. Letras minúsculas comparam os grupos em
8 cada tempo (análise vertical), letras maiúsculas comparam os tempos dentro de cada grupo (análise
9 horizontal). Números azuis indicam presença de membrana de celulose bacteriana, números
10 vermelhos indicam presença de membrana de celulose vegetal.

11



12

13 Figura 13 - Fotomicrografia de corte transversal de cicatriz cutânea em rato Wistar. Nota-se os pixels
14 de coloração vermelha a serem contados pelo programa Image-Pro Plus 4.5.0.29 para definição da
15 área total de colágeno. Coloração de Tricrômio de Mallory. Objetiva 20x.

16

17 A Figura 14 demonstra a aplicação da máscara de contagem da área de
18 colágeno tipos I e III realizada pelo programa Image-Pro Plus 4.5.0.29. A tabela 8
19 demonstra as médias de área do colágeno tipo I expressas em porcentagem. Na
20 comparação entre os grupos nos diferentes tempos, há diferenças estatísticas nos
21 grupos GC- e GT aos 7 dias. Na comparação entre os tempos em cada grupo, há
22 diferença estatística entre os dias 7 - 14 no grupo GC-, no grupo GC+ entre os dias 4
23 - 7 e 7 - 11.

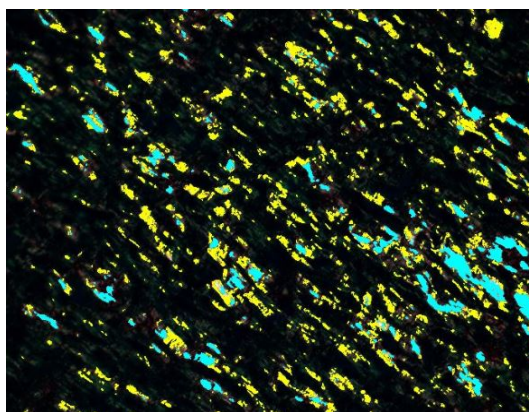
24

25

26

27

28



1
2 Figura 15 – Fotomicrografia em microscópio de luz polarizada de cicatriz cutânea em rato Wistar
3 mostra máscara aplicada pelo programa Image-Pro Plus 4.5.0.29 para contagem das áreas dos
4 diferentes tipos de colágeno, tipo I (azul) e tipo III (amarelo). Coloração Sirius red. Objetiva 20x.
5
6
7

8 Tabela 8 - Área total de colágeno tipo I, expresso em porcentagem, dos grupos GC-, grupo GC+ e
9 grupo GT nos dias 4, 7, 11 e 14. Resultados expressos em média \pm desvio padrão.

GRUPOS	4 dias	7 dias	11 dias	14 dias	p (tempo)
GC-	56,7 \pm 15,8 ^{aAB}	71,8 \pm 5,1 ^{aB}	65,4 \pm 27,9 ^{aAB}	40,2 \pm 10,5 ^{aA}	0,0305
GC+	46,6 \pm 7,9 ^{aA}	65,8 \pm 19,8 ^{abB}	52,5 \pm 20,9 ^{aA}	46,8 \pm 4,9 ^{aA}	0,1408
GT	61,2 \pm 19,9 ^{aA}	44,6 \pm 9,6 ^{bA}	38,2 \pm 24,6 ^{aA}	39,6 \pm 6,3 ^{aA}	0,1324
p (grupos)	0,2712	0,0185	0,2267	0,3052	

10 Valor de p da ANOVA para comparar grupos e tempos. Letras minúsculas comparam os grupos em
11 cada tempo (análise vertical), letras maiúsculas comparam os tempos dentro de cada grupo (análise
12 horizontal). Números azuis indicam presença de membrana de celulose bacteriana, números
13 vermelhos indicam presença de membrana de celulose vegetal.
14

15 A tabela 9 apresenta os resultados de área do colágeno tipo III, expressa em
16 porcentagem. Na comparação entre os grupos nos diferentes tempos, há diferença
17 estatística entre no grupo GT no dia 7 com maior expressão de colágeno tipo III
18 quando comparado aos outros grupos e no dia 14 no grupo GC+. Na comparação
19 entre os tempos dentro de cada grupo, há diferença estatística no grupo GC- entre
20 os dias 11 - 14, no grupo GC+ nos dias 7 - 14 e no grupo GT entre os dias 4 - 7,
21 todos com maior expressão de colágeno quando comparados ao período anterior.
22
23

24 Tabela 9 - Área total de colágeno tipo III, expresso em porcentagem, dos grupos GC-, grupo GC+ e
25 grupo GT nos dias 4, 7, 11 e 14. Resultados expressos em média \pm desvio padrão.

GRUPOS	4 dias	7 dias	11 dias	14 dias	p (tempos)
GC-	30,3 \pm 9,1 ^{aA}	32,1 \pm 7,7 ^{aA}	42 \pm 5,7 ^{aA}	79,1 \pm 5,7 ^{aB}	<0,0001
GC+	38,4 \pm 10,7 ^{aA}	36,1 \pm 17,1 ^{aA}	51,4 \pm 22,1 ^{aAB}	66,1 \pm 3,6 ^{bB}	0,0158
GT	33,2 \pm 7,8 ^{aA}	65,7 \pm 4,7 ^{bB}	64,6 \pm 22,3 ^{aB}	77,4 \pm 3,8 ^{aB}	0,0001
p (grupos)	0,3406	0,0010	0,1711	0,0012	

26 Valor de p da ANOVA para comparar grupos e tempos. Letras minúsculas comparam os grupos em
27 cada tempo (análise vertical), letras maiúsculas comparam os tempos dentro de cada grupo (análise
28 horizontal). Números azuis indicam presença de membrana de celulose bacteriana, números
29 vermelhos indicam presença de membrana de celulose vegetal.

4.4 AVALIAÇÃO CELULAR ESPECÍFICA

A contagem celular absoluta das amostras nos diferentes tempos não demonstrou diferença estatística em relação ao número total de macrófagos (tabela 10), linfócitos (tabela 11) e fibroblastos (tabela 12). Houve diferença estatística na contagem de neutrófilos (tabela 13), entre os dias 4 e 7, com aumento no número de células, e os dias 7 e 11, com diminuição no número de células, no grupo GC-.

Tabela 10 – Numero absoluto de neutrófilos dos grupos GC-, grupo GC+ e grupo GT nos dias 4, 7, 11 e 14. Resultados expressos em média \pm desvio padrão.

GRUPOS	4 dias	7 dias	11 dias	14 dias	p
GC-	78,6 \pm 68,5 ^{aa}	144,8 \pm 20,9 ^{ba}	55,5 \pm 23,1 ^{aa}	70,1 \pm 17,9 ^{aa}	0,1158
GC+	51,3 \pm 27,0 ^{aa}	49,7 \pm 24,9 ^{aa}	38,8 \pm 11,1 ^{aa}	50,0 \pm 36,8 ^{aa}	0,8063
GT	53,1 \pm 25,1 ^{aa}	50,2 \pm 19,9 ^{aa}	63,0 \pm 21,4 ^{aa}	56,1 \pm 25,4 ^{aa}	0,6790
p (grupos)	0,4306	0,0181	0,0698	0,3876	

Valor de p da ANOVA para comparar grupos e tempos. Letras minúsculas comparam os grupos em cada tempo (análise vertical), letras maiúsculas comparam os tempos dentro de cada grupo (análise horizontal). Números azuis indicam presença de membrana de celulose bacteriana, números vermelhos indicam presença de membrana de celulose vegetal.

Tabela 11 – Numero absoluto de macrófagos dos grupos GC-, grupo GC+ e grupo GT nos dias 4, 7, 11 e 14. Resultados expressos em média \pm desvio padrão.

GRUPOS	4 dias	7 dias	11 dias	14 dias	p (tempo)
GC-	29,0 \pm 6,1	38,0 \pm 15,4	34,0 \pm 19,3	27,8 \pm 9,2	
GC+	30,0 \pm 8,3	33,8 \pm 13,2	35,5 \pm 14,7	26,5 \pm 10,6	0,3668
GT	28,6 \pm 16,3	29,8 \pm 8,8	22,1 \pm 10,2	29,2 \pm 9,4	
p (grupos)		0,2596			

Valor de p da ANOVA para comparar grupos e tempos. Letras minúsculas comparam os grupos em cada tempo (análise vertical), letras maiúsculas comparam os tempos dentro de cada grupo (análise horizontal). Números azuis indicam presença de membrana de celulose bacteriana, números vermelhos indicam presença de membrana de celulose vegetal.

Tabela 12 – Numero absoluto de linfócitos dos grupos GC-, grupo GC+ e grupo GT nos dias 4, 7, 11 e 14. Resultados expressos em média \pm desvio padrão.

GRUPOS	4 dias	7 dias	11 dias	14 dias	p (tempo)
GC-	77,8 \pm 21,6 ^{aa}	106,2 \pm 87,6 ^{aa}	75,1 \pm 56,2 ^{aa}	44 \pm 16,1 ^{aa}	
GC+	51,6 \pm 20,6 ^{aa}	77,1 \pm 15,9 ^{aa}	33,5 \pm 14,7 ^{aa}	56,1 \pm 18,4 ^{aa}	0,1054
GT	60,5 \pm 16,3 ^{aa}	59,7 \pm 25,1 ^{aa}	58,4 \pm 29,3 ^{aa}	53,8 \pm 21,2 ^{aa}	
p (grupos)		0,4611			

Valor de p da ANOVA para comparar grupos e tempos. Letras minúsculas comparam os grupos em cada tempo (análise vertical), letras maiúsculas comparam os tempos dentro de cada grupo (análise horizontal). Números azuis indicam presença de membrana de celulose bacteriana, números vermelhos indicam presença de membrana de celulose vegetal.

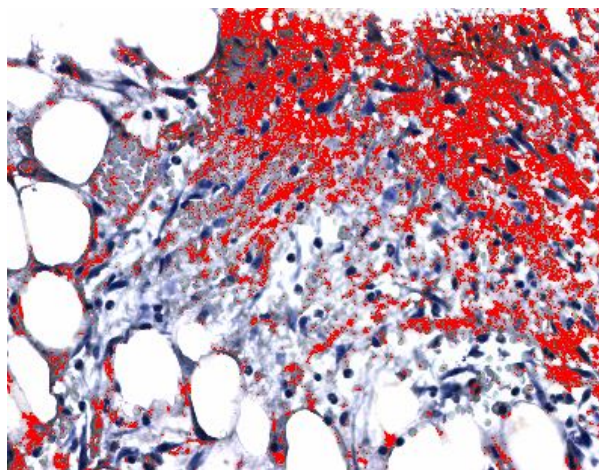
1 Tabela 13 – Número absoluto de fibroblastos dos grupos GC-, grupo GC+ e grupo GT nos dias 4, 7,
2 11 e 14. Resultados expressos em média \pm desvio padrão.

GRUPOS	4 dias	7 dias	11 dias	14 dias	p (tempo)
GC-	1266,8 \pm 379,4 ^{aa}	1586,2 \pm 278,1 ^{aa}	1515,8 \pm 590,3 ^{aa}	1581 \pm 307,4 ^{aa}	
GC+	1379,7 \pm 316,3 ^{aa}	1333,2 \pm 332,4 ^{aa}	1176 \pm 335,3 ^{aa}	1364 \pm 375,2 ^{aa}	0,4019
GT	1342,7 \pm 323,5 ^{aa}	1333,5 \pm 264,1 ^{aa}	1538,8 \pm 152,7 ^{aa}	1598,2 \pm 351,4 ^{aa}	
p (grupos)					0,1082

3 Valor de p da ANOVA para comparar grupos e tempos. Letras minúsculas comparam os grupos em
4 cada tempo (análise vertical), letras maiúsculas comparam os tempos dentro de cada grupo (análise
5 horizontal). Números azuis indicam presença de membrana de celulose bacteriana, números
6 vermelhos indicam presença de membrana de celulose vegetal.

8 4.5 IMUNO-HISTOQUIMICA DA EXPRESSÃO DE FATOR VIII

9 A imunoexpressão do fator VIII na imuno-histoquímica é apresentada pela
10 Figura 15, que demonstra a contagem de área da expressão do fator VIII
11 contabilizada pelo software e na tabela 14, as médias e desvio padrão das áreas de
12 expressão do fator VIII na comparação entre os grupos nos diferentes tempos. Na
13 comparação entre os grupos nos diferentes tempos, há diferença estatística aos 4
14 dias no grupo GC+ com menor expressão do fator de Von Williebrand em relação
15 aos demais grupos. Na comparação entre os tempos dentro de cada grupo, há
16 diferença estatística no GC- entre os dias 4 - 7 dias e 11 - 14, no grupo GC+ entre os
17 dias 4 - 7 e 11 - 14 e no grupo GT entre os dias 7-11 e 11-14.



19
20 Figura 15 – Imuno-histoquímica da expressão do fator VIII. Os pontos vermelhos mostram a
21 contagem de área imunomarcada aferida pelo programa Image-Pro Plus 4.5.0.29.

22
23
24

1 Tabela 14 - Área total da imuno-histoquímica para fator VIII em micrometros quadrados, dos grupos
2 GC-, grupo GC+ e grupo GT nos dias 4, 7, 11 e 14. Resultados expressos em média \pm desvio padrão.

GRUPOS	4 dias	7 dias	11 dias	14 dias	p (tempo)
GC-	196,2 \pm 47,2 ^{aA}	120,1 \pm 7,7 ^{aB}	125,8 \pm 5,7 ^{aB}	47,8 \pm 20,6 ^{aC}	<0,0001
GC+	63,6 \pm 10,7 ^{bB}	145,5,2 \pm 17,1 ^{aA}	174,5 \pm 22,1 ^{aA}	55,98 \pm 27,1 ^{aB}	0,0007
GT	171,1 \pm 7,8 ^{aBC}	131,7 \pm 4,7 ^{aB}	182,2 \pm 22,3 ^{aC}	47,2 \pm 19,6 ^{aA}	<0,0001
p (grupos)	0,0001	0,3764	0,2219	0,7919	

3 Valor de p da ANOVA para comparar grupos e tempos. Letras minúsculas comparam os grupos em
4 cada tempo (análise vertical), letras maiúsculas comparam os tempos dentro de cada grupo (análise
5 horizontal). Números azuis indicam presença de membrana de celulose bacteriana, números
6 vermelhos indicam presença de membrana de celulose vegetal.

7

8 **4.6 ANÁLISE DE BIOCAMPATIBILIDADE E BIOSSEGURANÇA**

9 Durante o período avaliado não foram observadas alterações macroscópicas
10 cutâneas como eritema, prurido, formação de fistula ou exsudação nos animais
11 implantados (Figura 16). Os parâmetros bioquímicos séricos encontraram-se dentro
12 da normalidade em todos os animais. As médias e desvios padrão obtidos foram:
13 ALT 60.58 \pm 14.93, FA 68.66 \pm 21.10, ureia 55.59 \pm 4.6 e creatinina 0.67 \pm 0.06. Na
14 avaliação histológica em HE foi observado granuloma com material basofílico
15 (Figura 17).

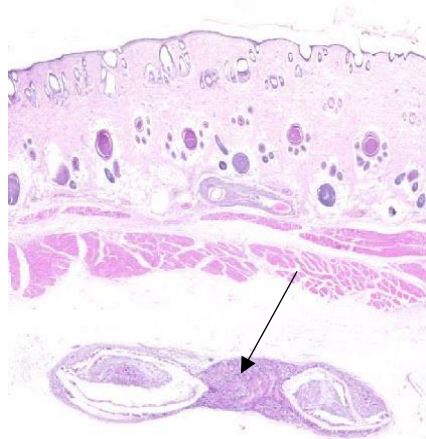
16



17

18 Figura 16 - Aspecto macroscópico da região dorsal de rato Wistar, após 21 dias da implantação de
19 disco de 0,5 cm de celulose vegetal no tecido subcutâneo.

20



1
2 Figura 17 - Fotomicrografia de granuloma encapsulado (seta) da membrana de celulose vegetal com
3 a presença de material basofílico celular implantado no tecido celular subcutâneo de rato Wistar. Na
4 porção superior nota-se presença de tecido cutâneo com as camadas da derme, epiderme,
5 hipoderme e muscular sem presença de fistulação ou reações cutâneas características de reação a
6 corpo estranho. Coloração HE. 20x
7

8 9 **5. DISCUSSÃO**

10 A membrana de CV utilizada no presente estudo, mesmo com sua fina
11 espessura e gramatura pequena, apresentou boas propriedades mecânicas,
12 conforme observado por Moon et al. (2011). Sua resistência à tração foi de 47 Mpa,
13 valor superior à de CB usada por Fu et al (2012), que observaram resistência
14 mecânica de 10.32 Mpa. Xu et al. (2016) em estudo similar, avaliaram a resistência
15 de membrana de silicone e obtiveram valor bastante inferior, de apenas 0,45 Mpa, o
16 que demonstra que a membrana de CV proporciona boa proteção a possíveis
17 traumas consecutivos ao frágil tecido de reepitelização.

18 A resistência da membrana de CV à degradação térmica foi superior às
19 temperaturas atingidas pelo processo de autoclavagem (120°C), método comumente
20 utilizado para a esterilização de materiais cirúrgicos em unidades médicas, pois é
21 simples e barato, o que facilita o seu emprego na rotina hospitalar.

22 O corte no formato desejado e aplicação sobre a superfície úmida das lesões
23 foram extremamente fáceis, sem a necessidade de hidratação prévia da membrana.
24 A superfície lisa, esteticamente uniforme e transparente foi considerada fator positivo
25 ao permitir a visualização da lesão e sua evolução sem a necessidade de remoção
26 do curativo, facilitando o acompanhamento do quadro. Mesmas características foram
27 encontradas em membranas de celulose produzidas a partir da fermentação
28 bacteriana, demonstrando a semelhança entre os materiais (ABRIGO et. al.,2014).

1 A impermeabilidade à passagem de ar e baixa absorção de água observadas
2 na membrana de CV, podem ser explicadas pela ausência de porosidade
3 evidenciada pela microscopia eletrônica, o que reduz consideravelmente a área de
4 superfície em relação ao volume do material, influenciando na maior resistência à
5 tração por aumentar a densidade e proximidade das nanofibras que compõe o
6 curativo, em detrimento da capacidade absorviva, além de servir como barreira à
7 passagem de microrganismos externos (ANDREAU et al., 2015).

8 A ausência de porosidade observada pela microscopia eletrônica na
9 membrana de CV é um importante diferencial em relação às membranas
10 sintetizadas a partir da fermentação bacteriana. A porosidade permite melhor
11 absorção da exsudação e permeabilidade a gases (QIU, 2016).

12 Estudos prévios envolvendo a eficácia de membranas de celulose em lesões
13 cutâneas iatrogênicas em ratos Wistar apresentaram tamanhos de lesão de 1cm x
14 1cm (QIU et.al. 2016), 1,5cm x 1,5cm (NAPAVICHAYANUM et.al., 2016) e 2cm x
15 2cm (LI et.al., 2015). No presente experimento foi optado pela lesão de 3cm x 3cm,
16 por esta apresentar maior desafio cicatricial, permitindo melhor avaliação da
17 formação da cicatriz e do tempo de degradação da membrana de CV comparada à
18 membrana de CB.

19 Na análise macroscópica das feridas, notou-se que no grupo GC- houve
20 formação de crosta exuberante, o que não foi constatado nas feridas dos grupos
21 GC+ e GT. Segundo Winter (2006) a crosta é formada a partir do ressecamento do
22 coágulo sanguíneo, exsudato seroso e células inflamatórias, além da exposição da
23 derme, e que quando são utilizados curativos oclusivos, como no caso da membrana
24 de CV, não há a formação da crosta, pela capacidade da membrana manter o
25 ambiente hidratado e propício à cicatrização.

26 Foi observada maior presença de exsudação nos grupos GC- e GT. No grupo
27 GC- a não utilização de nenhum método de tratamento, a não ser a gaze nos dois
28 primeiros dias, pode ser a causa do maior acúmulo de exsudação, pois uma das
29 funções da membrana é a absorção do exsudato excedente (SHAH et al., 2013). A
30 membrana de CV, por ter baixa porosidade e conseqüentemente baixa capacidade
31 de absorção e transporte de líquidos, não permitiu a passagem da exsudação da
32 ferida que seria absorvida pela gaze, além disso a membrana de CV não demonstrou
33 capacidade de absorção, levando ao maior acúmulo de líquido entre a membrana e
34 a ferida. O grupo GC+ apresentou macro e microporos mais eficientes, por onde a

1 exsudação foi absorvida pela própria membrana ou pela passagem pelos
2 macroporos, sendo que parte da exsudação foi absorvida pela gaze, não sendo
3 notado acúmulos em nenhum momento.

4 O tempo de degradação das membranas variou, a de CV ocorreu no 7° dia,
5 enquanto a de CB foi degradada no 11° dia. O grupo GT obteve a maior retração da
6 ferida no dia 4, com 44,6% de área de retração, isto demonstra que a membrana de
7 CV provê ambiente ideal para a proliferação celular, principalmente nos quatro
8 primeiros dias após sua aplicação. Os grupos GC- e GC+ apresentaram maior
9 retração da ferida aos 7 (48,9%) e 14 dias (68,2%) respectivamente, não sendo
10 estatisticamente relevante em nenhum dos períodos.

11 Segundo Singla et al. (2017) a capacidade da membrana de favorecer o
12 ambiente ideal para a ferida, como manutenção de umidade e oxigênio, migração e
13 proliferação celular e proteção física, favorecem a retração mais eficiente da ferida.
14 O maior acúmulo de líquido notado no grupo GT, foi o único acontecimento não
15 evidenciado nos outros grupos, talvez tenha promovido ambiente mais hidratado e
16 propício à proliferação celular, e conseqüentemente maior taxa de retração da ferida
17 principalmente nos primeiros quatro dias de lesão.

18 Segundo McColl et al. (2007) a retenção excessiva de fluidos na superfície da
19 ferida pode resultar em maceração dos tecidos adjacentes e predispor à maior carga
20 bacteriana, resultando em cicatrização inadequada. Com os resultados obtidos,
21 nota-se que o acúmulo de líquido de forma não excessiva na membrana do grupo
22 GT, mostrou-se benéfico para a o ambiente da ferida. Na análise estatística o único
23 grupo com retração de ferida relevante, foi o grupo GT aos 4 dias, quando foi
24 superior ao grupo GC-, sendo que nos dias 7, 11 e 14 a presença da membrana não
25 influenciou a retração da ferida, sugerindo que a membrana de CV talvez apresente
26 ótima eficiência em relação à retração cicatricial até os quatro dias de lesão. Em
27 números absolutos os grupos em que a membrana estava presente, apresentaram
28 maior retração cicatricial em relação ao grupo GC-, concordando com os estudos de
29 Li et al. (2015), Napavichayanum et al. (2016) e Yu et al. (2017).

30 A degradação da membrana do grupo GC+ aos 11 dias, e do grupo GT aos 7
31 dias, evidenciam a necessidade de troca do curativo tópico. De acordo com a bula
32 fornecida pelo laboratório Vuelo Pharma, produtor da membrana Membracel®, a
33 troca da membrana deve ser realizada a cada 7 dias, quando utilizada em feridas
34 sem contaminação e em seres humanos. Sendo assim, a membrana de CV usada

1 no presente estudo, talvez tenha o mesmo tempo de duração quando aplicada sobre
2 feridas nas mesmas condições.

3 As exsudações observadas nos grupos GC- e GT ocorreram provavelmente
4 pela não aplicação de nenhuma membrana tópica no tratamento do GC- e pela
5 baixa capacidade de absorção de líquidos da membrana do grupo GT, devido à
6 ausência de porosidade da membrana do grupo GT, levando ao acúmulo de líquido
7 entre a membrana e a ferida

8 Como o grupo GT apresentou maior retração da ferida nos primeiros quatro
9 dias, e não houve sinais de infecção ou rejeição da membrana de CV em nenhum
10 dos grupos, a presença do exsudato não influenciou negativamente o processo de
11 retração cicatricial. Segundo Yang et al. (2011) a característica hidrofílica das
12 membranas evita ressecamento da ferida, o que favorece a atividade celular
13 regenerativa, estando de acordo com o observado no presente estudo e por Li et al.
14 (2015).

15 A aderência da gaze do curativo à ferida foi ocasionada pelo ressecamento do
16 exsudato. Em nenhum caso no presente estudo houve debridamento da ferida
17 durante as trocas de curativos, o mesmo foi relatado por Fu (2012). Para evitar a
18 aderência, recomenda-se troca do curativo compressivo de gaze e atadura,
19 mantendo a membrana sobre a ferida, com frequência superior a uma vez ao dia,
20 para evitar a aderência da gaze ou da faixa que protege a ferida com a membrana
21 aplicada.

22 Os escores de inflamação demonstraram padrão de inflamação aguda no GT
23 aos 7 dias, enquanto os outros grupos já apresentavam proliferação fibroblástica.
24 Estudos prévios demonstram que o uso da membrana de CB apresenta atividade
25 anti-inflamatória, quando comparada à cicatrização espontânea de feridas, como
26 demonstrado por Qui et al. (2016) e Singla et al. (2017). Após 11 dias todos os
27 grupos apresentavam padrão histológico semelhante. A falta de porosidade na
28 membrana de CV permitiu maior acúmulo de exsudação entre a membrana e a
29 ferida, e a degradação da membrana ocorreu no mesmo período, fato que pode ter
30 auxiliado na manutenção da inflamação com padrão agudo até o sétimo dia. Outro
31 fato a se considerar foi a degradação de membrana de CV que ocorreu aos 7 dias
32 após aplicação, não fornecendo mais a ferida em suas propriedades benéficas como
33 o efeito anti-inflamatório.

1 A proliferação de colágeno em uma ferida indica grande proliferação
2 fibroblástica, associada a ótimo ambiente para cicatrização (GIL et al., 2013).
3 Quando comparamos qualitativamente os grupos, em relação a intensidade do
4 Tricrômio de Mallory, verificamos que há semelhança entre os grupos com o passar
5 do tempo e que a maturação do colágeno ocorreu de maneira semelhante. Fato que
6 não foi observado por Li et al. (2015) e Napavichayanun et.al. (2016), já que os seus
7 estudos demonstraram que as feridas tratadas com membranas a base de celulose,
8 apresentam azul mais intenso quando comparadas as do grupo controle.

9 Ao comparar quantitativamente a área total de colágeno presente nos grupos
10 nos diferentes tempos, notamos que o grupo que recebeu membranas de CV,
11 apresentou maior área de colágeno que o grupo GC- aos 11 dias de lesão. Estudos
12 realizados por Xie et al. (2013) e Masi et al. (2015) demonstraram que a expressão
13 de fatores de crescimento, como IGF, FGF (fator de crescimento fibroblástico),
14 VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular), TGF- β (fator de crescimento
15 transformador beta) no local da lesão, associada à baixa resposta inflamatória e
16 angiogênese, são os maiores responsáveis pelo aumento da proliferação de
17 colágeno. Com os resultados obtidos neste estudo notamos que o grupo GT
18 apresentou menor contagem de neutrófilos, caracterizando menor mobilização
19 celular inflamatória local, com acúmulo de exsudação e maior retração cicatricial aos
20 4 dias, sugerindo que a presença da membrana de CV até os 7 dias, proveu a ferida
21 maior acúmulo, maior produção ou manutenção dos fatores de crescimento,
22 refletindo em melhor retração cicatricial no início da cicatrização, o que
23 provavelmente levou à grande proliferação fibroblástica e grande proliferação de
24 colágeno aos 11 dias após a lesão.

25 A partir dos resultados obtidos sugere-se que a membrana de CV estimula
26 maior expressão dos fatores de crescimento na ferida, sendo essa a provável causa
27 da maior expressão de colágeno, já que o escore de angiogênese e de inflamação
28 apresentou semelhança de escores entre os grupos.

29 Segundo Medeiros e Dantas (2016) o colágeno tipo III tem grande
30 proliferação nas fases iniciais da cicatrização, com pico de produção entre 7 e 14
31 dias, sendo este fato observado no grupo GT, que apresentou maior porcentagem
32 de colágeno tipo III que os demais aos 7 dias e que grupo GC- aos 11 dias,
33 demonstrando assim maior proliferação e atividade fibroblástica no local da lesão.
34 Os demais grupos só apresentaram valores de colágeno tipo III semelhantes ao

1 grupo GT aos 14 dias de lesão, quando as membranas de celulose já haviam sido
2 degradadas nos grupos GC+ e GT. Broughton et al. (2006) descrevem que o
3 alinhamento de miofibroblastos às fibras de colágeno ocorrem por estímulo
4 principalmente dos fatores de crescimento TGF- β e PDGF (fator de crescimento
5 derivado de plaquetas), e que este alinhamento é o responsável pela contração da
6 ferida e que sua maior expressão está relacionada à maior taxa de contração, fato
7 que justifica o porquê do grupo GT ter apresentado maior contração da ferida.

8 O colágeno tipo I esteve presente em maior quantidade nos grupos GC- e
9 GC+ aos 7 dias, enquanto neste período predominou no grupo GT maior quantidade
10 de colágeno tipo III. Como esta análise foi feita em proporção da quantidade de
11 colágeno tipos I e II expressa em porcentagem, uma maior porcentagem de
12 colágeno tipo III resulta em menor porcentagem de colágeno tipo I. Segundo
13 Goldberg e Diegelmann (2010) as fibras colágenas tipo III começam a ser
14 substituídas pelas tipo I a partir dos 21 dias, não estando no intervalo de tempo
15 observada no presente trabalho.

16 A contagem total de células inflamatórias apresentou diferença estatística
17 apenas na contagem total de neutrófilos no grupo GC- no dia 7, com maior número
18 quando comparados aos outros grupos. Este maior número de neutrófilos evidencia
19 o efeito anti-inflamatório que as membranas de celulose apresentam, onde o
20 ambiente criado pelas membranas diminui a mobilização de células inflamatórias,
21 principalmente nas fases iniciais da cicatrização, corroborando estudos feitos por Fu
22 et al. (2012), Qui et al. (2014) e Xu et al. (2014) em que houve menor número de
23 células inflamatórias nas análises histológicas quando comparadas ao grupo
24 controle. Segundo Junqueira e Carneiro (2013), os neutrófilos são células
25 especializadas, que tem como função a defesa primária do organismo contra
26 patógenos, elas agem principalmente na produção e liberação de substâncias como
27 superóxidos, elastases e proteases para o meio extracelular, e estes produtos são
28 maléficos para o ambiente cicatricial, logo o menor recrutamento neutrofílico pode
29 ser considerando benéfico a cicatrização.

30 A quantificação de vasos sanguíneos realizada pela técnica de imuno-
31 histoquímica com uso do antifator VIII ou fator de Von Williebrand apresenta alta
32 especificidade para tecido vascular (WAGNER, 2002) já sendo utilizada em estudos
33 anteriores (CHIBATA et al., 2003; ALVES et al., 2006; SKINOVSKY et al., 2005). Na
34 comparação entre grupos, o grupo GC+ apresentou menor expressão de

1 proliferação vascular aos 4 dias, quando comparada aos outros grupos. Esta menor
2 expressão provavelmente se deve ao fato de que o grupo GC+ apresentou atraso
3 para chegar à fase proliferativa da cicatrização, em que há grande proliferação
4 vascular sobre o tecido de granulação em formação (SIEFERT e SAKAR, 2012). Por
5 meio dos dados obtidos podemos notar que a maior expressão de angiogênese
6 ocorre entre os dias 7 e 11, demonstrando grande diminuição aos 14 dias.

7 A reação tecidual da membrana é importante fator de análise se a membrana
8 é biocompatível ou não a um organismo. Em estudos conduzidos por Helenius et al.
9 (2005), Mendes et al. (2009) e Modulevsky et al. (2016) comprovou-se que as
10 membranas de CB são perfeitamente integradas ao organismo, mesmo fato
11 observado neste estudo com o uso de CV, pois do ponto de vista macroscópico não
12 foram observados edema, eritema, prurido ou formação de granulomas inflamatórios
13 e de fistulas por um período de 14 dias após implantação da membrana no tecido
14 celular subcutâneo dos animais. Ademais, histologicamente não foram observadas
15 presença de macrófagos, eosinófilos degranulados, cápsula fibrosa ou edema ao
16 redor da membrana implantada.

17 As análises de bioquímica sérica, em que foram avaliados parâmetros de
18 toxicidade hepatocelular e filtração glomerular, revelaram encontrarem-se todos
19 dentro dos resultados fisiológicos como o descrito por Roberto et al. (2018),
20 demonstrando que a CV não é lesiva aos rins ou ao fígado.

21 22 **6. CONCLUSÃO**

23 A membrana de celulose de origem vegetal quando utilizada de maneira
24 tópica em ratos Wistar apresenta fácil manipulação e aplicação sobre a ferida. A sua
25 utilização é segura, pois quando aplicada sobre a lesão cutânea ou quando
26 implantada no subcutâneo não causou toxicidade renal ou hepática, e nem reação
27 imunogênica induzida por corpo estranho.

28 Pode-se observar que o uso de membrana de origem vegetal impediu a
29 formação de crosta exuberante sobre a ferida, e contribuiu para a baixa mobilização
30 celular inflamatória. Além disso, permitiu proliferação de colágeno e angiogênese no
31 leito da lesão, com significativa retração cicatricial nos quatro primeiros dias após a
32 lesão. A degradação da membrana ocorreu aos sete dias, sendo necessário em
33 alguns casos a colocação de nova membrana, para que os efeitos benéficos da
34 utilização fossem prolongados.

1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

2
3 ABRIGO, M.; MCARTHUR, S. L.; KINGSSHOTT, P. Electrospun nanofibers as
4 dressing for chronic wound care: advantages, challenges, and future prospects.
5 **Advanced Healthcare Materials**, v.14, p.772-792, 2014.

6
7 ALVES, MR. Influência da nicotina, durante a gestação e lactação, na cicatrização
8 da parede abdominal de ratos lactentes: estudo tensiométrico, morfológico e
9 imunoistoquímico. Curitiba, 2006. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) - Setor de
10 Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

11
12 ANDREAU, V.; MENDOZA, G.; ARRUEBO, M.; IRUSTA, S. Smart Dressings Based
13 on Nanostructured Fibers Containing Natural Origin Antimicrobial, Anti-Inflammatory,
14 and Regenerative Compounds. **Materials**, v.8, p. 5154-5193, 2015.

15
16 BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The basic Science of wound
17 healing. **Plastic Reconstructive Surgery**, v. 117, n.7, p.12-34, 2006.

18
19 CHANG, W. S.; CHEN, H. H. Physical properties of bacterial cellulose composites for
20 wound dressings. **Food Hydrocolloids**, v.53, p. 75–83, 2016.

21
22 CHIBATA, M. Nicotina subcutânea e cicatrização da parede abdominal em ratos:
23 estudo histológico e tensiométrico. Curitiba, 2003. Dissertação (Mestrado em Clínica
24 Cirúrgica) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

25
26 CLARO, F. C. Elaboração E Caracterização De Filmes A Partir De Nanofibrilas De
27 Celulose Vegetal. Curitiba, 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência
28 dos Materiais) – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

29
30 FU, L.; ZHANG, Y.; LI, C.; WU, Z.; ZHUO, Q.; HUANG, X.; QIU, G.; ZHOU, P.;
31 YANG, G. Skin tissue repair materials from bacterial cellulose by a multilayer
32 fermentation method. **Journal of Material Chemistry**, v. 22, p. 12349-12357, 2012.

1 GIL, E. S.; PANILAITIS, B.; BELLAS, E.; KAPLAN, D. L. Functionalized silk
2 biomaterials for wound healing. **Advanced Healthcare Materials**. v.2, p.206–217,
3 2013.

4 HELENIUS, G.; BÄCKDAHL, H.; BODIN, A.; NANNMARK, U.; GATENHOLM,
5 P.; RISBERG, B. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. **Journal of**
6 **Biomedical Materials Research**, v.76, n.2, p.431-438, 2006.

7 LAGANA, G.; ANDERSON, E. H. Moisture dressings: the new standard in wound
8 care. **Journal of Nursing Practice**, v.6, p. 366–370, 2010.

9

10 LI, Y.; WANG, S.; HUANG, R.; HUANG, Z.; HU, B.; ZHENGE, W.; YANG, G.; JIANG,
11 X. American Chemical Society. Evaluation of the effect of the structure of bacterial
12 cellulose on full thickness skin wound repair on a microfluidic chip.
13 **Biomacromolecules**, v.16, n.3, p. 780–789, 2015.

14

15 LI, Z.; WANG, L.; CHEN, S.; FENG, C.; CHEN, S.; YIN, N.; YANG, J.; WANG, H.;
16 XU, Y. Facilely green synthesis of silver nanoparticles into bacterial cellulose.
17 **Cellulose**, v.22, p. 373–383, 2014.

18

19 MCCOLL, D.; CARTLIDGE, B.; CONNOLLY, P. Real-time monitoring of moisture
20 levels in wound dressings in vitro: an experimental study. **International Journal of**
21 **Surgery**. v. 5, p.316–322, 2007.

22

23 MEDEIROS, A. C.; DANTAS, A. M. Healing of surgical wounds. **Journal of Surgical**
24 **and Clinical Research**, v. 7, n. 2, p. 87 – 102, 2016.

25

26 MENDES, P. N.; RAHAL, S. C.; PEREIRA-JUNIOR, O. C. M.; FABRIS, V. E.;
27 LENHARO, S. L. R.; LIMA-NETO, J. F.; CRUZ LANDIM-ALVARENGA, F. In vivo and
28 in vitro evaluation of an *Acetobacter xylinum* synthesized microbial cellulose
29 membrane intended for guided tissue repair. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.51,
30 p.12-18, 2009.

31

1 MODULEVSKY, D. J.; CUERRIER, C. M.; PELLING, A. E. Biocompatibility of
2 Subcutaneously Implanted Plant-Derived Cellulose Biomaterials. **PLOS One**, v.11,
3 n.6, e0157894, 2016.
4
5 MOON, R. J.; MARTINI, A; NAIRN, J.; SIMONSEN, J.; YOUNGBLOOD. J. Cellulose
6 nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. **Chemical Society**
7 **Reviews**, v.40, n.7, p. 3941-94, 2011.
8
9 NAPAICHAYANUN, S.; YAMDECH, R.; ARAMWIT, P. The safety and efficacy of
10 bacterial nanocellulose wound dressing incorporating sericin and polyhexamethylene
11 biguanide: in vitro, in vivo and clinical studies. **Archives of Dermatological**
12 **Research**, v. 308, n.2, p. 123–132, 2016.
13
14 QIU, Y.; QIUB, L.; CUI, J.; QUFU, W. Bacterial cellulose and bacterial cellulose-
15 vaccarin membranes for wound healing. **Materials Science and Engineering**, v. 59,
16 p. 303–309, 2016.
17
18 ROBERTO, J. V. B.; JUNIOR, C. S. N.; SOUZA, E. S. A.; MARTINS, E. A.; ARAUJO,
19 E. R.; BARROS, M. M. A. Parâmetros bioquímicos de referência em ratos Wistar de
20 diferentes faixas de peso, provenientes do biotério das Faculdades Nova Esperança
21 – PB. **Revista de ciências da saúde Nova Esperança**. v. 16, n. 1, 2018.
22
23 SAIBUATONG, O.; PHISALAPHONG, M. Novo aloe vera—bacterial cellulose
24 composite film from biosynthesis. **Carbohydrate Polymers**. v. 79, p. 455–460, 2010.
25
26 SHAH, N.; UL-ISLAM, M.; KHATTAK, W. A.; PARK, J. K. Overview of bacterial
27 cellulose composites: A multipurpose advanced material. **Carbohydrate Polymers**,
28 v. 98, p. 1585–1598, 2013.
29
30 SIEFERT, S.A.; SARKAR, R. Matrix metalloproteinases in vascular physiology and
31 disease. **Vascular**, v.20, n.4, p. 210-216, 2012.
32
33 SINGLA, R.; SONI, S.; KULURKAR, P. M.; KUMARI, A.; MAHESH, S.; PATIAL, V.;
34 PADWAD, Y. S.; YADAV, Y. S. In situ functionalized nanobiocomposites dressings of

1 bamboo cellulose nanocrystals and silver nanoparticles for accelerated wound
2 healing. **Carbohydrate Polymers**, v. 155, p.152-162, 2017.

3

4 SOUZA, M. V. S.; LIMA, F. R.; MACEDO, H. R. A; MACEDO, M. O. C.; SOUSA, J.
5 M. C. Estudo de incorporação de LCC a Membrana de Quitosana. **Brazilian Journal**
6 **of Healing**, v. 2, n. 4, p. 2762-2777, 2019.

7

8 SKINOVSKY, JA. A influência da nicotina na cicatrização de anastomoses do
9 intestino delgado em ratos: angiogênese e miofibroblastos. Curitiba, 2005. Tese
10 (Doutorado em Clínica Cirúrgica) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade
11 Federal do Paraná.

12

13 SULAEVA, I.; HENNIGES, U.; ROSENAU, T.; POTTHAST, A. Bacterial cellulose as
14 a material for wound treatment: Properties and modifications. A review.
15 **Biotechnology**, v.8, p. 1547-71, 2015.

16

17 TABAII, M. J.; EMTIAZI, G. Transparent nontoxic antibacterial wound dressing based
18 on silver nano particle/bacterial cellulose nano composite synthesized in the
19 presence of tripolyphosphate. **Journal of Drug Delivery Science Technology**, v.
20 44, p. 244–253, 2018.

21

22 THAKARE, V. M. International Standard Serial Number, Promotion of Cutaneous
23 Wound Healing by Herbal Formulation Containing Azadirachta indica and Cynodon
24 dactalon extract in Wistar rats. International. **Journal of Pharmaceutical Research**
25 **& Development**, v.3, n.4, p. 80-86, 2011.

26

27 UL-ISLAM, M.; KHAN, T.; PARK, J. Water holding and release properties of Bacterial
28 cellulose obtained by in situ and ex situ modification. **Carbohydrate polymers**, v. 88,
29 p. 596-603, 2012.

30

31 VOLOVA, T. G.; SHUMILOVA, A. A.; SHIDLOVSKIY, I. P.; NIKOLAEVA, E.D.;
32 SUKOVATIIY, A. G.; VASILIEV, A. D.; AND SHISHATSKAYA, E. I. Antibacterial
33 properties of films of cellulose composites with silver nanoparticles and antibiotics.
34 **Polymer Testing**, v.65, p. 54–68, 2018.

1
2 WINTER, G. D. Some factors affecting skin and wound healing. **Journal of Tissue**
3 **Viability**, v.16, n.2, p.20-23, 2006.
4
5 XIE, Z.; PARAS, C. B.; WENG, H.; PUNNAKITIKASHEM, P.; SU, L. C.; VU, K. Dual
6 growth factor releasing multi-functional nanofibers for wound healing. **Acta**
7 **Biomaterialia**, v.9, p. 9351-9359, 2013.
8
9 XU, C.; MA, X.; CHEN, S.; TAO, M.; YUAN, L.; JING, Y. Bacterial cellulose
10 membranes used as artificial substitutes for dural deflection in rabbits. **International**
11 **Journal of Molecular Sciences**, v.15, p. 10855-10867, 2014.
12
13 XU, R.; XIA, H.; HE, W.; LI, Z.; ZHAO, J.; LIU, B.; WANG, Y.; LEI, Q.; KONG, Y.; BAI,
14 Y.; YAO, Z.; YAN, R.; LI, H.; ZHAN, R.; YANG, S.; LUO, G.; WU, J. Controlled water
15 vapor transmission rate promotes wound healing via wound re-epithelialization and
16 contraction enhancement. **Scientific Reports**, v.18, p.6:24596, 2016.
17
18 YANG, Y.; XIA, T.; ZHI, W.; WEI, L.; WENG, J.; ZHANG, C.; LI, X. H. Promotion of
19 skin regeneration in diabetic rats by electrospun coresheath fibers loaded with basic
20 fibroblast growth factor. **Biomaterials**, v.32, p.4243–4254, 2011.
21
22 YU, K.; LU, F.; LI, Q.; ZOU, Y.; XIAO, Y.; LU, B.; LIU, J.; DAI, F.; WU, D.; LAN, G.
23 Accelerated wound-healing capabilities of a dressing fabricated from silkworm
24 cocoon. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p.901-913,
25 2017.

1
2

ANEXO 1



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais

Curitiba, 22 de junho de 2017.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 01117 – 2ª versão

TÍTULO DO PROJETO: BIOSSEGURANÇA E ATIVIDADE DE MEMBRANAS DE CELULOSE VEGETAL COM OU SEM OLÉO ESSENCIAL DE CALÊNDULA NA CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS EM RATOS

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

José Ademar Villanova Jr.

EQUIPE DE PESQUISA

Luciano José Eigio Isaka, Bruno Massa de Viveiros, Jair Rondini Engracia Filho, Washigton Luiz Esteves Magalhães, Francine Ceccon Claro

INSTITUIÇÃO

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

ESCOLA / CURSO

Escola de Saúde e Biociências / Mestrado / Doutorado

VIGÊNCIA DO PROJETO	06/2017 a 10/2017	QUANTIDADE DE ANIMAIS	198
ESPECIE/LINHAGEM	<i>Rattus norvegicus</i> (Ratos)	Nº SISBIO (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
SEXO	M/F	ATIVIDADES (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
IDADE / PESO	Adultos / 300 - 350g	ESPECIE – GRUPO TAXONÔMICOS (de vida livre)	Não se aplica
ORIGEM DO ANIMAL	BIOTÉRIO – PUCPR (Informamos que o Biotério está em uma nova fase de estruturação, sendo assim, informar logo que seja possível à CEUA outros locais de origem dos animais.	LOCAL (IS) (Somente animais de vida livre)	Não se aplica

O colegiado da CEUA certifica que este protocolo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794/2018 e Decreto nº 6.899/2009, e com as normas editadas pelo CONCEA e foi **APROVADO** pela CEUA - PUCPR em reunião de colegiado no dia **22.06.2017**.

Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório à CEUA descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas. Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciar antes de receber a autorização formal para a sua realização.

Rua Imaculada Conceição, 1155 Prado Velho CEP 80.215-901 Curitiba Paraná Brasil
Telefone: (41) 3271-2292 www.pucpr.br

3
4