

Kryscia Leiko Natsuaki

Implante dérmico acelular sintético no subcutâneo e na  
superfície da pele de cobaias

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de  
Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para  
obtenção do título de Doutora em Bases Gerais  
da Cirurgia.

Orientadora: Profa. Titular Silvana Artioli Schellini

Botucatu

2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Natsuaki, Kryscia Leiko.

Implante dérmico acelular sintético no subcutâneo e na superfície da pele de cobaias / Kryscia Leiko Natsuaki. - Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Silvana Artioli Schellini  
Capes: 40102149

1. Pele. 2. Implantes artificiais. 3. Cobaias. 4. Celulose bacteriana. 5. Celulose - Biodegradação.

Palavras-chave: Acetobacter xylinum; Celulose bacteriana; Cobaias; Nanocompostos; Nanoskin.

Kryscia Leiko Natsuaki

Implante dérmico acelular sintético no subcutâneo e na  
superfície da pele de cobaias

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de  
Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para  
obtenção do título de Doutora em Bases Gerais  
da Cirurgia.

Comissão Examinadora:

---

Orientadora: Profa. Titular Silvana Artioli Schellini

---

Prof. Dr

---

Prof. Dr.

---

Prof. Dr.

---

Prof. Dr.

Botucatu, de julho de 2015

## DEDICATÓRIA

A Deus, pai e criador, que sempre me guiou pelos caminhos me orientando e me protegendo, que ouviu minhas orações em horas de dificuldade e me ajudou a terminar mais um projeto de minha vida.

Aos meus pais, Jorge e Lucia, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e cuidando de mim em todos os momentos alegres ou difíceis de minha vida. Abriram mão de seus sonhos e se sacrificaram para que eu pudesse estudar e hoje chegar onde estou.

Ao meu marido e companheiro, Cassio, que sempre me apoiou, respeitou meu trabalho, e compreendeu o quanto esse projeto era importante para mim. Obrigada pela paciência e pelo cuidado que tem comigo.

Ao meu irmão, Weberton, agradeço pela confiança, pelo carinho, respeito e amizade desde a infância.

À minha tia Cintia Mara Fujii por ter confiado em mim e por ter me ajudado com esse trabalho.

À professora Silvana, que com muita dedicação e paciência, me passou todo seu conhecimento desde o primeiro dia de residência em oftalmologia. Nunca esquecerei e serei eternamente agradecida a ela, que continua a se dedicar intensamente ao trabalho e ao ensinamento de seus alunos. Muito obrigada!

## **AGRADECIMENTOS**

À Flavia de Oliveira Gonçalves que sempre me ajudou em tudo que necessitei durante todos os anos desde que cheguei à cidade de Botucatu.

Aos pesquisadores Pierre Basmaji e Peterson Bernardo, de São Carlos, por nos fornecerem a Nanoskin® para a pesquisa.

Aos meus familiares pelo apoio e compreensão.

À professora Daniela Carvalho dos Santos por dispor de seu tempo para dividir seus imensos conhecimentos sobre a microscopia eletrônica.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UNESP Botucatu por fornecer espaço e tempo dos funcionários para me auxiliarem na pesquisa.

À secretária Marcia, do programa de pós-graduação em Bases Gerais da Cirurgia, por sempre nos auxiliar e orientar com muita dedicação.

À minha amiga e companheira de residência, Larissa Satto, que compartilhou comigo quatro anos de estudo em oftalmologia, cirurgias e também momentos de alegria profissional e pessoal.

À minha querida amiga, Elaine Fujisao, pela amizade e por ter me acolhido em sua casa sempre que precisei vir à Botucatu

Ao funcionário Silvio Geraldo dos Santos Junior do setor de fotografia, Campus da UNESP Botucatu.

Aos funcionários do departamento de Oftalmologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

Aos funcionários da Cirurgia Experimental de Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

## RESUMO

A Nanoskin® é uma película de celulose bacteriana produzida pela bactéria *Acetobacter xylinum*, por meio de um processo biotecnológico. É composta por uma rede de nanofibrilas cuja estrutura cria uma extensa superfície, a qual permite a retenção de grande quantidade de água e importantes modificações em seu formato, sem perder suas características estruturais.

**Objetivo:** visando acrescentar novas possibilidades para a reconstrução da pálpebra, em seus folhetos profundo ou superficial, o presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar se a película de Nanoskin® poderia ser uma opção.

**Método:** foram utilizadas 40 cobaias, do sexo masculino, que receberam fragmentos de Nanoskin® na região dorsal, em dois estudos, um direcionado para a utilização da Nanoskin nos tecidos profundos, quando o biomaterial foi colocado no subcutâneo e outro no qual a Nanoskin foi colocada na superfície da pele. Em ambos os estudos foram utilizados dois tipos de Nanoskin: grupo 1 (G1), no qual foi utilizada película de Nanoskin® (2X2 cm) sem revestimento de gelatina no subcutâneo ou na superfície da pele e o grupo 2 (G2), que recebeu implante de Nanoskin® (2X2 cm) com revestimento de gelatina no subcutâneo e na superfície da pele. O grupo controle foi obtido com colocação de enxerto de pele de espessura total no tamanho de 2X2 cm, contíguo ao implante de Nanoskin®, em todos os animais de G1 e de G2 do experimento que estudou o biomaterial na superfície da pele. Cinco animais de cada grupo foram eutanasiados em quatro momentos experimentais: 7 dias (M1), 30 dias (M2), 90 dias (M3) e 180 dias (M4). Foram realizadas avaliações morfométricas do implante das lâminas histológicas, exame histológico e exame ultraestrutural.

**Resultados:** a Nanoskin® quando implantada no subcutâneo não foi encontrada em um animal de M3 e em cinco animais de M4. Nos momentos M3, M4 e M5, houve separação entre as suas lamelas. Houve inflamação mais acentuada no início do experimento que regrediu nos momentos seguintes e formação de pseudocápsula ao redor do biomaterial. Quando utilizada na superfície, a Nanoskin® apresentou um padrão de cicatrização centrípeto. A inflamação seguiu padrão semelhante ao observado quando a aplicação foi no subcutâneo. Os animais que receberam a Nanoskin® revestida ou não por gelatina tiveram resposta semelhante.

**Conclusão:** a Nanoskin® apresentou resultados satisfatórios quando implantada no subcutâneo, assim como na superfície da pele de cobaias. Estudos clínicos devem ser providenciados a fim de validar a utilização da Nanoskin® para o reparo de feridas extensas das pálpebras.

**Palavras-chave:** Nanoskin®, celulose bacteriana, cobaias, nanocompostos, bioengenharia, pálpebras, estudo experimental, *Acetobacter xylinum*.

## ABSTRACT

The Nanoskin® is a bacterial cellulose film produced by the bacteria *Acetobacter xylinum* by means of a biotechnological process. It is composed by a network of nanofibrils whose structure creates a large surface area, which allows the retention of a large amount of water and significant changes in its shape without losing its structural characteristics.

**Purpose:** aiming to add new possibilities for the reconstruction of the eyelid, in its superficial or deep lamellae, this study was developed in order to assess whether the Nanoskin® film could be an option.

**Method:** 40 male guinea pig were used, that received Nanoskin® fragments in the dorsal region, in two studies, one directed to the use of Nanoskin® in deep tissue when the biomaterial was placed subcutaneously and another in which the Nanoskin® was placed on skin surface. In both studies we used two types of Nanoskin: group 1 (G1), which was used Nanoskin® film (2x2 cm) without gelatin coating on the subcutaneous or on the skin surface, and Group 2 (G2), which received Nanoskin® implant (2X2 cm) with gelatin coating on the subcutaneous and on the skin surface. The control group was obtained with full-thickness skin graft placement on the size of 2X2 cm Nanoskin® adjacent to the implant in all animals in G1 and G2 experiment that studied the biomaterial on the surface of the skin. Five animals from each group were euthanized at four experimental times: 7 days (M1), 30 days (M2), 90 days (M3) and 180 days (M4). Morphometric assessments of the implant and the histological slides were held, histological and ultrastructural examination.

**Results:** the Nanoskin® when implanted subcutaneously was not found in one animal from M3 and in five animals from M4. In moments M3, M4 and M5 , there was separation between their lamellae . There was a significant inflammation at the beginning of the experiment which reduced the following times, and formation of a pseudocapsule around the biomaterial. When used on the surface, Nanoskin® presented a standard centripetal healing. Inflammation followed similar pattern to the observed in the implant at the subcutaneous. The animals who received Nanoskin® with or without gelatin coating had similar response.

**Conclusion:** the Nanoskin® showed satisfactory results when implanted subcutaneously as well as on the surface of the skin of guinea pigs. Clinical studies should be performed to validate the use of Nanoskin® for repair of extensive wounds of the eyelids.



**Keywords:** Nanoskin®, bacterial cellulose, guinea pigs, nanocomposites, bioengineering, eyelids, experimental study, *Acetobacter xylinum*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Desenho esquemático representando as camadas da pele .....	18
Figura 2- Fibras de celulose de diferentes meios de cultura demonstradas pela MEV .....	26
Figura 3- Matriz extracelular de Nanoskin®.....	26
Figura 4-Imagem de película de Nanoskin® que foi utilizada neste estudo .....	27
Figura 5- Membrana de Nanoskin® visualizada pela microscopia eletrônica de varredura....	27
Figura 6- Desenho esquemático da anatomia da pálpebra superior e inferior.....	30
Figura 1 (Artigo 1)- Fotodocumentação de animal de G1M1 .....	43
Figura 2 (Artigo 1)- Fotodocumentação de animal de G2M1 .....	43
Figura 3 (Artigo 1)- Fotodocumentação de animal de G1M2 (A e B) e G2M2 (C e D).....	44
Figura 4 (Artigo 1)- Fotodocumentação de animal de G1M3 (A e B) e G2M3 (C e D).....	45
Figura 5 (Artigo 1)- Fotodocumentação de animal de G1M4 (A e B) e G2M4 (C e D).....	46
Tabela 1 (Artigo 1)- Mediana, valores mínimos e máximos da porcentagem e área de inflamação após implantação do Nanoskin® .....	47
Figura 6 (Artigo 1)- Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de animal de G1M1 e G2M1 .....	48
Figura 7 (Artigo 1)- Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de animal de G1M4 e G2M4.....	49
Figura 1 (Artigo 2)- Imagem demonstrando o procedimento cirúrgico .....	60
Figura 2 (Artigo 2)- Fotodocumentação da área operada de animais após tricotomia nos momentos experimentais (M1-M4) .....	63

Figura 3 (Artigo 2)- Fotodocumentação de animal de G1M3 após o sacrifício e antes da tricotomia.....	64
Tabela 1 (Artigo 2)- Exame morfométrico dos enxertos.....	64
Figura 4 (Artigo 2)- Fotodocumentação de animal de G1M1 e G2M1.....	66
Figura 5 (Artigo 2)- Fotodocumentação de animal de G1M2 e G2M2.....	67
Figura 6 (Artigo 2)- Fotodocumentação de animal de G1M3 e G2M3.....	68
Figura 7 (Artigo 2)- Fotodocumentação de animal de G1M4 e G2M4.....	69
Gráfico 1 (Artigo 2)-Gráfico demonstrando a porcentagem de células inflamatórias, segundo grupo e momento de eutanásia em cobaias que receberam enxerto de pele autóloga e Nanoskin®, sem ou com cobertura de gelatina .....	70
Gráfico 2 (Artigo 2)- Gráfico demonstrando a área inflamatória, segundo grupo e momento de eutanásia em cobaias que receberam enxerto de pele autóloga e Nanoskin®, sem ou com cobertura de gelatina .....	70
Tabela 2 (Artigo 2)- Mediana e valores mínimos e máximos da espessura do epitélio regenerativo após utilização de Nanoskin® com (G2) e sem cobertura de gelatina (G1) sobre feridas extensas da pele do dorso de cobaias .....	71
Figura 8 (Artigo 2)- Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de G1M1 e enxerto de pele autóloga (GC).....	73
Figura 9 (Artigo 2)- Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de G2M1 .....	74
Figura 10 (Artigo 2)- Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de G1M4 .....	75
Figura 11 (Artigo 20- Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de G2M4 e enxerto de pele autóloga (GC).....	76

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CA – Califórnia

CBE – Companhia Brasileira de Esterilização

cm – centímetro

cm<sup>2</sup> - centímetro quadrado

Com. – Comércio

EMBRARAD - Empresa Brasileira de Radiações

FAPESP- Fundação de amparo à pesquisa do estado de São Paulo

GC – grupo controle

G1 – grupo G1

G2 – grupo G2

Inc – Incorporação

Ind. – Indústria

ISO – International Organization for Standardization

MET – microscopia eletrônica de transmissão

MEV – microscopia eletrônica de varredura

M1 – momento M1

M2 - momento M2

M3 – momento M3

M4 – momento M4

HE – hematoxilina eosina

kg - quilograma

KGy - quilogray

Ltda – Limitada

M - molar

MA – Massachusetts

MG - Minas Gerais

mg - miligrama

mL - mililitro

mm – milímetro

mm<sup>3</sup> - milímetro cúbico

MN – Minnessota

m/v –massa/volume

nm – nanômetro

NJ – New Jersey

OH - Hidróxido

pH - potencial de hidrogênio

SP - São Paulo

TX – Texas

UFC – Unidades formadoras de colônias

UNESP - Universidade Estadual Paulista

WV – West Virginia

µm - micrometro

## **LISTA DE ABREVIATURAS DE ELEMENTOS DAS FIGURAS**

B - biomaterial

BC - hemácia

C - colágeno

CO - núcleo

F - fibroblasto

IC - célula inflamatória

K - queratina

L - leucócito

M - mitocôndria

MEC - matriz extracelular

P - pseudocápsula

RER - retículoendoplasmático rugoso

S - célula de Schwann

V - vaso

VAC - vacúolo

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C - grau Celsius

% - porcentagem

> - maior

< - menor

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1.Noções gerais sobre a estrutura e o processo cicatricial da pele.....	17
1.2.Meios de reparação de feridas cutâneas.....	20
1.3.Nanoskin®: celulose bacteriana e a reparação de feridas cutâneas.....	22
1.4.As pálpebras como parte do mecanismo protetor dos olhos e os meios para reparação de feridas extensas.....	28
1.5.Justificativa para a realização dos estudos.....	32
2.OBJETIVO.....	33
3. ARTIGO 1.....	34
IMPLANTE DE NANOSKIN® NO SUBCUTÂNEO DE COBAIAS.....	34
INTRODUÇÃO.....	36
OBJETIVO.....	37
MATERIAL E MÉTODOS.....	37
RESULTADOS.....	42
DISCUSSÃO.....	49
CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
4. ARTIGO 2:.....	54
NANOSKIN® PARA REPARAÇÃO DE FERIDAS EXTENSAS DA PELE.....	54
INTRODUÇÃO.....	56
OBJETIVO.....	57
MATERIAL E MÉTODOS.....	57
RESULTADOS.....	62
DISCUSSÃO.....	76
CONCLUSÃO.....	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
5. COMENTÁRIOS.....	84
6. CONCLUSÃO.....	86
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
8. APÊNDICE.....	91



## **1. INTRODUÇÃO**

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Noções gerais sobre a estrutura e o processo cicatricial da pele**

A pele é o maior órgão do corpo e é composta por duas camadas de tecidos especializados: a epiderme e a derme. A função da pele é proteger o corpo de substâncias tóxicas, além de ter funções fisiológicas, tais como manutenção da homeostase, termorregulação, vigilância epidemiológica, cicatrização, detecção sensorial, absorção, excreção e evaporação. Possui espessura, resistência e flexibilidade variável e algumas especificidades conforme as diversas partes do corpo (Brohem et al., 2011; Zhang et al., 2012).

A pele humana representa mais de 15% do peso corporal (Sampaio & Rivitti, 2008), e compõe-se, essencialmente, de três grandes camadas de tecidos: uma camada superficial – a epiderme; uma camada intermediária – a derme ou cório; e uma camada profunda, a hipoderme ou tecido celular subcutâneo (Sampaio & Rivitti, 2008).

A epiderme é constituída por epitélio estratificado, cuja espessura apresenta variações topográficas, desde 0,04 mm nas pálpebras até 1,6 mm nas regiões palmo-plantares (Sampaio & Rivitti, 2008). As células mais abundantes na epiderme são os ceratinócitos, compondo cerca de 80% da celularidade da pele. Durante a migração dos ceratinócitos da camada basal da epiderme até a superfície, cinco zonas morfolologicamente distintas podem ser identificadas: o estrato basal (germinativo), estrato espinhoso, estrato granuloso, estrato lúcido e estrato córneo (Gartner & Hiatt, 2007).

A segunda camada tissular da pele, disposta imediatamente abaixo da epiderme, é a derme ou cório, que compreende denso estroma fibroelástico, no qual estão estruturas e órgãos anexiais da pele, glândulas sebáceas, sudoríparas e folículos pilosos (Sampaio & Rivitti, 2008).

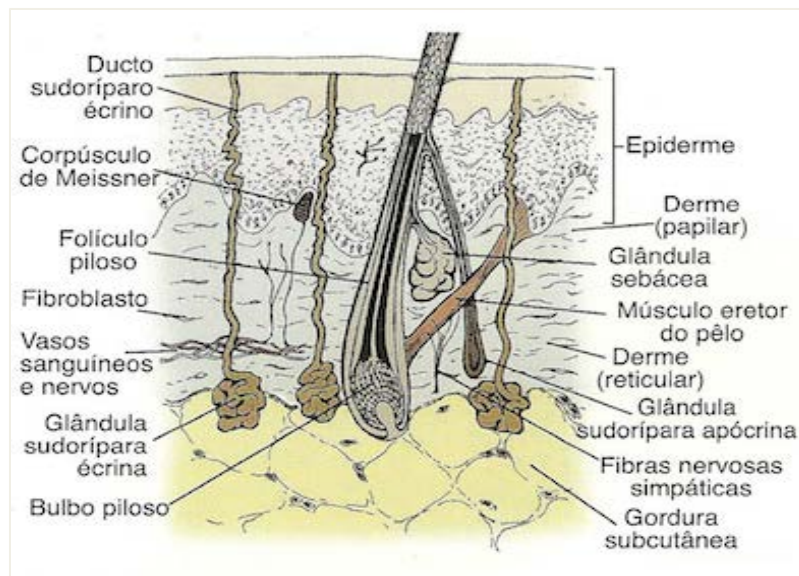
Em poucas palavras, pode-se dizer que cerca de 80% das células que compõem a pele normal são ceratinócitos, dispostos em camadas, sobre uma membrana basal. Há diferenças morfológicas entre os ceratinócitos, de forma que a camada mais superficial é a espinhosa ou camada córnea, responsável pela ceratinização. Próximo à membrana basal há o estrato basal e, em seguida, a camada granulosa. Células dendríticas, melanócitos e células

sensoriais também fazem parte deste tecido. Entre a epiderme e a derme há uma membrana basal, dividida entre lâmina lúcida e densa (Brohem *et al.*, 2011).

A derme é formada por duas camadas, a papilar e a reticular. As principais células da derme são fibroblastos, macrófagos e adipócitos. A camada papilar é composta de tecido conjuntivo frouxo e fica logo abaixo da epiderme. A camada reticular é formada de tecido conjuntivo denso. Além dos vasos sanguíneos, linfáticos e dos nervos, também são encontradas na derme estruturas derivadas da epiderme como os folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas (Junqueira & Carneiro, 2008; Brohem *et al.*, 2011).

A terceira camada da pele, mais profunda, a hipoderme, compõe-se de tecido adiposo (Sampaio & Rivitti, 2008). Essa é a camada que permite que a pele se movimente livremente sobre as estruturas mais profundas do corpo (Oliveira Filho, 2001).

**Figura 1-** Desenho esquemático representando as camadas da pele



Fonte: Bichakjian & Johnson (2009)

A pele pode necessitar de remoção pela presença de tumores ou ser perdida devido a traumas. Nestes casos, pode ocorrer regeneração, quando existe proliferação de células para substituir estruturas perdidas ou reparação, que consiste em uma combinação do processo de regeneração e formação de cicatriz pelo depósito de colágeno e outros elementos da matriz extracelular que regula o crescimento, a proliferação, o movimento e a diferenciação das células ao seu redor (Kumar *et al.*, 2010).

O processo de reparação da ferida cutânea é constituído de três fases: inflamação, proliferação e maturação. Na fase de inflamação a lesão inicial causa ativação das vias de coagulação provocando adesão e agregação de plaquetas. Na fase proliferativa (24 a 72 horas), ocorre formação de tecido de granulação devido à proliferação de fibroblastos e células endoteliais vasculares. Na fase de maturação (48 a 96 horas), os neutrófilos são substituídos pelos macrófagos que removem resíduos extracelulares, fibrina e outros materiais estranhos do local, promovendo angiogênese e deposição de matriz extracelular e provocando remodelamento do tecido, com contração da ferida (Kumar *et al.*, 2010).

Quando ocorre lesão da pele, há afluxo de células imunes para o sítio de lesão, seguidas de fibroblastos que gerarão a nova matriz tecidual. Concomitantemente há reepitelização e revascularização.

A reepitelização ocorre por dois fenômenos simultâneos: a migração de células a partir da camada granular e também a partir da lâmina basal, junto às margens da ferida. Assim que as camadas se refazem, há inibição do crescimento por inibição de contato. A fase final do processo inflamatório e epitelização ocorre quando há células endoteliais e formação de tecido de granulação, com predomínio de fibroblastos. A remodelação do colágeno ocorre pelas metaloproteases de matriz, produzidas pelos fibroblastos e macrófagos, e o balanço final entre a produção e a destruição do colágeno dará o aspecto final da cicatriz que poderá ter a forma atrófica, hipertrófica ou quelóide (Metcalf & Ferguson, 2007; Zhang *et al.*, 2012).

A matriz extracelular é composta por proteínas estruturais (colágeno e elastina), proteínas especializadas (laminina, fibrilina e fibronectina) e proteoglicanos. O colágeno e as fibronectinas são biomateriais naturais, que podem ser utilizados como matrizes para o crescimento de tecidos novos (Shores *et al.*, 2007).

Órgãos ou tecidos quando sofrem algum trauma podem desenvolver uma cicatriz fibrótica e o tecido derivado da cicatriz é funcionalmente e esteticamente de qualidade inferior. No entanto, alguns tipos de tecidos como a pele, na fase fetal ou embrionária, e a orelha de camundongos regeneram e não evoluem para cicatriz, tendo sido constatado que, nesses tecidos, a resposta inflamatória é escassa e há reparação ao invés de fibrose. Este fato fez evoluir o conhecimento sobre citocinas que estão expressas na regeneração, buscando meios de incorporá-las nas matrizes artificiais, a serem usadas nos modelos de pele artificial. A incorporação de citocinas e de fator de crescimento cria um substituto inteligente da pele (Metcalf & Ferguson, 2007; Liu & Cao, 2007).

## 1.2. Meios de reparação de feridas cutâneas

A reposição da pele, quando há feridas extensas, é um desafio e pode ser feita por meio de enxertos autólogos, homólogos, heterólogos, xenoenxertos ou por peles artificiais criadas usando técnicas de bioengenharia. Logicamente, tecidos do próprio hospedeiro fornecem melhores resultados. No caso de substituição da pele pela própria pele, seja do mesmo indivíduo ou não, as possibilidades são enxerto de espessura total, parcial e também enxertos de tecido resultante de cultivo celular, técnica sugerida mais recentemente, após o desenvolvimento dos cultivos de células. No entanto, muitas vezes há extensas perdas e não há como obter o material necessário para a reposição, partindo-se para outras proposições.

Os enxertos alográficos podem levar à reação imunológica, além da possibilidade de transmissão de doenças, como a hepatite, risco que diminui com o tratamento do tecido com glicerol e/ou métodos térmicos (Shores *et al.*, 2007).

Os xenoenxertos são substitutos temporários da pele; por serem derivados de tecido de outra espécie, provocam reação imunológica que pode levar à rejeição, ocorrendo absorção com o decorrer do tempo (Hoyama *et al.*, 2005).

Em geral, os substitutos artificiais da pele formam um grupo heterogêneo de substâncias que necessitam de leito menos vascularizado, com resposta inflamatória reduzida, promovendo uma rápida e segura cobertura para as feridas (Shores *et al.*, 2007; Singh & Shenoy, 2012). Além disso, não há necessidade de provocar lesão em outro sítio doador, como ocorre quando se usa enxertos autólogos, reduzindo a morbidade e a chance de cicatrizes hipertróficas em outros locais.

Considera-se que a pele artificial ideal deva ter as seguintes características: ser resistente à infecção, resistir à hipóxia, ter custo eficiente, fácil de preparar, estocar e usar, não ter antigenicidade, ter propriedades mecânicas e físicas adequadas (estabilidade, resistência, não dessecação, aderência), possuir componentes dérmicos e epidérmicos e estar disponível em quantidade suficiente. Outros fatores a serem considerados são disponibilidade em quantidade suficiente para atender a grande demanda existente (Shores *et al.*, 2007; Singh & Shenoy, 2012).

Já são muitas as alternativas de biomateriais para reposição da pele perdida, algumas empregadas apenas como curativos biológicos, outras definitivas ou temporárias, estas últimas com necessidade de um segundo procedimento para se ter a reparação

finalizada. No entanto, até o momento, não há nenhuma que possa ser considerada ideal, o que torna muito importante a busca de novas opções.

Métodos complexos podem ser utilizados para a engenharia de biomateriais substitutivos da pele. Um dos pré-requisitos da bioengenharia é que exista biocompatibilidade, ou seja, que as células possam crescer no novo tecido, ressaltando a importância da matriz extracelular. A matriz pode ser produzida a partir de materiais naturais ou pode ser preparada a partir de polímeros biodegradáveis. Alguns materiais naturais utilizados para produção de matriz extracelular são: polipeptídios, hidroxiapatitas, hialuronato, glicosaminoglicanas, fibronectinas, colágeno, quitosana e alginatos. Exemplos de materiais sintéticos que poderiam ser usados para este fim seriam: poliglicólicos, poliláticos e poliláticos-glicólicos, materiais que já são usados como fios ou malhas cirúrgicas, além de politetrafluoroetileno e polietileno. Os polímeros são usados como matrizes e eles podem ter características absorvíveis ou não. Reabsorção juntamente com a adequada adesão de células à matriz extracelular aumentam o potencial de utilização dos materiais biológicos para regeneração tecidual. A maior desvantagem dos materiais sintéticos é que eles não reconhecem receptores de sinais celulares (Metcalf & Ferguson, 2007).

As peles artificiais podem ser classificadas em: tecidos impermeáveis temporários biológicos (membrana amniótica) ou polímeros sintéticos (Tegaderm® - 3M Health Care, St Paul, MN, Estados Unidos da América), tecidos de camada única e permanentes para substituição da epiderme (autoenxerto de células epiteliais cultivadas) ou da derme (colágeno bovino ou porcino), substitutos compostos da pele (enxertos de pele autólogos, homólogos ou heterólogos), tecido sintético desenvolvido por bioengenharia (Apligraf® - Graftskin, Organogenesis Inc., Canton, MA, Estados Unidos da América; Biobrane® - Bertex Pharmaceuticals, Morgantown, WV, Estados Unidos da América; Integra® - Integra LifeSciences Corporation, Plainsboro, NJ, Estados Unidos da América; AlloDerm® - LifeCell Corporation, The Woodlands, TX, Estados Unidos da América) (Halim *et al.*, 2010).

Os tecidos sintéticos podem ser divididos em acelulares, geralmente constituídos por matriz colágena, elastina ou silicone, e os tecidos celulares que contém células vivas, como ceratinócitos ou fibroblastos sobre uma matriz (Brusselaers *et al.*, 2010).

Há alguns bioenxertos já disponíveis no mercado, como o TransCyte® (Advanced Tissue Sciences, La Jolla, CA, Estados Unidos da América), que é um tecido criado a partir de uma malha de nylon contendo colágeno porcino preenchida por fibroblastos humanos,

envoltos por membrana de polímero de silicone. Os fibroblastos proliferam na malha de nylon, produzem fator de crescimento e colágeno dérmico que povoam a malha formando um verdadeiro tecido. Método semelhante leva a produção do Apligraf® que é constituído por colágeno tipo I bovino, fibroblastos e ceratinócitos humanos (Hansen *et al.*, 2001). O Apligraf® também está disponível no mercado (informações disponíveis no site [www.apligraf.com](http://www.apligraf.com)).

Integra® e Biobrane® seguem a mesma linha, sendo peles artificiais compostas por duas lamelas. Integra® é uma pele artificial produzida a partir de matriz colágena bovina e condroitina, recoberta por silastic, análoga à epiderme, que controla a perda de fluidos e reduz a invasão bacteriana. Capilares e fibroblastos migram do hospedeiro para a pele artificial, simulando um processo reparativo normal. Em cerca de três a seis semanas há reabsorção do colágeno e o silastic deve ser removido. No caso da Biobrane® que é constituído por colágeno porcino tipo I recoberto por fina lâmina de silicone, há possibilidade de transudatos ultrapassarem a membrana superficial de silicone que simula a epiderme, da mesma forma que ocorre na pele normal (Singh & Shenoy, 2012).

O AlloDerm® é um aloenxerto obtido da pele de cadáver, tratado quimicamente, cujas células epidérmicas antigênicas são removidas e a membrana basal e a derme são preservadas. A preservação da membrana basal parece ter efeito importante para o sucesso do crescimento de células epiteliais no AlloDerm® (Hansen *et al.*, 2001).

Apesar dos grandes avanços na engenharia de tecidos, ainda não é possível refazer a pele com seus anexos e há necessidade de avançar. Nos últimos anos, a nanotecnologia foi sugerida para melhorar os resultados dos tecidos sugeridos para substituir a pele, tendo como base o desenvolvimento de matrizes extracelulares artificiais e de fontes de células (Mohamed & Xing, 2012). Segundo Liu & Cao (2007), a introdução de fatores de crescimento formando materiais indutores, juntamente com as tecnologias citadas acima, é um importante conceito que também está sendo desenvolvido para melhorar a regeneração tecidual.

### **1.3. Nanoskin®: celulose bacteriana e a reparação de feridas cutâneas**

A celulose bacteriana é um exopolissacárideo produzido por várias espécies de bactérias, como aquelas do gênero *Glouconacetobacter* (antigamente conhecido como *Acetobacter*), *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina* e *Salmonella*. Muitas bactérias secretam exopolissacárideo, mas apenas alguns podem

produzir celulose. *Xylinum*, o mais estudado produtor de celulose bacteriana, é um organismo gram-negativo, aeróbico em forma de bastonete. O formato da celulose bacteriana no meio de cultura pode ser controlado de acordo com o modo de cultivo que modifica o tamanho e a origem das cadeias que produzem diferentes proporções do material na fase cristalina e do tipo de biorreator. A celulose pode ser obtida nas formas seca e hidrogel por um processo de liofilização (Olyveira *et al.*, 2013).

É formada por nanofibrilas produzidas na natureza e é encontrada em vários grupos de microorganismos como fungos, bactérias e algas. A biossíntese da celulose pode ocorrer a partir da proliferação bacteriana, com consumo de energia, que pode advir da polimerização da glicose (Olyveira *et al.*, 2011a). Embora seja quimicamente idêntica à celulose vegetal, a celulose bacteriana possui uma estrutura única de nanofibrilas (cerca de 100 vezes mais fina) que determina suas propriedades físicas e mecânicas conferindo-lhe grande força tênsil, alto grau de polimerização e alto índice de cristalização (Olyveira *et al.*, 2011a; Olyveira *et al.*, 2013). A rede de nano e microfibrilas da celulose bacteriana cria uma extensa superfície, a qual permite a retenção de grande quantidade de água e importantes modificações em seu formato sem perder suas características estruturais (Czaja *et al.*, 2007).

Há vários fatores que afetam a produção de celulose, tais como o meio de cultura, as condições ambientais e os seus derivados. Geralmente, o nível elevado de carbono no meio, entre outros elementos (geralmente nitrogênio) é favorável para a produção de polissacarídeos (Stell & Rickvold, 1987; Watanabe & Yamanaka, 1995). A produção de celulose bacteriana pode ser aumentada quando se utiliza melaço e milhocina como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente (Sani & Dahman, 2009). A produção de celulose da bactéria *Gluconacetobacter hansenii* a partir de três substratos (glicose, glicerol e manitol) para avaliar o rendimento na produção de celulose, mostrou que o glicerol foi o que proporcionou maior rendimento no mecanismo de produção. Esse resultado é de importância, já que a glicose se torna um substrato de custo elevado quando se pretende produção em grande escala, quando comparada ao glicerol (Antonio *et al.*, 2012).

A celulose bacteriana na reparação tecidual apresenta similaridades com alguns componentes da matriz extracelular, particularmente o colágeno, que é o responsável pela formação de estruturas que constituem o suporte para os tecidos de origem, importante na neoformação tecidual (Svensson *et al.*, 2005; Petersen & Gatenholm, 2011; Oliveira *et al.*, 2012;), pode ser este um material útil como substrato para tecidos artificiais.



A forma mais utilizada da celulose bacteriana como biomaterial é em estado úmido, principalmente na forma de gel, embora a celulose bacteriana possa ser utilizada na forma seca em película, aquecida e também em baixas temperaturas. A celulose bacteriana pode ser introduzida como parte da composição de outro material para melhorar suas propriedades (Torres *et al.*, 2012).

Estudos utilizando a celulose bacteriana para reposição de cartilagem, vasos e ossos mostraram resultados promissores (Fricain *et al.*, 2012; Andrade *et al.*, 2010; Andersson *et al.*, 2010). O estudo de Wipperman *et al.* (2009) obteve boa regeneração endotelial da parede vascular utilizando celulose bacteriana para reparação de vasos em porcos. Basmaji (2011) refere que a celulose bacteriana possui propriedade de indução de regeneração óssea e apresenta alta capacidade de adesão de medicamentos devido aos grupos químicos OH presentes em sua superfície.

A Nanoskin® é um tecido composto por uma película de celulose desenvolvida pela Innovatecs (São Carlos, SP), cuja composição química polissacarídica é uma estrutura de cadeias unidas por pontos monoméricos de glicose. Apresenta estrutura nanométrica e é morfologicamente semelhante ao colágeno, o que serve de suporte para adesão celular, e suas microporosidades reduzem a perda de água e possibilitam a passagem de gases (Costa *et al.*, 2012). Pode ser obtida na forma pura e sua estrutura consiste em uma rede ultrafina de nanofibras de celulose (3-8 nm), altamente hidratada (99% em peso), com alto peso molecular e alta cristalinização (60-90%) (Olyveira *et al.*, 2011b). No tratamento de úlceras crônicas a utilização da Nanoskin® promoveu redução da dor, atividade bactericida e aceleração da granulação (Basmaji, 2011).

A membrana de celulose é sintetizada partir de um processo biotecnológico natural de produção de biomassa, que envolve um meio de cultura onde leveduras em simbiose desenvolvem o produto, ou seja, é o resultado de uma associação simbiótica entre a levedura e cepas do gênero *Gluconacetobacter xylinum*. É obtida por meio do cultivo das bactérias *Acetobacter xylinum* (cepa superprodutora) que, em média, de 20 a 28 dias, produzem uma estrutura tipo malha. Membranas hidratadas de celulose bacteriana são cortadas e então trituradas em processador doméstico e desidratadas até chegar na textura desejada. Em seguida, a celulose é embalada manualmente em envelopes com grau cirúrgico e enviada para esterilização, obtida através de raios gama, com carga de 25 kg na Companhia Brasileira de Esterilização em Cotia (CBE- Cotia- SP, Brasil). A fonte de irradiação para

esterilização por meio de raios gama é o isótopo Cobalto-60, instalada nos irradiadores modelos JS7500 e JS9600, fabricado pela empresa canadense Nordion (Nordion Inc., Canadá) e operados pela CBE-EMBRARAD (Empresa Brasileira de Radiações), unidade Cotia. O processo de esterilização utilizado é bastante criterioso, sendo que inicialmente o produto é submetido a várias avaliações para definição das doses de irradiação adequadas. Primeiramente, é avaliada a dose máxima de esterilização tolerada pelo produto após avaliação dos efeitos de todos os seus componentes. Em seguida, o produto passa por cinco estágios para verificação da dose de esterilização, são esses:

Estágio 1: seleção do S.A.L (Sterility Assurance Level- nível de segurança em esterilidade). Para o caso de produtos médicos o S.A.L requerido é de  $10^{-6}$ , ou seja, a probabilidade de se encontrar uma amostra contaminada em um universo de um milhão de amostras.

Estágio 2: determinação da carga microbiana média. Nesse estágio, determina-se a carga microbiana inicial do produto antes de ser submetido ao processo de irradiação. No caso do Nanoskin® foi encontrado uma média de 11,8 UFC (Unidades formadoras de colônias)/produto.

Estágio 3: estabelecimento da dose de verificação. A ISO 11137-2:2006 preconiza que para esse número seja aplicada uma dose de verificação de 7,3 KGy.

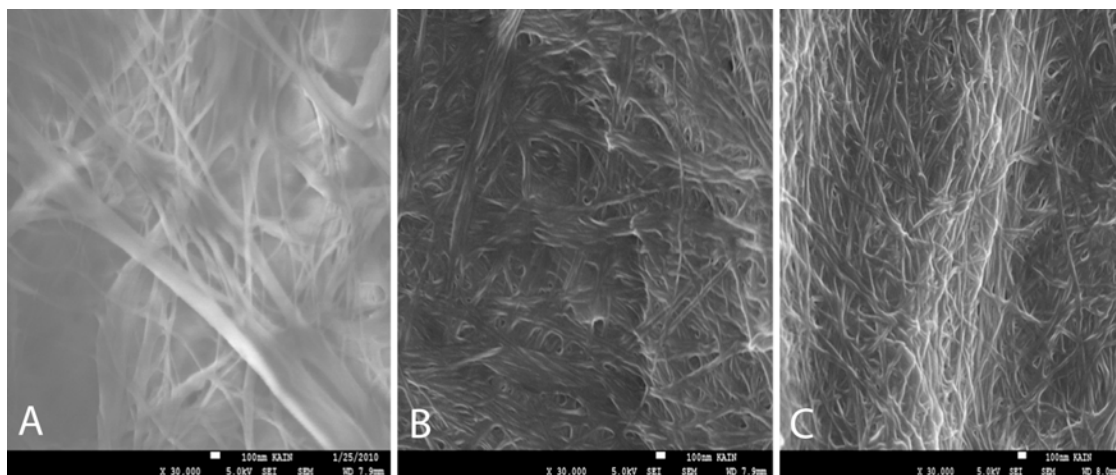
Estágio 4: verificação experimental da dose de verificação. Dez amostras foram testadas e, de acordo com a ISO 11137, o critério para aceitação é que não mais que uma amostra apresente resultado positivo (com microorganismo em condições de se reproduzir). As amostras de Nanoskin® não apresentaram qualquer crescimento no processo, ou seja, houve aceitação do teste.

Estágio 5: estabelecimento da dose esterilizante. A dose mínima esterilizante para o produto foi de 25 KGy.

O substrato utilizado para os cultivos pode ser composto de diferentes substâncias como cana-de-açúcar, mel, tâmara e chá verde (Figura 2). O caldo da cana-de-açúcar foi o primeiro substrato a ser utilizado pela Innovatecs. A quantidade de adubo do solo, agrotóxicos e chuva interferem na qualidade da cana-de-açúcar alterando o produto final, ou seja, a celulose.

O chá-verde, misturado em água potável e açúcar, demonstrou ser um excelente substrato para o crescimento da bactéria e passou a ser empregado pelo fabricante, devido a ser mais estável e mais fácil de se adquirir. Além disso, as fibras derivadas do chá verde produzem matriz extracelular na escala nanométrica, o que as torna mais adequadas para aplicações na saúde (informações do fabricante) (Figura 3).

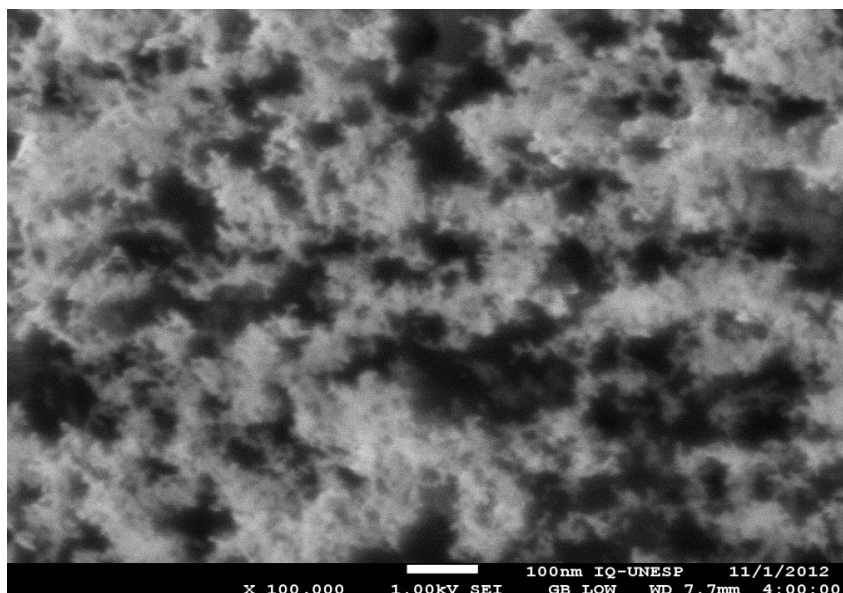
**Figura 2-** Fibras de celulose de diferentes meio de cultura demonstradas pela MEV



A) Derivado de cana-de-açúcar. B) Derivado de mel. C) Derivado de tâmara

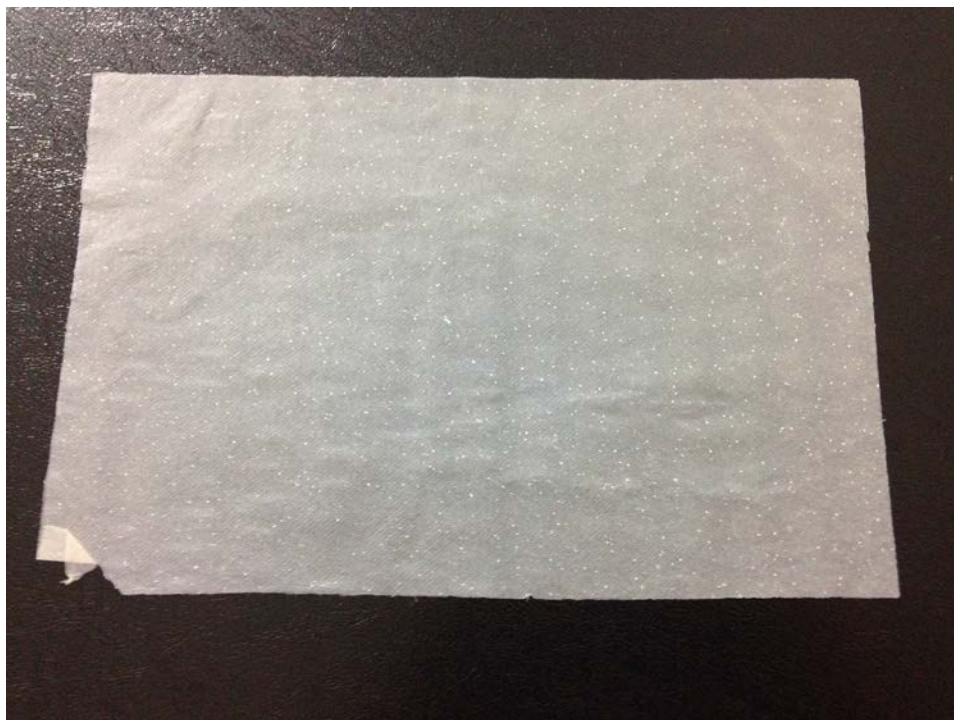
Fonte: Imagens fornecidas pelo fabricante da Nanoskin®

**Figura 3-** Matriz extracelular da Nanoskin®



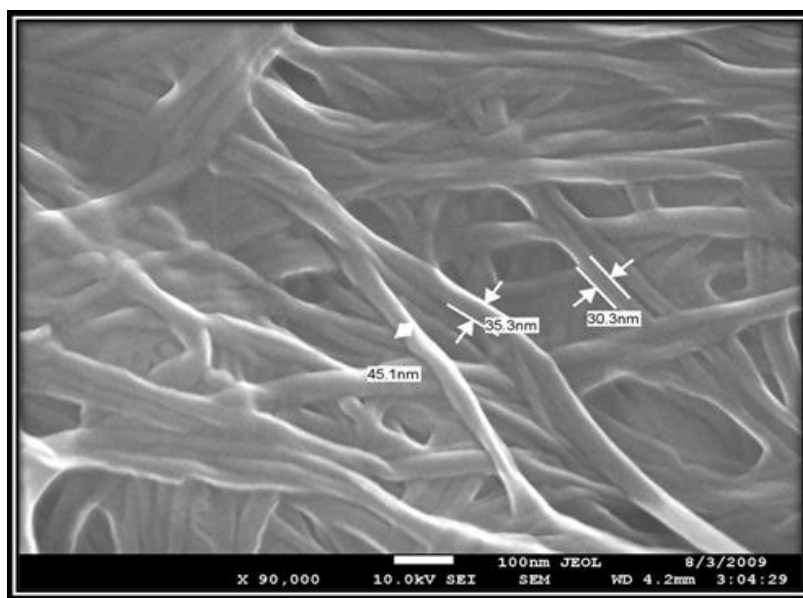
Fonte: Imagem fornecida pelo fabricante da Nanoskin®

**Figura 4-**Imagem da película de Nanoskin® que foi utilizada neste estudo



Fonte: Material elaborado pelo autor

**Figura 5-**Membrana de Nanoskin® visibilizada pelo microscopia eletrônica de varredura



Fonte: Innovatecs. Innovatec's Co. [Internet].Disponível em: [www.innovatecs.com](http://www.innovatecs.com).

#### **1.4. As pálpebras como parte do mecanismo protetor dos olhos e os meios para reparação de feridas extensas**

Os delicados tecidos palpebrais possuem características ímpares, como a movimentação constante e a capacidade de se abrir ou de se fechar em decorrência de estímulos específicos. Devido a este e a outros mecanismos, as pálpebras são reconhecidas como parte importante do mecanismo protetor dos olhos (Gu *et al.*, 2012).

O septo orbitário delimita a pálpebra da órbita e é uma expansão do periósteo que se inicia no arco marginal do rebordo orbitário e termina fundindo-se com a aponeurose do levantador da pálpebra superior ou do retrator da pálpebra inferior. Os septos das pálpebras superior e inferior se inserem lateralmente no tendão cantal lateral e no medial (Matayoshi, 2004).

As pálpebras possuem placas tarsais superior e inferior que são estruturas semi-elípticas planas, compostas por tecido conjuntivo fibroso denso, que são responsáveis pela integridade estrutural da pálpebra. As placas tarsais superiores medem cerca de 29 mm de comprimento, 10-12 mm de altura e 1 mm de espessura, e as inferiores medem cerca de 3-5 mm de altura. O tarso se insere na margem da órbita através dos ligamentos palpebrais mediais e laterais, colaborando com a formação dos mesmos. Anteriormente, o tarso adere-se ao músculo orbicular e, posteriormente, é firmemente aderido à conjuntiva (Matayoshi, 2004).

O sulco palpebral superior é formado por expansões das fibras do músculo levantador da pálpebra superior e se localiza cerca de 8 a 12 milímetros acima da margem palpebral na sua porção mais central, variando sua altura em relação ao sexo e à raça. Semelhantemente, na pálpebra inferior também há um sulco menos delimitado, medindo cerca de 2-3 mm na porção nasal e 5-6 mm no setor temporal, que contribui para a retração da pele marginal no olhar para baixo (Matayoshi, 2004).

O músculo levantador da pálpebra superior é o principal na função de abertura palpebral e atua em conjunto com o músculo de Müller (ou músculo tarsal superior), um músculo de inervação simpática e que se origina na face inferior do músculo levantador da pálpebra superior e se insere na borda tarsal superior (Kikkawa & Vasani, 2005).

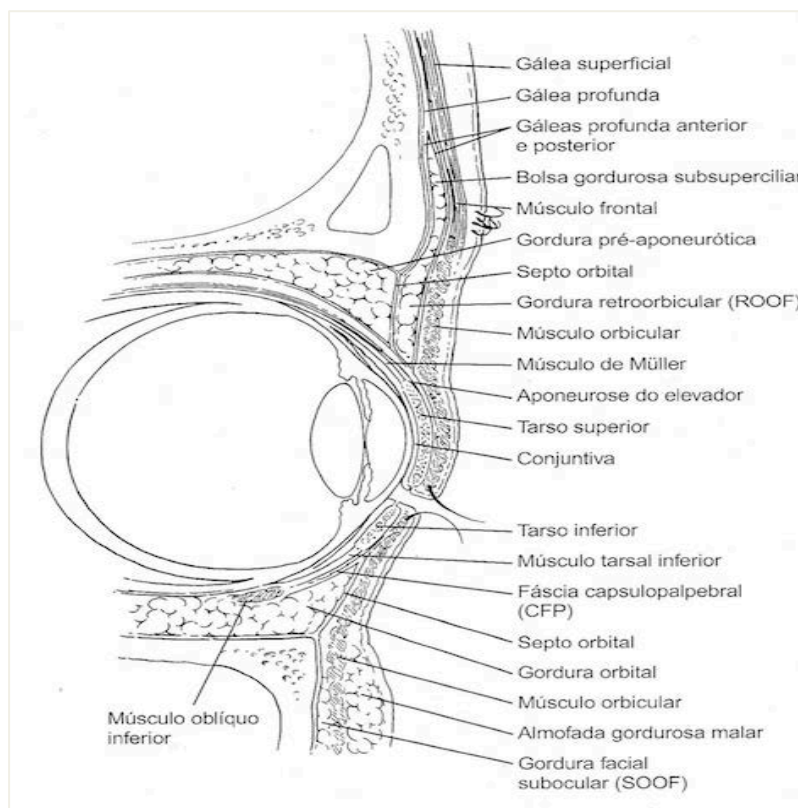
A conjuntiva é a camada mais interna das pálpebras. Consiste em uma membrana mucosa composta por epitélio escamoso não ceratinizado, contendo células caliciformes que produzem secreção mucosa para o filme lacrimal. A conjuntiva reveste a pálpebra

internamente (conjuntiva palpebral). No fórnice superior, a conjuntiva apresenta aderências frouxas com os músculos reto superior e com o levantador (Matayoshi, 2004).

A margem palpebral é revestida externamente pela pele e internamente é recoberta por epitélio conjuntival. Apresenta os orifícios das glândulas de Meibômio (ou glândulas tarsais), glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas modificadas, estando relacionadas aos cílios que são folículos pilosos modificados. Outras glândulas da pálpebra são as lacrimais acessórias (Krause e Wolfring), que se situam nos fórnices conjuntivais e na borda superior do tarso. Todas estas glândulas fornecem secreção para composição do filme lacrimal (Matayoshi, 2004; Kikkawa & Vasani, 2005).

Em termos cirúrgicos, a pálpebra pode ser dividida em dois folhetos: um anterior, composto por pele e músculo orbicular e outro posterior, composto por tarso e conjuntiva. A separação anatômica destes dois folhetos, no nível da margem palpebral, é vista como uma linha de demarcação acinzentada, conhecida como linha cinzenta, reflexo anatômico da visibilização de fibras do Músculo de Riolan, uma diferenciação do músculo orbicular que envolve os folículos pilosos dos cílios, mantendo-os em posição de convexidade que os afasta dos olhos na medida que crescem (Matayoshi, 2004).

**Figura 6-** Desenho esquemático da anatomia da pálpebra superior e inferior



Fonte: Kikkawa & Vasani (2005)

Devido à importância das pálpebras como parte do mecanismo protetor dos olhos, as perdas teciduais decorrentes de traumas ou da remoção de tumores extensos devem ser de pronto reparadas, utilizando material autólogo para repor a lamela anterior, na forma de enxertos e retalhos de pele, ou para repor a lamela posterior, como cartilagem auricular, mucosa bucal, periósteo, septo nasal e palato duro (Fernandes *et al.*, 2003). Para qualquer destas opções, haverá necessidade de se ter um sítio doador, com maior tempo cirúrgico e maior morbidade decorrente do processo de remoção dos tecidos.

A reparação pode ser feita também utilizando materiais homólogos, quando haverá necessidade de realizar triagem de doadores para impedir a transmissão de doenças, além de se ter meios de conservação, distribuição e comercialização eficientes.

O uso de tecidos artificiais tem sido proposto mais recentemente e a engenharia de tecidos tem crescido muito, na tentativa de simplificar estas necessidades. Para a reparação do folheto posterior das pálpebras, o tecido a ser empregado deverá ter espessura e consistência semelhantes à do tarso, estrutura fibrocartilaginosa que forma o arcabouço das pálpebras,

além de respeitar os delicados tecidos da superfície ocular, uma vez que a parte mais interna do folheto posterior é a mucosa conjuntival.

Recentemente, estudo experimental sugeriu o uso de xenoenxerto de unha como repositores da placa tarsal (Özkaya *et al.*, 2012).

A pele acelular do porco foi usada no subcutâneo de cobaias e comparada com implante de Alloderm® (Lifecell, Branchburg – NJ, Estados Unidos da América), com boa integração; ambos, a pele porcina e o Alloderm sofreram absorção após certo período de observação (Hoyama *et al.*, 2005), o que poderia significar prejuízo ao emprego dos mesmos pela não permanência.

Enxertos compostos de derme acelular recoberta por retalho de pele adjacente foram testados com sucesso no reparo de feridas de espessura total das pálpebras de oito humanos (Gu *et al.*, 2012). Outro tipo de utilização sugerida para a derme acelular foi para o tratamento de entrópio cicatricial grave, com possibilidade de formação de granulomas ou redução do tamanho do enxerto (Gu *et al.*, 2009).

A Enduragen® (Tissue Science Laboratories, Aldershot, Reino Unido), um tipo de pele acelular porcina, foi utilizada com sucesso em 129 pálpebras de 69 pessoas como repositores do folheto posterior das pálpebras, com complicações observadas em 13 pálpebras, muito mais relacionadas com erros técnicos do que com algum tipo de reação que a pele artificial tenha provocado (Mc Cord *et al.*, 2008).

A reconstrução de espessura total da pálpebra foi feita com sucesso usando Integra® (Integra LifeSciences Corporation, Plainsboro, NJ, Estados Unidos da América), um tipo de pele artificial, composta por camadas de colágeno com glicosaminoglicanos e silicone (Thinda *et al.*, 2012).

A Apligraf® (Organogenesis Inc., Canton, MA, Estados Unidos da América), uma outra pele artificial, mostrou resultados favoráveis no reparo do entrópio cicatricial da ictiose congênita.

Desta forma, há claras evidências de que tecidos artificiais possam ser úteis para repor as importantes estruturas palpebrais.



### **1.5. Justificativa para a realização dos estudos**

As feridas extensas que ocorrem nas pálpebras, afetando o folheto anterior (pele e músculo orbicular) e/ou o folheto posterior das mesmas (tarso e conjuntiva), podem cursar com úlceras indolentes da córnea e, inclusive, causar a perda do olho devendo ser de pronto reparadas.

Apesar dos grandes avanços na engenharia de tecidos a serem empregados na reparação ou na regeneração tecidual, ainda há necessidade de avançar.

No Brasil, não há materiais nacionais disponíveis para uso no ambiente do Sistema Único de Saúde ou mesmo nos serviços particulares para este fim.

O emprego da celulose bacteriana, a Nanoskin®, pode significar o desenvolvimento de tecnologia acessível para o reparo de feridas extensas das pálpebras. Os impactos que poderão ocorrer no meio científico e na área econômica com a possibilidade de uso deste produto que utiliza tecnologia nacional aplicável na resolução de problemas de saúde para a população brasileira, podem ser extremamente positivos.

Desta forma, foram desenvolvidos estudos experimentais para avaliar o comportamento da Nanoskin®, na tentativa de embasar futuros estudos clínicos.

O biomaterial foi aplicado no subcutâneo e na superfície da pele de cobaias e os estudos serão apresentados a seguir, na forma de dois artigos.

A presente pesquisa recebeu auxílio FAPESP (Processo: **2011/21437-2**) para a sua realização.

## **2. OBJETIVO**

## **2. OBJETIVO**

O objetivo principal do presente estudo foi avaliar a biocompatibilidade da Nanoskin®, uma celulose bacteriana, com a intenção de procurar alternativas para a reposição de perdas teciduais extensas da pálpebra.

A Nanoskin® foi utilizada em dois sítios, no subcutâneo e na superfície da pele, avaliando-se a resposta tecidual ao biomaterial por meio de exames morfológicos.

### **3. ARTIGO 1:**

### 3. ARTIGO 1

#### IMPLANTE DE NANOSKIN® NO SUBCUTÂNEO DE COBAIAS

Trabalho realizado com auxílio FAPESP (Processo: 2011/21437-2)

**RESUMO:** o objetivo do presente estudo foi analisar o comportamento de uma celulose bacteriana, a Nanoskin®, implantada no subcutâneo de cobaias, com o objetivo de verificar possível uso para reparação de perdas do folheto posterior das pálpebras. Foram utilizadas 40 cobaias que receberam fragmento de 2X2 cm de Nanoskin® no subcutâneo da região dorsal. Os animais foram divididos em dois grupos: grupo 1 (G1), no qual foi utilizada a Nanoskin®; grupo 2 (G2), no qual foi utilizada a Nanoskin® revestida por camada de gelatina. Os animais permaneceram 7, 30, 90 ou 180 dias com o implante no subcutâneo, com observação clínica diária. Após o período idealizado para o estudo, os animais foram eutanasiados, a Nanoskin® removida e analisada por meio de exames ectoscópico, histológico, morfométrico e de microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados de G1 e de G2 foram semelhantes. A Nanoskin® quando implantada no subcutâneo induziu pequena reação inflamatória, tendo incitado a formação de uma delicada pseudocápsula ao seu redor. Os autores concluíram que houve boa integração tecidual. Estudos clínicos devem ser providenciados para confirmar que a Nanoskin® possa ser empregada como repositor do folheto posterior da pálpebra.

**Palavras-chave:** Nanoskin®, bioengenharia, celulose bacteriana, *Acetobacter xylinum*, nanocompostos, pálpebras, estudo experimental.

**ABSTRACT:** the aim of this study was to analyze the behavior of bacterial cellulose, Nanoskin® implanted subcutaneously in mice, in order to verify possible use to repair loss of the posterior lamellae of the eyelids. 40 guinea pigs were used and they received in the dorsal region a 2X2cm fragment of Nanoskin® subcutaneously. The animals were divided in two groups: group 1 (G1), which was used Nanoskin®; group 2 (G2), which was used Nanoskin® coated by gelatin layer. The animals remained 7, 30, 90 or 180 days with the implant subcutaneously, with daily clinical observation. After the period designed for the study, the animals were euthanized, the Nanoskin® was removed and analyzed by ectoscopic, histological, morphometric and transmission electron microscopy examination. The results of G1 and G2 were similar. The Nanoskin® when implanted subcutaneously induced little inflammatory reaction, and urged the formation of a delicate pseudocapsule around. The

authors concluded that there was good tissue integration. Clinical studies should be performed to confirm that the Nanoskin® can be used as replenishing the posterior eyelid leaflet.

**Keywords:** Nanoskin®, bioengineering, bacterial cellulose, *Acetobacter xylinum*, nanocomposites, eyelids, experimental study.

## INTRODUÇÃO

A pálpebra é composta basicamente por dois folhetos, um anterior, formado por pele e músculo e o outro posterior, formado pelo tarso e mucosa conjuntival. Os delicados tecidos palpebrais possuem características ímpares, como a movimentação constante e a capacidade das pálpebras de se abrir ou de se fechar em decorrência de estímulos específicos, exercendo importante proteção para o bulbo ocular (Gu *et al.*, 2012).

Devido à importância das pálpebras como parte do mecanismo protetor dos olhos, as perdas teciduais decorrentes de traumas ou da remoção de tumores extensos devem ser de pronto reparadas, utilizando material autólogo para repor a lamela anterior, na forma de enxertos e retalhos de pele, ou para repor a lamela posterior, como cartilagem auricular, mucosa bucal, periósteo, septo nasal e palato duro (Fernandes *et al.*, 2003). Para qualquer destas opções, haverá necessidade de se ter um sítio doador, com maior tempo cirúrgico e maior morbidade decorrente do processo de remoção dos tecidos. A reparação pode ser feita também com materiais homólogos, quando haverá necessidade de realizar testes para impedir a transmissão de doenças, além de se ter meios de conservação, distribuição e comercialização eficientes.

Recentemente, o uso de tecidos artificiais tem sido proposto e a engenharia de tecidos cresce muito, na tentativa de simplificar estas necessidades. Para a reparação do folheto posterior das pálpebras, o tecido a ser empregado deverá ter espessura e consistência semelhantes ao tarso, uma estrutura fibrocartilaginosa que forma o arcabouço das pálpebras, além de respeitar os delicados tecidos da superfície ocular, uma vez que a parte mais interna do folheto posterior é a mucosa conjuntival.

Há tentativas neste sentido. Estudo experimental sugeriu o uso de xenoenxerto de unha como repositores da placa tarsal (Özkaya *et al.*, 2012). A pele acelular do porco foi testada no subcutâneo de cobaias e comparada com implante de Alloderm® (Lifecell, Branchburg – NJ, Estados Unidos da América), com boa integração e com absorção de ambos os biomateriais após certo período de tempo (Hoyama *et al.*, 2005), o que poderia significar prejuízo ao emprego dos mesmos pela não permanência.

Enxertos compostos de derme acelular recoberta por retalho de pele adjacente foram testados com sucesso no reparo de feridas de espessura total das pálpebras de cinco humanos, dos oito operados; os três restantes apresentaram resultado aceitável com a

utilização dos enxertos (Gu *et al.*, 2012). Também o entrópio cicatricial grave pode ser reparado com o uso da derme acelular, com a possibilidade de formação de granulomas ou redução do tamanho do enxerto (Gu *et al.*, 2009).

A Enduragen® (Tissue Science Laboratories, Aldershot, Reino Unido), um tipo de pele acelular porcina, foi utilizada com sucesso em 129 pálpebras de 69 pessoas como repositor do folheto posterior das pálpebras, com complicações observadas em 13 pálpebras, muito mais relacionadas com erros técnicos do que com algum tipo de reação que a pele artificial possa ter provocado (Mc Cord *et al.*, 2008).

A reconstrução de espessura total da pálpebra foi feita com sucesso usando Integra® (Integra LifeSciences Corporation, Plainsboro, NJ, Estados Unidos da América), um tipo de pele artificial, composta por camadas de colágeno bovino com glicosaminoglicanos e silicone (Thinda *et al.*, 2012).

A Apligraf® (Organogenesis Inc., Canton, MA, Estados Unidos da América), uma outra pele artificial, mostrou resultados favoráveis no reparo do ectrópio cicatricial da ictiose congênita (Cullican & Custer, 2002).

Desta forma, há claras evidências de que os tecidos artificiais possam ser úteis para repor as importantes estruturas palpebrais, o que justifica a realização do presente estudo, desenvolvido com o objetivo de avaliar a biocompatibilidade da Nanoskin®, implantada no subcutâneo, com o intuito de verificar possível uso para reparação de perdas de tecidos do folheto posterior das pálpebras.

## **OBJETIVO**

Avaliar a biocompatibilidade do implante de Nanoskin®, revestido ou não por gelatina, a ser empregada no subcutâneo de cobaias, a fim de embasar possível utilização deste implante para a reparação do folheto posterior de pálpebras.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Estudo experimental, realizado nos Laboratórios Experimentais da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal



da referida entidade, seguindo as recomendações para uso de animais de experimentação em pesquisa.

## **1. Grupos e momentos experimentais**

Foram utilizadas 40 cobaias, do sexo masculino, com seis meses de idade, fornecidas pelo Biotério Central da UNESP, situado no Campus de Botucatu. Os animais foram alocados em dois grupos (G) experimentais:

**G1:** 20 animais receberam fragmento de Nanoskin® sem revestimento, medindo 2X2 cm, no subcutâneo da região dorsal, em um bolsão criado usando tesoura cirúrgica. A Nanoskin® foi fixada ao plano muscular da porção cranial por um ponto de fio monofilamento 6-0 (MonoNylon, Ethicon Incorporation- Johnson & Johnson do Brasil Indústria e Comércio de produtos para Saúde Ltda, São Paulo, SP, Brasil).

**G2:** 20 animais receberam a fragmento de Nanoskin® seguindo a mesma metodologia que a empregada no G1, tendo sido utilizado no G2 fragmento de Nanoskin® revestido por gelatina, medindo 2X2 cm, fixado ao plano muscular da região dorsal por um ponto de fio monofilamento 6-0 (MonoNylon, Ethicon Incorporation - Johnson & Johnson do Brasil Indústria e Comércio de produtos para saúde Ltda, São Paulo, SP, Brasil).

Cinco animais por grupo foram eutanasiados em quatro momentos (M) experimentais: 7 (M1), 30 (M2), 90 (M3) e 180 dias (M4) após a cirurgia.

## **2. Parâmetros estudados**

**2.1. Exame clínico:** realizado diariamente, observando-se a saúde dos animais, atividade na gaiola, alimentação e características da região suprajacente aos implantes, observando-se a aparência, presença de sinais infecciosos e estado do processo cicatricial.

**2.2. Exame histológico** – após o sacrifício dos animais, o material de estudo foi removido e imediatamente preparado para exame sob microscopia óptica, sendo avaliado em M1, M2, M3 e M4.

**2.3. Análise morfométrica dos cortes histológicos** – as lâminas histológicas foram analisadas morfometricamente, avaliando-se o percentual de células inflamatórias observadas no tecido ao redor da área operatória, a área de infiltrado celular inflamatório, a

área dos implantes e a espessura da pseudocápsula formada ao redor dos mesmos, avaliada nos momentos M1, M2, M3, M4, em ambos os grupos, G1 e G2, comparativamente.

**2.4. Exame ultraestrutural** – realizado sob microscopia eletrônica de transmissão, interessando a área que recebeu o implante, assim como ele próprio, avaliados em M1 e M4.

### **3. Biomaterial utilizado**

A celulose bacteriana possui uma estrutura única de nanofibrilas que determina suas propriedades físicas e mecânicas conferindo-lhe grande força tênsil, alto grau de polimerização e alto índice de cristalização (Olyveira *et al.*, 2011). A rede de nano e microfibrilas da celulose bacteriana cria uma extensa superfície, a qual permite a retenção de grande quantidade de água e importantes modificações em seu formato, sem que ocorra perda de suas características estruturais (Czaja *et al.*, 2007).

No presente estudo, foi empregada a Nanoskin® composta por uma membrana de celulose bacteriana desenvolvida pela Innovatecs (São Carlos, SP, Brasil), elaborada a partir de cultura de *Acetobacter xylinum*, uma bactéria gram-negativa, utilizando como substrato o chá verde.

Foram utilizados dois tipos de membranas: uma composta pela Nanoskin® sem revestimento e outra de mesma composição, revestida por uma camada fina de gelatina sem sabor da marca Royal (Kraft Foods, Chicago, Illinois, Estados Unidos da América). A membrana de Nanoskin® recebeu revestimento de gelatina em ambas as faces (superior e inferior). As membranas de Nanoskin® empregadas em G1 e em G2 foram embaladas manualmente e esterilizadas por meio de raios gama (Companhia Brasileira de Esterilização, SP, Brasil). Para o implante, as membranas foram recortadas em fragmentos de 2X2cm.

### **4. Descrição dos procedimentos anestésicos e cirúrgicos**

Todos os procedimentos foram realizados sob assepsia e antissepsia. Os animais foram anestesiados pela via intraperitoneal, utilizando-se Tiletamina associada ao Zolazepam (Zoletil®50 - Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, SP, Brasil), na dose de 50 mg/kg, complementada com 1/3 da dose inicial, quando necessário. Foi realizada tricotomia da região dorsal média, seguida da demarcação da área a ser operada, antissepsia com Povidine iodado 50 mg/ml (Prosigma - Farmácia de manipulação Prosigma Ltda. ME,

Cambui, MG, Brasil), seguindo-se da colocação de campos cirúrgicos estéreis. Foi realizada incisão linear de 2 cm de largura, na região médio-dorsal, produzida por bisturi lâmina 15. Em seguida, o implante de Nanoskin®, medindo 2X2 cm, foi colocado no bolsão subcutâneo na região cranial à incisão, com fixação do mesmo ao plano muscular por um ponto de fio monofilamento 6-0 (MonoNylon, Ethicon Incorporation- Johnson & Johnson do Brasil Indústria e Comércio de produtos para Saúde Ltda, São Paulo, SP, Brasil).

No final do experimento, administrou-se antibiótico Baytril® (Bayer S.A., São Paulo, SP, Brasil) 10%, via intraperitoneal, na dose de 2,5 mg/kg e os animais foram alocados em gaiolas individuais, nas quais permaneceram até o momento da eutanásia, recebendo água e ração *ad libitum*.

Transcorrido o tempo idealizado para o estudo, os animais foram eutanasiados utilizando-se sobredose de Zoletil® 50 (Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, SP, Brasil) via intraperitoneal. Os procedimentos de remoção dos espécimes e preparo para exame ocorreu logo em seguida à eutanásia.

### **5. Preparo do material para exame histológico**

As amostras removidas da região dorsal das cobaias foram fixadas em solução de formol tamponado a 10% por 3 dias, após o que foram cortadas e introduzidas em cassetes individuais para processamento histológico em autotécnico (Leica TP 1020, Nussloch, Alemanha), sendo desidratadas em série crescente de álcoois (80-100%) em 6 cubas, diafanizadas em 3 cubas de Xilol, por fim, 3 cubas de parafina (temperatura entre 50°C e 60°C), permanecendo por uma hora em cada uma dessas cubas. Em seguida, foram incluídas em parafina (Leica EG 1160, Nussloch, Alemanha) e cortadas com espessura de 4 µm, em micrótomo rotativo (Leica RM 2155, Nussloch, Alemanha). O material foi colocado em álcool 30%, seguido de banho-Maria, em temperatura a 50°C para estiramento, sendo colocado em lâminas (Knittel, Braunschweig, Alemanha), levado a estufa a 60°C por aproximadamente uma hora para desparafinizar. Finalmente colocado no aparelho Auto-Stainer XL (Leica, Nussloch, Alemanha), para coloração pela técnica de Hematoxilina (QEEL - Química especializada Erich Ltda., SP, Brasil) e Eosina (Merck, Darmstadt, Alemanha), sendo montadas lâminas no aparelho (Leica CV 5000, Nussloch, Alemanha), recobertas por lamínulas (Knittel, Braunschweig, Alemanha).

A montagem das lâminas seguiu sistemática para exames morfométricos, tendo sido considerado o primeiro corte, desprezados os próximos cinco e coletado o sexto e assim sucessivamente, até que cada lâmina de cada material a ser examinado contivesse pelo menos cinco cortes.

As imagens das lâminas histológicas foram captadas e analisadas utilizando microscópio óptico Axioskop 40, Zeiss, Jena, Alemanha, com sistema para captação digital de imagem Axio Vision 4.7.2 (Zeiss, Jena, Alemanha).

## **6. Exame morfométrico**

Foram quantificados os fenômenos de reparação por meio de captura de imagens de cada lâmina, no aumento padronizado de 40 vezes, utilizando-se 20 fotos de campos de, no máximo, 500 micrômetros, levando-se em conta os aumentos utilizados para os valores finais.

## **7. Preparo para exame ultraestrutural**

Espécimes de 7 dias (M1) e 180 dias (M4) foram preparados para exame ultraestrutural como segue: as amostras coletadas imediatamente após a eutanásia dos animais foram fixadas em solução Karnovsky. Realizados cortes longitudinais de até 2 mm<sup>3</sup> sobre cera de dentista branca, em gota de solução fixadora, com uma lâmina de barbear da marca Gillette (Procter & Gamble, Cincinnati, Estados Unidos da América) e um microscópio óptico de luz. As amostras foram retiradas do fixador, lavadas por três vezes de cinco minutos, em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3. Pós-fixação em tetróxido de ósmio 1%, em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3, por 2 horas. Lavagem do material, três vezes de 10 minutos, em água destilada. Imersão do material em acetato de uranila 0,5%, em água destilada, por duas horas. Desidratação em série crescente de acetonas (50, 70, 90 e 100%), seguida de mergulho dos fragmentos em mistura 1:1 de araldite/acetona 100%, por 12 horas, em temperatura ambiente. Colocação do material em resina pura por uma hora, em estufa a 37°C. Em seguida, as amostras foram emblocadas em molde apropriado e levadas para estufa a 60°C, por dois a três dias. Os blocos foram então trimados e realizados cortes semifinos (0,5 µm) para escolha dos locais de interesse, com novas trimagens para reduzir ainda mais a superfície dos mesmos para a realização de cortes ultrafinos (aproximadamente 90 nm), que foram colocados em grades apropriadas e contrastados com solução saturada de acetato de uranila, em álcool 50%, por 20 minutos. Por fim, os cortes foram contrastados com citrato de chumbo, por 10 minutos. A análise e captura de imagens digitais das amostras foram realizadas no Centro de Microscopia

Eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu, utilizando os microscópios eletrônicos de transmissão Tecnai Spirit (FEI Company, Hillsboro, Estados Unidos da América) e CM 100 (Philips, Amsterdã, Países Baixos).

## **8. Análise estatística dos resultados morfométricos**

Após as avaliações, os dados foram transferidos para Tabela Excel, sendo submetidos à análise estatística, usando a técnica da análise de variância não paramétrica para o modelo com dois fatores, complementada com o teste de comparações múltiplas de Dunn (Norman & Streiner, 2008), considerando o nível de significância de 5%.

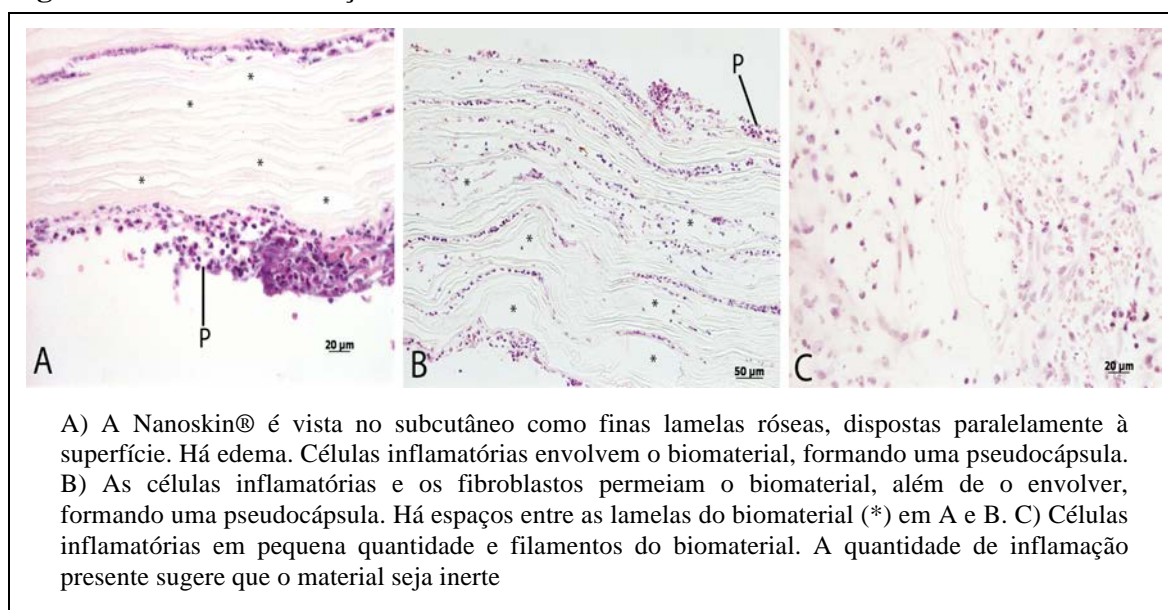
## **RESULTADOS**

**1. Exame ectoscópico:** apenas um animal foi a óbito logo depois da cirurgia, provavelmente devido a sensibilidade ao anestésico. Todos os demais evoluíram bem, sem sinais inflamatórios ou exposição dos implantes. Após a eutanásia e abertura do sítio de implantação do biomaterial, a Nanoskin® foi observada como um material aparentemente inerte, constituído por camadas que apresentavam espaços entre si. A Nanoskin® não foi encontrada em dois animais de G1, e em três do G2, no momento M4 (180 dias), e em um animal de G1, em M3 (90 dias).

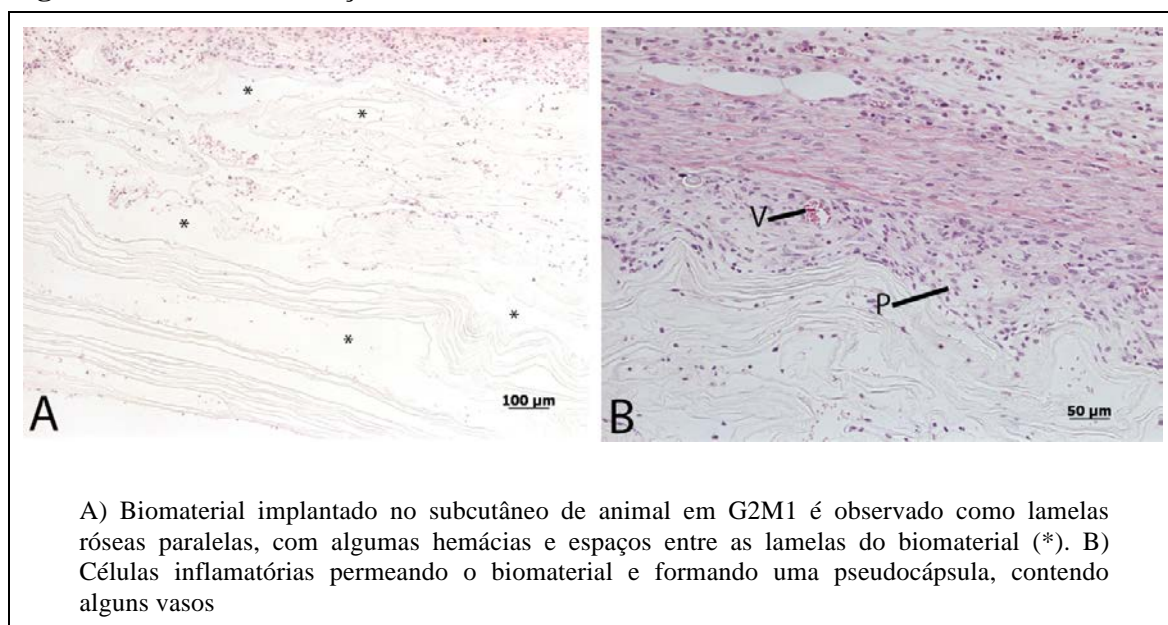
### **2. Exame microscópico:**

**G1M1:** o exame microscópico confirmou que o implante colocado no subcutâneo, entre o estroma e a camada muscular, era inerte, observando-se ao redor do mesmo uma pseudocápsula (Figura 1A), formada por fibroblastos jovens e células inflamatórias, com predomínio de neutrófilos. A Nanoskin® apresentava-se como múltiplas camadas, dispostas paralelamente à superfície, com pequenos espaços regulares entre as camadas, preenchidos por escassos fibroblastos, poucas células inflamatórias e hemácias, algumas vezes formando cordões celulares. Presença de vasos contendo hemácias em pequena quantidade. (Figuras 1B,C).

**G2M1:** exame histológico muito semelhante ao descrito para o G1 (Figuras 2 A,B).

**Figura 1-** Fotodocumentação de animal de G1M1

Fonte: Material elaborado pelo autor

**Figura 2-** Fotodocumentação de animal de G2M1

Fonte: Material elaborado pelo autor

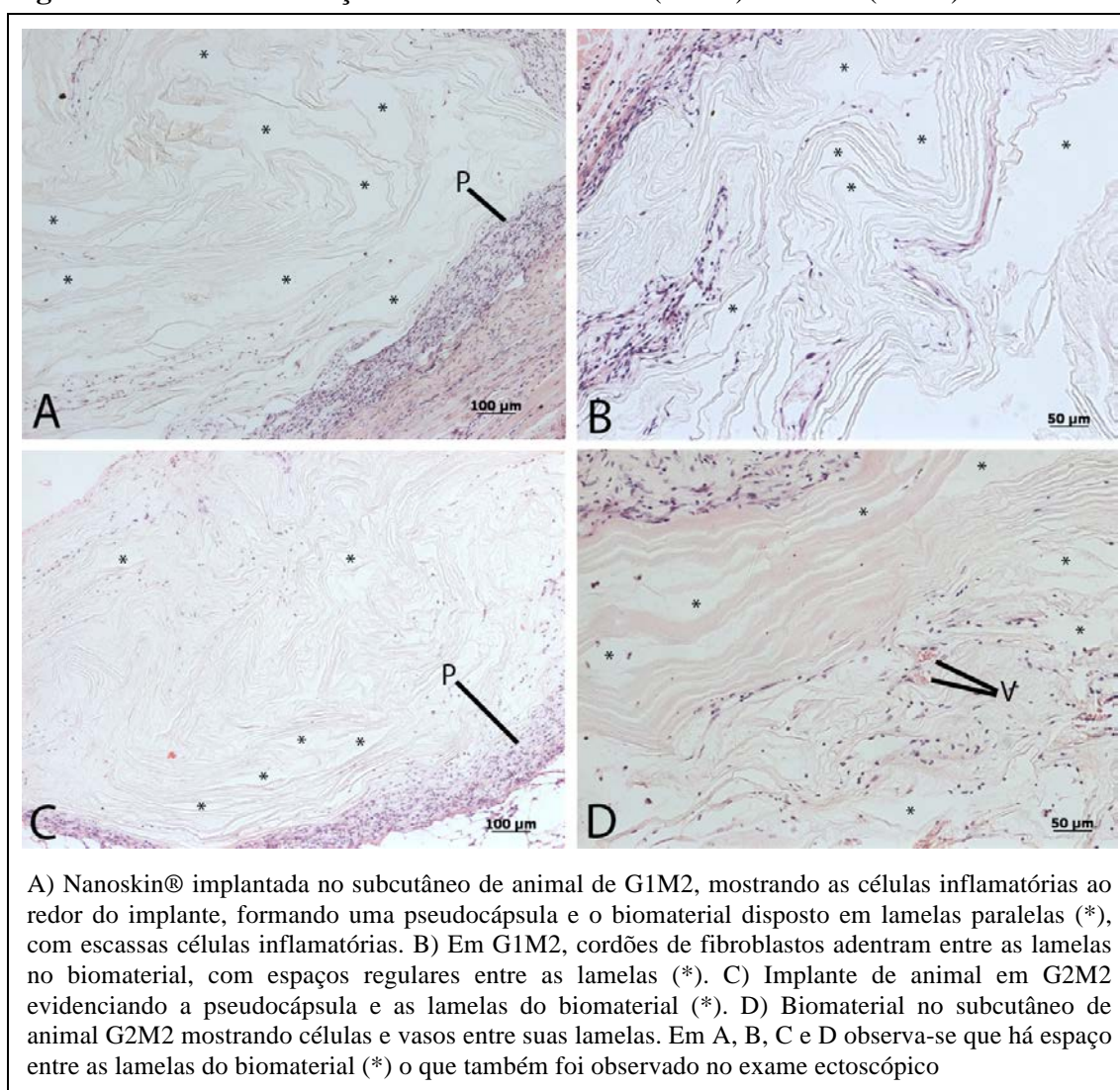
**G1M2:** houve amadurecimento do processo cicatricial, com escassa reação inflamatória, principalmente ao redor e também no interior do biomaterial, com redução do edema e permeação do mesmo por células de defesa e fibroblastos maduros (Figuras 3 A,B).

**G2M2:** não foram observadas diferenças com relação aos animais de G1M2 (Figuras 3 C,D).

**G1M3:** o processo de reparação se tornou maduro e a celularidade entre as lamelas do biomaterial foi maior que o observado nos animais do G2M3 (Figuras 4 A,B).

**G2M3:** a celularidade entre as lamelas do biomaterial foi menor que em G1M3 (Figuras 4 C,D).

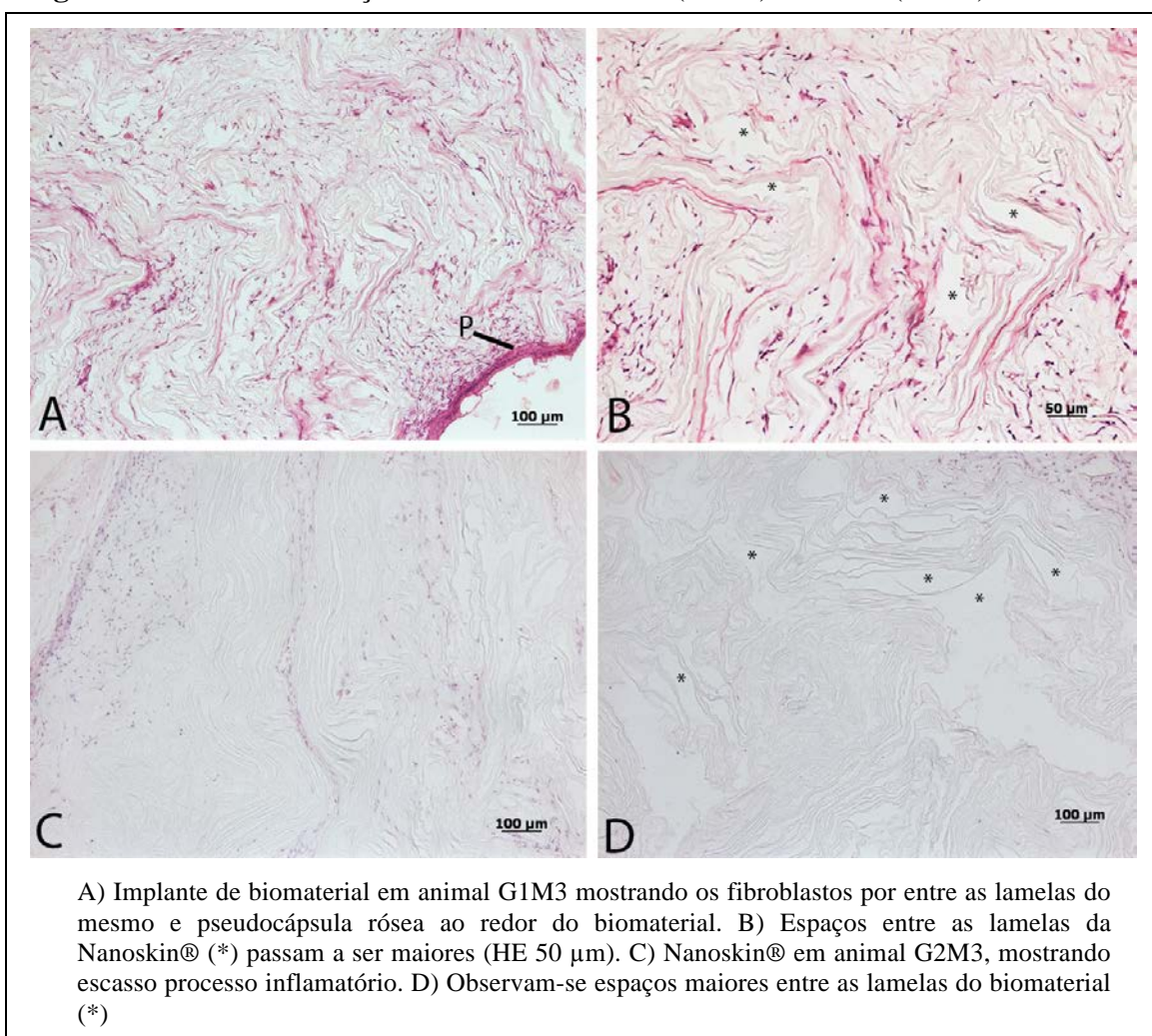
**Figura 3-** Fotodocumentação de animal de G1M2 (A e B) e G2M2 (C e D)



Fonte: Material elaborado pelo autor



**Figura 4-** Fotodocumentação de animal de G1M3 (A e B) e G2M3 (C e D)



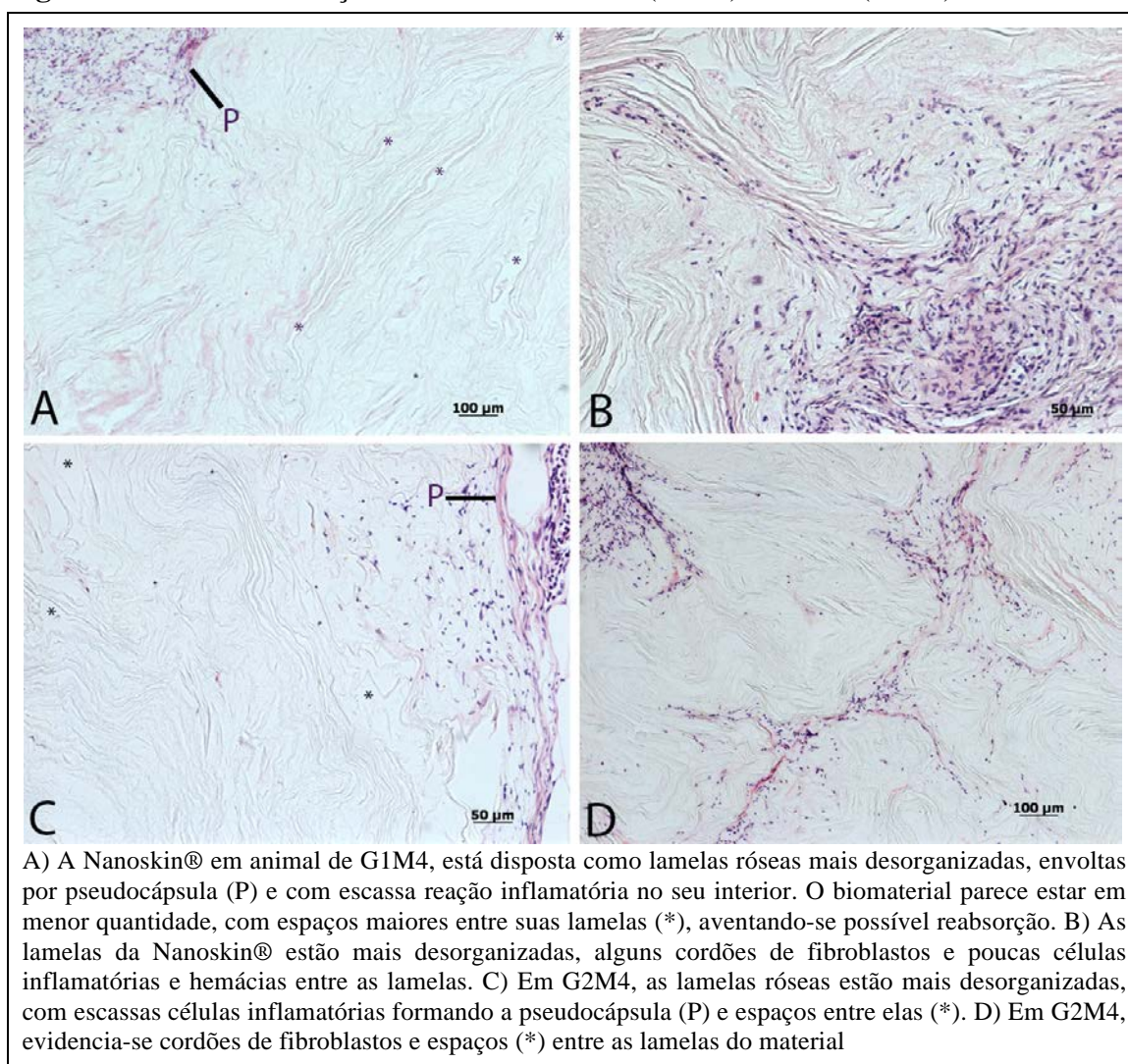
Fonte: Material elaborado pelo autor

**G1M4:** biomaterial sem gel no subcutâneo, 180 dias após a implantação, mostra-se bastante inerte, com invasão de células do hospedeiro entre as lamelas, o que esteve presente durante todo o período experimental. Importante ressaltar que, apesar dos espaços maiores entre as lamelas do biomaterial e da perda do paralelismo entre as lamelas, não foram observadas células gigantes e a reação inflamatória se manteve muito escassa durante todo o experimento (Figura 5A,B). Pseudocápsula delicada rodeava todo o biomaterial, composta por fibroblastos e células inflamatórias (Figura 5A).

**G2M4:** não foram observadas diferenças com relação aos animais de G1M4 (Figuras 5 C,D).



**Figura 5-** Fotodocumentação de animal de G1M4 (A e B) e G2M4 (C e D)



Fonte: Material elaborado pelo autor

### 3. Exame morfométrico:

A Tabela 1 mostra o resultado do exame morfométrico referente à porcentagem e a área de inflamação observada ao se implantar o biomaterial no subcutâneo de cobaias. A inflamação foi maior no início do experimento e decaiu nos momentos finais (M2, M3 e M4) em ambos os grupos, com significância apenas no G1 que apresentou maior inflamação nos momentos iniciais ( $p < 0,5$ ). No G2, observou-se um equilíbrio em todos os momentos nas duas variáveis (porcentagem de células inflamatórias e área de inflamação), com menor inflamação inicial e não ocorrendo o decréscimo significativo da inflamação nos momentos finais como em G1 ( $p > 0,5$ ). Comparando-se os valores de G1 e G2, nos diversos momentos experimentais, houve equilíbrio entre ambos, sem diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 1-** Mediana (valores mínimos e máximos) da porcentagem e área de inflamação (valores mínimos e máximos) após a implantação da Nanoskin®

Inflamação	Grupo	Momento de Eutanásia				Valor p
		†M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	
%	*G1	6,6 (3,4;7,8)	2,6(2,1;3,1)	1,8(1,1;2,5)	3,0(2,8; 3,2)	<b>p&lt;0,05</b>
	**G2	3,2(2,3;9,1)	2,6(2,0;3,2)	2,4(2,3;2,4)	2,2(1,6;2,8)	<b>p&gt;0,05</b>
Valor p		<b>p&gt;0,05</b>	<b>p&gt;0,05</b>	<b>p&gt;0,05</b>	<b>p&gt;0,05</b>	
Área	G1	20385,4(10511,7;24063,3)	7931,3(6431,3;9431,3)	5964,1(3304,3;7658,6)	9277,9(8733,5;9822,0)	<b>p&lt;0,05</b>
	G2	9744,3(7124,0;28082,6)	7931,3(6731,3;9131,3)	7294,0 (7109,5;7478,6)	6763,1(4883,4;8642,7)	<b>p&gt;0,05</b>
Valor p		<b>p&gt;0,05</b>	<b>p&gt;0,05</b>	<b>p&gt;0,05</b>	<b>p&gt;0,05</b>	

\* G1 (sem cobertura de gelatina) e \*\*G2 (com cobertura de gelatina)

†M (Momento)1 (7dias), M2 (30 dias), M3 (90 dias) e M4 (180 dias)

#### 4. Exame ultraestrutural:

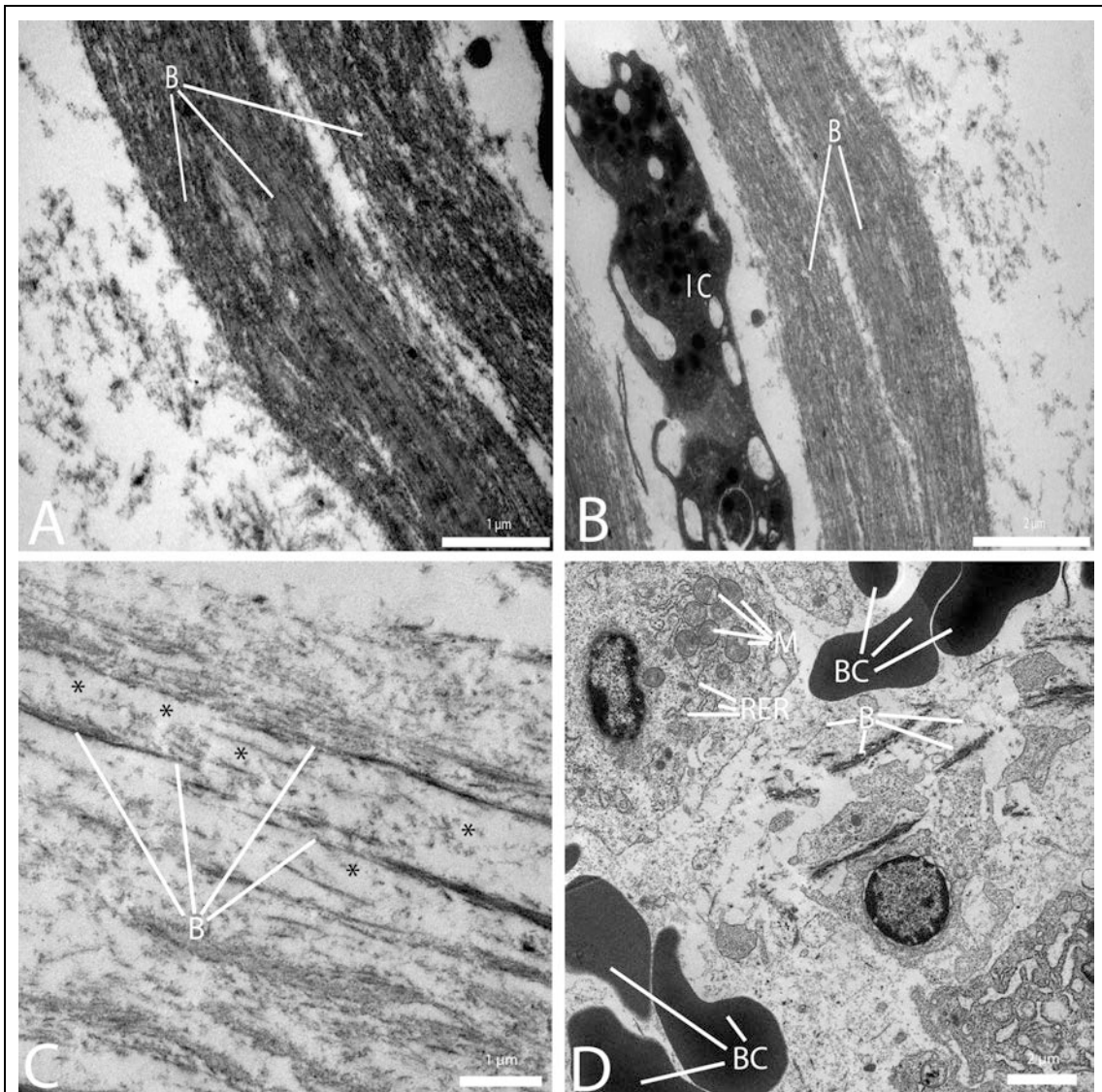
**G1M1:** a Nanoskin® é vista como feixes eletrodensos dispostos paralelamente entre si, (Figura 6A), permeados por células inflamatórias (Figura 6B).

**G2M1:** o acréscimo do envoltório de gelatina sobre o biomaterial mostrou resposta tecidual do hospedeiro semelhante ao que foi observado quando este revestimento esteve ausente (G1) (Figuras 6 C,D). O biomaterial continuou sendo identificado como feixes de finos filamentos eletrodensos, com maior espaçamento entre estes filamentos quando comparados aos observados em G1M1 (Figura 6C). Presença de hemácias em vasos sanguíneos de pequeno calibre e fibroblastos permeando as lamelas do biomaterial (Figura 6D).

**G1M4:** após 6 meses, o biomaterial permaneceu inerte, com escassa reação inflamatória, com morfologia ultraestrutural semelhante à observada em G1M1, porém exibindo aspecto mais filamentososo, com espaçamentos irregulares entre os finos filamentos eletrodensos paralelos entre si e permeados por fibroblastos (Figura 7A).

**G2M4:** não houve diferença entre G1 e G2, em M4 (Figuras 7A,B).

**Figura 6-** Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de animal de G1M1 e G2M1

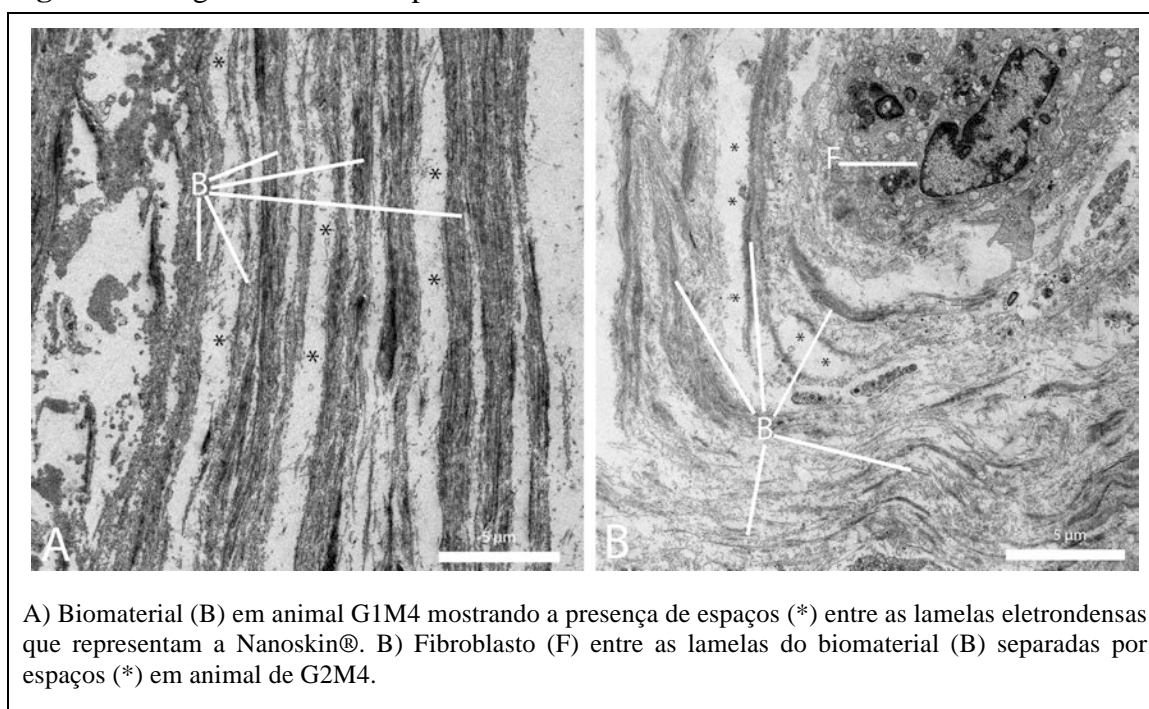


A) Biomaterial (B) implantado no subcutâneo de animal de G1M1 evidenciando os espaços (\*) entre os filamentos que compõem a Nanoskin®. B) Biomaterial (B) em G1M1 com lamelas permeadas por células inflamatórias (IC). C) Biomaterial (B) em animal de G2M1, visto como finas lamelas, evidenciando os espaçamentos entre elas (\*). D) Nanoskin® no subcutâneo de G2M1, com presença de hemácias (BC) e fibroblastos, contendo organelas (M=mitocôndrias, RER= retículo endoplasmático rugoso) permeando o biomaterial (B)

Fonte: Material elaborado pelo autor



**Figura 7-** Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de animal de G1M4 e G2M4



Fonte: Material elaborado pelo autor

## DISCUSSÃO

O presente estudo foi realizado visando observar o comportamento da Nanoskin® quando implantada no subcutâneo, a fim de propor, futuramente, seu emprego para a reparação de tecidos profundos ou do folheto posterior da pálpebra.

A Nanoskin® implantada no subcutâneo da região dorsal de cobaias mostrou-se inerte, não tendo ocorrido casos de extrusão ou inflamação em nenhum dos animais. O fato de não se ter encontrado o biomaterial em alguns animais provavelmente está relacionado à migração, que pode ter ocorrido apesar da fixação da membrana de Nanoskin® aos tecidos adjacentes por meio de fio de sutura, devido ao movimento constante da coluna vertebral e da musculatura adjacente.

Foram utilizados dois diferentes tipos de biomateriais, ambos compostos por membrana de Nanoskin®, um revestido por uma camada de gelatina (G2) e outro sem (G1). O exame histológico constatou que em ambos a reação inflamatória ocorreu da mesma forma. O exame morfométrico dos cortes histológicos mostrou que o G1 teve maior inflamação no primeiro momento de observação, porém sem diferença estatística. A inflamação em G1 decaiu de M1 em relação aos outros momentos, com diferença estatística. O G1 foi o grupo

que recebeu a Nanoskin® não revestida por gelatina e o afluxo maior de células inflamatórias para dentro das lamelas do biomaterial pode ter sido facilitado por este fato. Nos demais momentos, a reação inflamatória é sempre menor, em decorrência da estabilização dos processos inflamatórios que normalmente ocorrem durante a cicatrização. Ou seja, podemos inferir que a gelatina tenha significado uma barreira para o afluxo de células do hospedeiro. Porém, não interferiu negativamente no processo inflamatório ou na integração do implante com o hospedeiro.

O acréscimo do envoltório de gelatina sobre a Nanoskin® mostrou resultados bastante semelhantes com o material não revestido. A gelatina foi adicionada pensando-se que poderia ser útil para tornar menos traumática a face da Nanoskin® que ficaria voltada para o olho, no caso do emprego da mesma como repositor do folheto palpebral posterior, com menor chance de lesão aos delicados tecidos oculares por possível aspereza da Nanoskin®.

Outros pesquisadores também testaram biocompatibilidade *in vivo* da celulose bacteriana derivada do *Acetobacter xylinum*, colocada no subcutâneo do dorso de ratos e encontraram resultados promissores, com ausência de sinais macroscópicos de inflamação aguda como edema, eritema e exsudação e após quatro semanas não houve sinais de inflamação crônica, fibrose, formação de cápsula ou reação do tipo corpo estranho (Helenius *et al.*, 2006), achados semelhantes aos nossos, exceto pela não observação de pseudocápsula por aqueles autores, cujo tempo de observação foi muito inferior (1, 4 e 12 semanas) ao utilizado no presente estudo.

A formação de pseudocápsula ao redor do implante de Nanoskin® ocorreu como é observado quando qualquer produto é introduzido em um organismo vivo e teve espessura irregular, que pode ter decorrido do fato da mobilização do implante no subcutâneo ser mais proeminente na face superior do implante, quando o mesmo interfaceou com a musculatura.

A celulose bacteriana apresenta estrutura morfológica de nanofibrilas ou lamelas semelhantes à rede de colágeno, ou seja, semelhantes à matriz extracelular (Wiperman *et al.*, 2009), permitindo que as células ao redor possam utilizá-la como suporte para regeneração, como também pudemos observar, quando entre as camadas da celulose bacteriana colocada no subcutâneo houve permeação de fibroblastos, células inflamatórias e hemácias, além de neovasos ao redor ou mesmo entre as camadas do implante.

Os neovasos são importantes para a cicatrização e afluxo de células para o local de lesão, influenciando diretamente no processo de reparação tecidual e crescimento de tecido adjacente. Assim, observando os diferentes momentos experimentais, é possível reconhecer que o tecido neoformado, gradativa e lentamente, vai se tornando preenchido por fibroblastos e vasos. Ou seja, ocorre o povoamento do biomaterial que funciona como um substrato, de forma que o tecido neoformado, considerado como o repositor do volume perdido, é composto de células do hospedeiro. O estudo de Helenius *et al.* (2005) demonstrou a integração do implante de celulose bacteriana ao tecido neoformado no subcutâneo de ratos Wistar.

Outros estudos utilizando a celulose bacteriana para reposição de tecidos tais como cartilagem, vasos e ossos mostraram resultados promissores (Fricain *et al.*, 2012; Andrade *et al.*, 2010; Andersson *et al.*, 2010). A celulose bacteriana utilizada para retalho vascular em porcos após 12 semanas mostrou boa regeneração dos tecidos vizinhos, com completa endotelização da parede vascular e fluxo satisfatório, sem sinais de trombose (Wipperman *et al.*, 2009). A celulose bacteriana derivada do *Gluconacetobacter xylinum* foi também utilizada como matriz para a regeneração de cartilagem (Pretzel *et al.*, 2013).

Importante seria estabelecer se os resultados são permanentes, uma vez que os espaços entre as lamelas do biomaterial parecem aumentar com o passar do tempo, mesmo sem a observação de possível fagocitose, uma vez que não foram observadas células gigantes. Desta forma, caso ocorra à reabsorção da Nanoskin®, o mecanismo ainda precisaria ser esclarecido.

## CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, os autores concluem que a celulose bacteriana é bastante inerte, incita escassa reação tecidual e pode ser utilizada associada a revestimento de gelatina. Estudos clínicos devem ser providenciados para avançar no intuito de confirmar seu uso como repositor do folheto posterior da pálpebra.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andersson J, Stenhamre H, Bäckdahl H, Gatenholm P. Behavior of human chondrocytes in engineered porous bacterial cellulose scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. 2010; 94A(4):1124-32.

Andrade FK, Costa R, Domingues L, Soares R, Gama M. Improving bacterial cellulose for blood vessel replacement: Functionalization with a chimeric protein containing a cellulose-binding module and an adhesion peptide. *Acta Biomater*. 2010; 6:4034-41.

Culican SM, Custer PL. Repair of cicatricial ectropion in an infant with harlequin ichthyosis using engineered human skin. *Am J Ophthalmol*. 2002; 134(3):442-3.

Czaja WK, Young DJ, Kawecki M, Brown Jr RM. The Future Prospects of Microbial Cellulose in Biomedical Applications. *Biomacromolecules*. 2007; 8(1):1-12.

Fernandes JBV, Nunes TP, Matayoshi S, Moura EM. Enxerto de mucosa do palato duro: complicações na área doadora – relato de casos. *Arq Bras Oftalmol*. 2003; 66:884-6.

Fricain JC, Granja PL, Barbosa MA, de Jéso B, Barthe N, Baquey C. Cellulose phosphates as biomaterials. In vivo biocompatibility studies. *Biomaterials*. 2002; 23: 971-80.

Gu J, Wang Z, Sun M, Yuan J, Chen J. Posterior lamellar eyelid reconstruction with acellular dermis allograft in severe cicatricial entropion. *Ann Plast Surg*. 2009; 62(3):268-74.

Gu J, Zhai J, Chen J. The use of acellular human dermis composite graft for upper eyelid reconstruction in ocular injury. *J Trauma Acute Care Surg*. 2012; 72(1):288-92.

Helenius G, Bäckdahl H, Bodin A, Nannmark U, Gatenholm P, Risberg B. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. *J Biomed Mater Res A*. 2006; 76(2):431-8.

Hoyama E, Schellini SA, Pellizon CH, Marques MEA, Padovanni CR, Rossa R. Tratamento de feridas cutâneas extensas usando tecido dérmico acelular porcino com e sem cobertura impermeável. *Ann Bras Dermatol*. 2005; 80(4):369-74.

McCord C, Nahai FR, Codner MA, Nahai F, Hester TR. Use of porcine acellular dermal matrix (Enduragen) grafts in eyelids: a review of 69 patients and 129 eyelids. *Plast Reconstr Surg*. 2008; 122(4):1206-13.

Norman GR, Streiner DL. *Biostatistics: the bare essentials*. 3a ed. St Louis: Mosby Year Book; 2008.

Olyveira GM, Costa LMM, Basmaji P, Xavier Filho L. Bacterial cellulose for medicine regenerative. *J Nanotech Eng Med*. 2011; 1-9.

Özkaya Ö, Karşidag S, Egemen O, Akçal AÖ, Şirvan S, Kabukçuoglu F. Comparative analysis of the nail xenografts with cartilage autografts in eyelid reconstruction. *J Craniofac Surg*. 2012; 23(4):1028-31.

Pretzel D, Linss S, Ahrem H, Endres M, Kaps C, Klemm D, et al. A novel in vitro bovine cartilage punch model for assessing the regeneration of focal cartilage defects with biocompatible bacterial nanocellulose. *Arthritis Res Ther*. 2013; 15(3):R59.

Thinda S, Wright HV, Mawn LA. Integra bilayer matrix wound dressing closure of large periorbital traumatic wound. *Arch Ophthalmol*. 2012; 130(2):217-9.

Wipperman J, Schumann D, Klemm D, Kohsmel H, Salehi-Gelani S, Wahlers T. Preliminary results of small arterial substitute performed with a new cylindrical biomaterial composed of bacterial cellulose. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2009;37(5):592-6.



## **4. ARTIGO 2**

#### 4. ARTIGO 2:

### NANOSKIN® PARA REPARAÇÃO DE FERIDAS EXTENSAS DA PELE

Trabalho realizado com auxílio FAPESP (Processo: 2011/21437-2)

#### RESUMO:

**Objetivo:** avaliar uma celulose bacteriana, a Nanoskin®, para o tratamento de feridas extensas da pele.

**Método:** estudo prospectivo, utilizando 40 cobaias, das quais foi removido um retângulo de pele de espessura total da região mediana dorsal, medindo 2x4cm. O ferimento foi recoberto por fragmento de pele autóloga de 2X2cm na porção cranial e por enxerto de Nanoskin® sem (grupo G1) ou com cobertura de gelatina (G2), medindo 2X2 cm, suturado na parte caudal da ferida cirúrgica. Após o procedimento cirúrgico os animais foram acompanhados com exame ectoscópico e eutanasiados depois de 7, 30, 90 e 180 dias. Imediatamente após a eutanásia, a área operada foi tricotomizada, fotodocumentada e o material de estudo foi removido, sendo preparado para exame morfológico, morfométrico e ultraestrutural.

**Resultados:** os animais evoluíram bem durante todo o experimento. A cicatrização seguiu padrão centrípeto e ocorreu nas áreas que receberam o enxerto autólogo ou a Nanoskin®, em G1 e G2, com as mesmas características, com reação inflamatória mais acentuada no início do experimento e melhora nos demais momentos.

**Conclusão:** não houve diferença na cicatrização da ferida quando se utilizou pele autóloga ou Nanoskin® sem (G1) ou com gel (G2).O padrão de cicatrização sugere que a Nanoskin® tenha funcionado como um curativo biológico.

**Palavras-chave:** Nanoskin®, nanocomposto, cicatrização, cobaias, celulose bacteriana, *Acetobacter xylinum*, estudo experimental, estudo morfológico.

#### ABSTRACT:

**Purpose:** to evaluate a bacterial cellulose, the Nanoskin®, for the treatment of extensive skin wounds.

**Method:** a prospective study using 40 guinea pigs was done. A total thickness skin rectangle of the median dorsal region measuring 2x4cm was removed. The wound was covered with a 2x2 cm fragment of autologous skin in the cranial portion and by a 2X2cm fragment of Nanoskin® graft without (group G 1) or gelatin coverage (G2) sutured in the caudal part of the surgical wound. The animals were followed after surgery with ectoscopy examination and euthanized after 7, 30, 90 and 180 days. Immediately after euthanasia, the operated area was shaved, documented by photos and the studied area was removed, being prepared for morphological, morphometric and ultrastructural examination.

**Results:** the animals evolved well throughout the experiment. The healing followed a centripetal pattern and it occurred in areas that received the autologous graft or the Nanoskin®, in G1 and G2, with the same characteristics, with more pronounced inflammatory reaction at the beginning of the experiment and gradual improvement in other times.

**Conclusion:** there was no difference in wound healing using autologous skin or the Nanoskin® without (G1) or with gelatin coverage (G2). The pattern of healing suggests that the Nanoskin® has worked as a biological dressing.

**Keywords:** Nanoskin®, nanocomposite, healing, guinea pigs, bacterial cellulose, *Acetobacter xylinum*, experimental study, morphological study

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos estão se multiplicando as oportunidades criadas pelos tecidos artificiais para o tratamento de feridas extensas da pele (Fernandes *et al.*, 2003). As peles artificiais disponíveis no mercado não são de produção brasileira, o que dificulta o emprego devido ao preço. Outro fato importante é que os recentes avanços em bioengenharia de tecidos artificiais ainda não trouxeram respostas definitivas, havendo necessidade de avançar nesta área do conhecimento.

Tecidos acelulares, como o Alloderm® (Lifecell, Branchburg – NJ, Estados Unidos da América) e o Xenoderma® (Homus Biotecnologia - SP, Brasil), foram utilizados experimentalmente para reparação de hérnias ventrais de cobaias (Campbell *et al.*, 2012) e reposição da pele do dorso de cobaias (Hoyama *et al.*, 2005). O Alloderm é derivado de tecidos humanos e o segundo, derivado de pele porcina. Em ambos as células que são a parte antigênica do tecido são removidas, restando apenas o arcabouço acelular. Com ambos os tecidos acelulares houve boa integração tecidual (Hoyama *et al.*, 2005; Campbell *et al.*, 2012). O Xenoderma® foi usado sem revestimento ou recoberto por filmes impermeáveis, notando-se que desta última forma a cicatrização da superfície se fez de forma mais eficiente (Hoyama *et al.*, 2005).

O presente estudo foi desenvolvido utilizando uma película de celulose, a Nanoskin®, desenvolvida pela Innovatecs (São Carlos, SP, Brasil), por meio de um processo biotecnológico. Trata-se de um nanocomposto formado por uma mistura de bactérias gram-negativas, o *Acetobacter xylinum* (cepa superprodutora), em meio de cultura contendo leveduras, que leva, em média, de 20 a 28 dias para produzir membranas hidratadas de celulose bacteriana, por mecanismo biológico. Vários tipos de substrato podem ser utilizados para a obtenção dos cultivos, entre os quais o chá verde. O produto desenvolvido tem como características ser biodegradável, biocompatível, atóxico e não alergênico. Sua microporosidade reduz a perda de água e conserva a umidade adequada, permite a oxigenação da área lesada, e cria o ambiente ideal de granulação e reepitelização (Basmaji, 2011; Costa *et al.*, 2012).

As membranas produzidas podem ser cortadas e trituradas em processador e desidratadas até chegar na textura desejada. Em seguida, a celulose é embalada manualmente em envelopes com grau cirúrgico e enviada para esterilização através de raios gama com carga de 25 kg, na Companhia Brasileira de Esterilização (Cotia, SP, Brasil). O processo de

esterilização utilizado é bastante criterioso, sendo que inicialmente o produto é submetido a diversas avaliações para definição das doses de irradiação adequadas.

O processo de produção da Nanoskin® é pouco dispendioso, o que pode ser muito interessante no tocante a colocá-lo no mercado a preços acessíveis.

A celulose bacteriana é um nanocomposto que pode ser empregado não só como curativo biológico, mas também como pele artificial (Petersen & Gatenholm, 2011; Czaja *et al.*, 2007), havendo necessidade de estudos que comprovem esta hipótese.

## **OBJETIVO**

O objetivo do presente estudo foi avaliar a biocompatibilidade da Nanoskin® para o tratamento de feridas extensas da pele.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Este estudo experimental foi realizado nos Laboratórios Experimentais da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, após aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da referida entidade, visando à análise da cicatrização de feridas extensas da pele.

### **1. Biomaterial utilizado**

Foram utilizados dois tipos de membranas de Nanoskin®: uma composta pela Nanoskin® sem revestimento e outra de mesma composição, revestida por uma camada fina de gelatina sem sabor da marca Royal (Kraft Foods, Chicago, Illinois, Estados Unidos da América). A membrana de celulose recebeu revestimento de gelatina em ambas as faces (superior e inferior). As membranas de Nanoskin® empregadas em G1 e em G2 foram embaladas manualmente e esterilizadas por meio de raios gama (Companhia Brasileira de Esterilização- Cotia- SP, Brasil). Para o implante, as membranas foram recortadas em fragmentos de 2X2cm.

### **2. Grupos e procedimentos experimentais**

Foram utilizadas 40 cobaias do sexo masculino, com seis meses de idade, fornecidas pelo Biotério Central da UNESP, situado no Campus de Botucatu. Todas as

cobaias tiveram removido um fragmento retangular de pele e subcutâneo da região dorsal e mediana, medindo 2 cm de largura por 4 cm de comprimento. Os animais foram alocados em dois grupos (G) experimentais:

**G1:** a ferida produzida no dorso das cobaias foi reparada na sua porção cranial por enxerto de pele do próprio animal medindo 2X2 cm e a porção caudal da ferida foi reparada por fragmento de Nanoskin®, sem revestimento de gelatina, também medindo 2X2 cm.

**G2:** a ferida produzida no dorso das cobaias foi reparada na sua porção cranial por enxerto de pele do próprio animal medindo 2X2 cm e a ferida da porção caudal foi reparada por fragmento de Nanoskin®, revestido por gelatina, medindo também 2X2 cm.

Desta forma, os enxertos de pele autóloga foram considerados como grupo controle (GC) e os grupos experimentais foram os que receberam Nanoskin® sem revestimento (G1) ou com revestimento de gelatina (G2).

### **3. Momentos Experimentais**

Cinco animais por grupo foram eutanasiados em quatro momentos (M) experimentais: 7 (M1), 30 (M2), 90 dias (M3) e 180 dias (M4), após a cirurgia.

### **4. Parâmetros estudados**

**4.1. Exame ectoscópico:** realizado diariamente, observando-se a saúde dos animais, atividade na gaiola, alimentação. Também foram avaliados os enxertos realizados, observando-se a aparência, presença de sinais infecciosos, estado do processo cicatricial.

**4.2. Morfometria macroscópica dos enxertos** - os animais foram fotografados de modo padronizado, mantendo distância fixa entre o objeto e a máquina fotográfica digital Nikon D5000, com uma lente Nikon de 60mm macro e flash circular Sigma (Nikon – Nikon Corporation, Tóquio, Japão), tendo sido obtidas sempre pelo mesmo profissional, imediatamente após os momentos de eutanásia e tricotomia semelhante à realizada antes do procedimento cirúrgico. As imagens foram transferidas para computador de mesa e trabalhadas com o programa Image-J (NIH-USA, disponível na internet-[www.imagej.nih.gov](http://www.imagej.nih.gov)) e utilizadas para análise morfométrica, interessando a área de reparação tecidual do enxerto de pele e do fragmento de Nanoskin®.

**4.3. Exame histológico** – após a fotodocumentação, o material de estudo foi removido e preparado para exame de microscopia óptica. A análise das lâminas histológicas foi feita sem o conhecimento de a que grupo pertencia o animal.

**4.4. Análise morfológica dos cortes histológicos** – os cortes histológicos foram analisados morfometricamente, avaliando-se o percentual de células inflamatórias observadas no tecido ao redor da área operatória e a área de infiltrado celular inflamatório, utilizando o microscópio Leica DM 4000B Led (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) e o software Avsoft Bioview 4 – Spectra (AvSoft, Brasil).

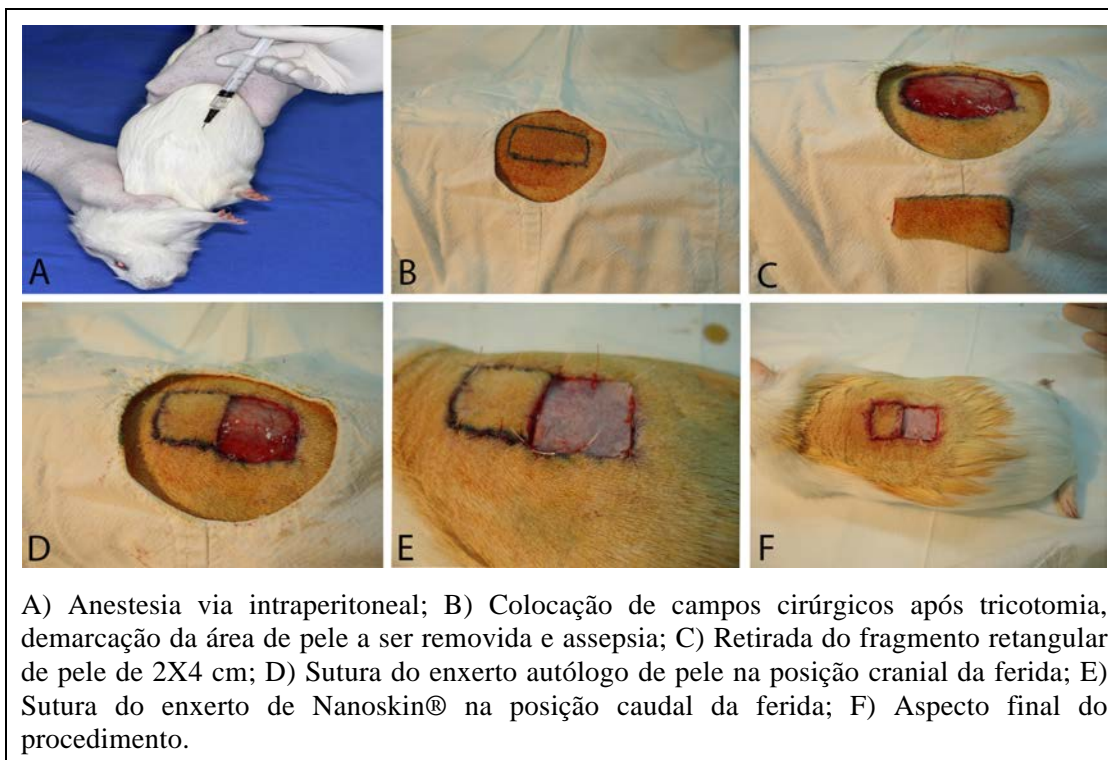
**4.5. Exame ultra-estrutural** – parte do material de estudo interessando os espécimes de M1 e M4 foi preparada para exame de microscopia eletrônica de transmissão.

## **5. Descrição dos procedimentos anestésicos e cirúrgicos**

Todos os procedimentos foram realizados seguindo medidas de assepsia e antisepsia. Os animais foram anestesiados pela via intraperitoneal, utilizando-se Tiletamina associada ao Zolazepam (Zoletil ®50, Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, SP, Brasil) na dose de 50 mg/kg. Quando necessário, a anestesia foi complementada utilizando-se 1/3 da dose inicial. Após a anestesia, foi realizada tricotomia da região média dorsal utilizando equipamento próprio, seguida da demarcação da área a ser operada com caneta marcadora. Antissepsia da área cirúrgica com Polivinilpirrolidona iodada 50 mg/ml (Prosigma - Farmácia de manipulação, Prosigma Ltda ME, Cambui, MG, Brasil), seguindo-se da colocação de campos cirúrgicos estéreis. Todos os procedimentos operatórios foram realizados pela autora. Foi realizada incisão linear, de 2 cm de largura por 4 cm de comprimento, localizada na região paramediana do dorso das cobaias, produzida por bisturi lâmina 15. A Nanoskin® foi preparada, recortada em fragmentos de 2X2 cm para todos os animais, tendo sido esterilizada previamente por meio de raios gama, com carga de 25 kg, na Companhia Brasileira de Esterilização em Cotia (CBE- Cotia- SP, Brasil) . O fragmento da pele do próprio animal medindo 2X2 cm foi suturado por fios separados, usando fio de poliéster 6-0 (Mersilene 6-0, Ethicon Incorporation - Johnson & Johnson do Brasil Indústria e Comércio de produtos para saúde Ltda, São Paulo, SP Brasil), na porção cranial da ferida cirúrgica criada. A porção caudal recebeu fragmento de Nanoskin®, no caso do G1 sem revestimento e no G2, revestido por gelatina. Entre a Nanoskin® e a pele do animal também foram usados pontos separados, usando o mesmo fio cirúrgico (Figura 1).

No final do experimento, foi administrado antibiótico Baytril® 10% (Bayer S.A., São Paulo, SP, Brasil) injetável, via intraperitoneal, na dose de 2,5 mg/kg, em dose única. Os animais foram alocados em gaiolas individuais, nas quais permaneceram até o momento da eutanásia, recebendo água e ração *ad libitum*. A eutanásia ocorreu utilizando-se sobredose de anestésico Zoletil® 50, via intraperitoneal.

**Figura 1-** Imagens demonstrando o procedimento cirúrgico



Fonte: Material elaborado pelo autor

## 6. Preparo do material para exame histológico

Decorrido o tempo idealizado para a pesquisa, os animais foram eutanasiados, tricotomizados, fotografados e imediatamente foram iniciados os procedimentos de remoção e fixação dos espécimes. As amostras preparadas para exame histológico foram fixadas em solução de Formol tamponado a 10% por três dias, após o que foram cortadas e introduzidas em cassetes individuais para processamento histológico em autotécnico (Leica TP 1020, Nussloch, Alemanha), sendo desidratadas em série crescente de álcoois (80-100%) em seis cubas, diafanizadas em três cubas de Xilol, por fim, três cubas de parafina (temperatura entre 50°C e 60°C), permanecendo por uma hora em cada uma dessas cubas. Em seguida, foram incluídas em parafina (Leica EG 1160, Nussloch, Alemanha) e cortadas com espessura de 4 µm em micrótomo rotativo (Leica RM 2155, Nussloch, Alemanha). O material foi colocado



em álcool 30%, seguido de banho-Maria em temperatura a 50°C para estiramento, sendo colocado em lâminas (Knittel, Braunschweig, Alemanha), levado a estufa a 60°C por aproximadamente uma hora para desparafinizar. Finalmente colocado no aparelho Auto-Stainer XL (Leica, Nussloch, Alemanha), para coloração pela técnica de Hematoxilina (QEEL - Química especializada Erich Ltda, SP, Brasil) e Eosina (Merck, Darmstadt, Alemanha), sendo montadas no aparelho CV 5000 (Leica Nussloch, Alemanha), recobertas por lamínulas (Knittel, Braunschweig, Alemanha). O preparo das lâminas seguiu sistemática para exames morfométricos, tendo sido considerado o primeiro corte, desprezados os próximos cinco e coletado o sexto. Cada lâmina de cada material a ser examinado foi montada contendo pelo menos cinco cortes.

As lâminas histológicas foram analisadas e as imagens foram captadas utilizando microscópio óptico Axioskop 40 da Zeiss com sistema de captação de imagem digital Axio Vision 4.7.2 (Zeiss, Jena, Alemanha)

### **7. Exame morfométrico**

Foram quantificados os fenômenos de reparação da pele por meio de captura de imagens de cada lâmina, no aumento de 40 vezes, 20fotodocumentações de campos de, no máximo, 500 micrômetros. Das 20 fotos, 10 foram feitas a partir da região mais superficial, ou seja, mais próxima da epiderme, e 10 a partir da porção mais profunda, ou seja, mais próxima da camada muscular. Os campos da reparação tecidual localizados na periferia e no centro da ferida também foram fotodocumentados para análise, tendo em vista as diferenças dos fenômenos de reparação nestes dois sítios. A espessura da epiderme foi avaliada a partir do próprio software do aparelho de morfometria, ao passo que a medição da área inflamatória foi feita utilizando-se o software AVsoft Bioview 4 – Spectra.

### **8. Preparo para exame ultraestrutural**

Espécimes de 7 dias (M1) e 180 dias (M4) foram preparados para exame ultraestrutural, removidos imediatamente após a eutanásia dos animais e fixados em solução Karnovsky. Realizados cortes longitudinais de até 2mmde comprimento sobre cera de dentista branca, em gota de solução fixadora, com ajuda de uma lâmina de barbear da marca Gillette (Procter & Gamble, Cincinnati, Estados Unidos da América) e um microscópio óptico de luz. As amostras foram retiradas do fixador e realizadas três lavagens de cinco minutos em tampão fosfato 0,1M pH 7,3. Pós-fixação em tetróxido de ósmio 1%, em tampão fosfato 0,1M pH 7,3

por 2 horas. Lavagem do material por três vezes de 10 minutos, em água destilada. Imersão do material em acetato de uranila 0,5%, em água destilada, por duas horas. Desidratação em série crescente de acetonas (50, 70, 90 e 100%), seguida de mergulho dos fragmentos em mistura 1:1 de araldite/acetona 100% por 12 horas, em temperatura ambiente. Colocação do material em resina pura por uma hora em estufa a 37°C. Em seguida as amostras foram emblocadas em molde apropriado e levadas para estufa a 60°C por dois a três dias. Os blocos foram então trimados e realizados cortes semifinos (0,5 µm) para escolha dos locais de interesse. Após a escolha das regiões de interesse os blocos foram novamente trimados para reduzir ainda mais a superfície dos mesmos, realizando-se então cortes ultrafinos (aproximadamente 90 nm). Os cortes ultrafinos obtidos foram colocados em grades apropriadas e contrastados com solução saturada de acetato de uranila em álcool 50% por 20 minutos. Por fim, os cortes foram contrastados com citrato de chumbo por 10 minutos. A análise e captura de imagens digitais das amostras foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu, utilizando os microscópios eletrônicos de transmissão Tecnai Spirit (FEI Company, Hillsboro, Estados Unidos da América) e CM 100 (Philips, Amsterdã, Países Baixos).

### **9. Análise estatística dos resultados morfométricos**

Após as avaliações, os dados foram transferidos para Tabela Excel, sendo submetidos à análise estatística, usando a técnica da Análise de Variância não paramétrica para o modelo com dois fatores, complementada com o teste de comparações múltiplas de Dunn (Norman & Streiner, 2008), considerando o nível de significância de 5%.

## **RESULTADOS**

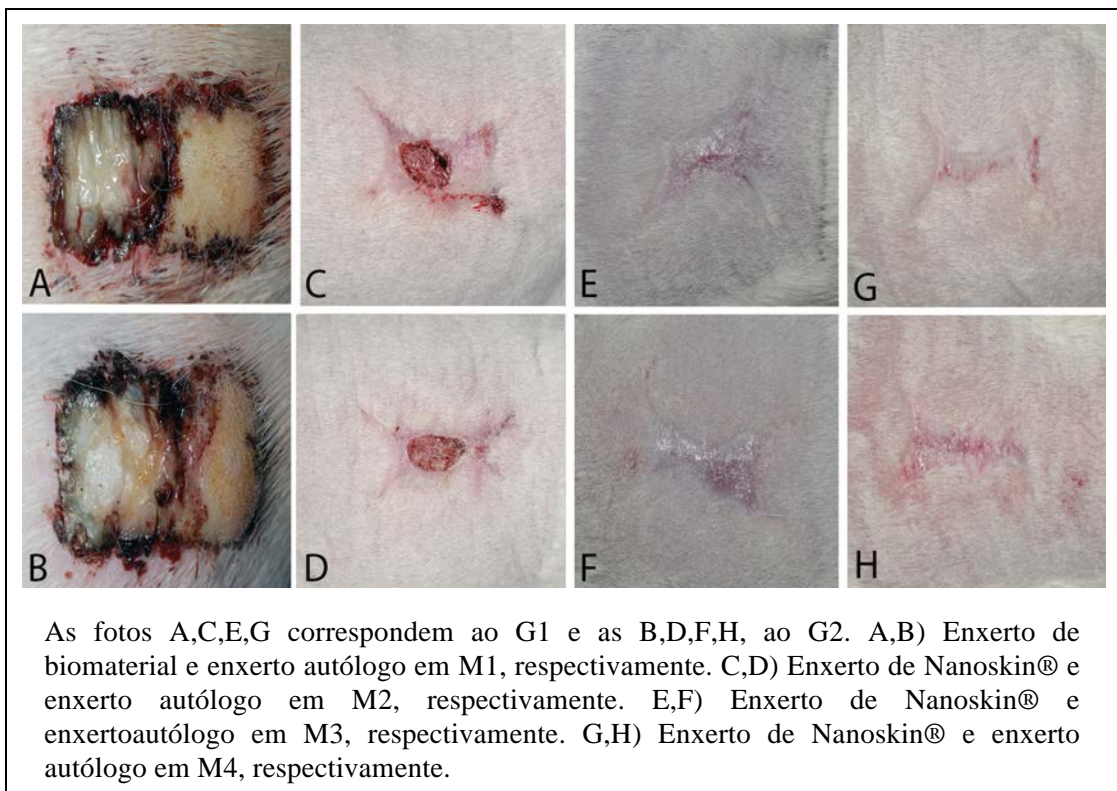
**1. Exameclínico dos animais** – os animais se desenvolveram normalmente ao longo do período experimental, alimentando-se e ingerindo água e não apresentando intercorrências devido ao procedimento cirúrgico. Apenas um animal pertencente ao G2 foi a óbito no primeiro dia de pós-operatório, provavelmente em decorrência de excesso de anestésico. Com o passar dos dias, houve a formação de crosta inicialmente rósea e depois enegrecida, em especial, próximo à margem da ferida e depois sobre todo o enxerto (Figuras 2 A-H). A crosta se despreendeu espontaneamente em tempos diferentes para diferentes animais, restando na região uma cicatriz rósea, inicialmente sem a presença dos pelos e depois,

recoberta por eles, porém em menor intensidade que a região normal circunvizinha. Este foi o comportamento de todos os animais, independente do tipo de material que foi utilizado.

**G1:** a cicatrização aparentemente se deu mais rapidamente na área que recebeu o enxerto autólogo, estando todos os animais com a epitelização completa em M3 (Figuras 2E e F). Já, quando empregada a Nanoskin® não revestida (G1), todos os animais apresentaram invariavelmente uma crosta hematocelular sobre o enxerto, que gradualmente foi diminuindo de tamanho, principalmente por reparação centrípeta, ou seja, a partir da periferia da área operatória, restando sempre a área central para o final do período de cicatrização. No decorrer dos primeiros 90 dias (M3) praticamente todos os animais já haviam cicatrizado totalmente, tanto na região do enxerto autólogo, quanto na que recebeu a Nanoskin® (Figuras 2E e F). Na área da cicatriz correspondente a Nanoskin®, os pelos estavam ausentes ou eram finos, em número menor que no tecido normal, principalmente no início do experimento, ficando com aparência semelhante ao normal no M3 e M4 (Figura 3).

**G2:** os fenômenos observados no G1 se repetiram no G2, sem diferença com relação aos momentos experimentais.

**Figura 2-** Fotodocumentação da região operada de animais após tricotomia nos momentos de eutanásia (M1-M4)



Fonte: Material elaborado pelo autor

**Figura 3-** Fotodocumentação de animal de G1M3 imediatamente após a eutanásia e antes da tricotomia.



Fonte: Material elaborado pelo autor

## 2. Morfometria dos enxertos

No exame morfométrico dos enxertos, foram realizadas medidas das áreas das feridas cirúrgicas (Figura 2) nos quatro momentos cirúrgicos. Observou-se redução da área de ferida do momento M1 (7 dias) para o momento M2 (30 dias) e redução significativa para os momentos M3 (90 dias) e M4 (180 dias) com uso de pele autóloga e com uso de Nanoskin® com e sem gel ( $p < 0,001$ ), demonstrando semelhança entre a cicatrização da pele (controle) e o biomaterial com e sem gelatina ( $p > 0,5$ ) (Tabela 1; Figura 2). Nos momentos M3 e M4 a cicatrização está completa e a área de ferida é igual a zero para todos os grupos.

**Tabela 1-** Exame morfométrico das dimensões dos enxertos nos momentos de eutanásia e nos dois grupos experimentais

Grupo†	Momento de Eutanásia				Valor p
	7 dias	30 dias	90 dias	180 dias	
Controle	484370(408360,595176)*	34942(0,130431)≠	0(0,26987)	0(0,30330)	$p < 0,001$
G1	490853(336463,617363)*	50546(8928,102970)≠	0(0,0)	0(0,0)	$p < 0,001$
G2	471595(425389,521152)*	32782(1608,85377)≠	0(0,0)	0(0,0)	$p < 0,001$
Valor p	<b><math>p &gt; 0,05</math></b>	<b><math>p &gt; 0,05</math></b>	<b><math>p &gt; 0,05</math></b>	<b><math>p &gt; 0,05</math></b>	

†Grupos: Controle= pele do animal; G1=Nanoskin® sem gelatina; G2=Nanoskin® com gelatina

### 3. Exame histológico

**G1 e G2:** não houve diferença detectável entre os grupos G1 e G2, ou seja, animais que receberam os enxertos de Nanoskin®, com ou sem o revestimento de gelatina, para recobrimento de feridas da superfície da pele de cobaias, tiveram comportamento semelhante em todos os momentos experimentais, o que motiva a descrição conjunta dos resultados.

**GC/G1M1/G2M1:** todos os animais que receberam Nanoskin® tiveram crosta hematomelicérica na área do enxerto, com necrose extensa e inúmeras células inflamatórias (Figuras 4A, B). Na periferia da lesão, junto à base do epitélio, foi possível observar a membrana basal do epitélio, vista como uma fina região eosinofílica e, a partir dela, três ou quatro camadas de células epiteliais jovens, com características de núcleos grandes e arredondados e citoplasma claro, sobre as quais ainda haviam restos necróticos (Figura 4A). No estroma, grande quantidade de hemácias, edema intenso e muitas células inflamatórias da fase aguda. A Nanoskin® foi observada como camadas empilhadas de estruturas acelulares, permeadas por hemácias, fibroblastos e células inflamatórias do hospedeiro. Os animais que receberam enxerto de pele autóloga também apresentaram grande quantidade de edema e células inflamatórias ao redor do enxerto (Figuras 4 B,C).

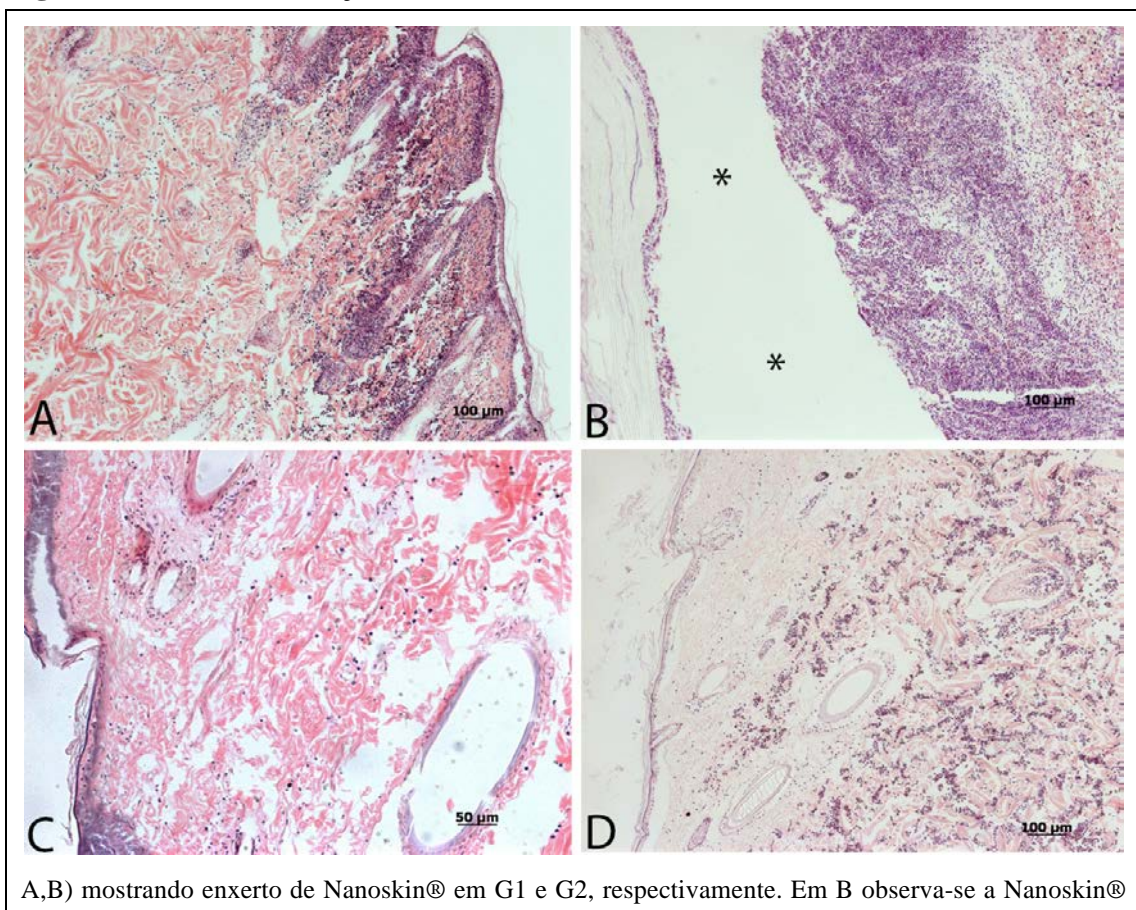
**GC/G1M2/G2M2:** as camadas de células epiteliais estavam em maior número, chegando a 15 ou 20 camadas de núcleos, agora menores e mais eosinofílicos (Figura 5). O estroma apresentava-se edematoso e com grande quantidade de células inflamatórias, principalmente polimorfonucleares e monócitos. Foi possível observar a presença de neovasos contendo hemácias, distribuídos pelo estroma superficial e profundo (Figura 5). A Nanoskin® apresentava-se com as mesmas características de M1 (Figuras 5 A,B).

**GC/G1M3/G2M3 e GC/G1M4/G2M4:** os núcleos da superfície eram totalmente eosinofílicos, com formatos estrelados. Na superfície foi possível observar a presença de fina camada de queratina, reconhecida pela coloração rósea e com as fibrilas paralelas à superfície do tecido epitelial (Figuras 6 A,B e Figuras 7 A,B), semelhante ao grupo controle (Figuras 6 C,D e Figuras 7 C,D). A cicatrização na área central da lesão foi mais lenta, confirmando o observado no exame ectoscópico, de que o epitélio começou ser refeito a partir da periferia para o centro, ou seja, de forma centrípeta. Importante notar que o estroma passou por processos de cicatrização e remodelação da mesma forma que o epitélio. No início, havia maior espaço entre os fibroblastos jovens, que eram compostos por núcleos maiores e por



filamentos mais curtos e gradualmente os fibroblastos passaram a ter núcleos menores e longos filamentos citoplasmáticos, dispostos paralelamente ao epitélio. Entre os fibroblastos havia muitos neovasos, contendo hemácias. Em M4, a área regenerativa era histologicamente muito semelhante em ambas as regiões, na que recebeu a Nanoskin® e na área que recebeu a pele autóloga (GC), com presença de cerca de 5 a 10 camadas de células epiteliais, mostrando as características da camada espinhosa e granulosa, derme mais densa na superfície e mais frouxa profundamente, contendo fibroblastos maduros, vasos, glândulas e folículos pilosos (Figuras 7 A,B). A Nanoskin® que havia sido identificada nas lâminas histológicas em M1 e M2, não mais foi encontrada. Aparentemente os vasos apareceram em maior quantidade na região do enxerto que na da pele normal (Figuras 7 A,B,C,D). Os anexos da pele, em especial os folículos pilosos e as glândulas sebáceas, se recuperaram de forma desigual na região do enxerto autólogo (GC) e do enxerto de Nanoskin® com ou sem revestimento (G1 e G2) (Figuras 7 A,B,C,D), sendo que, neste último, aparentemente a reparação dos anexos ocorreu de forma mais lenta e não houve recuperação total dos pelos e glândulas do epitélio. Células macrofágicas não foram evidenciadas, embora as películas de celulose bacteriana não tenham sido encontradas em M4.

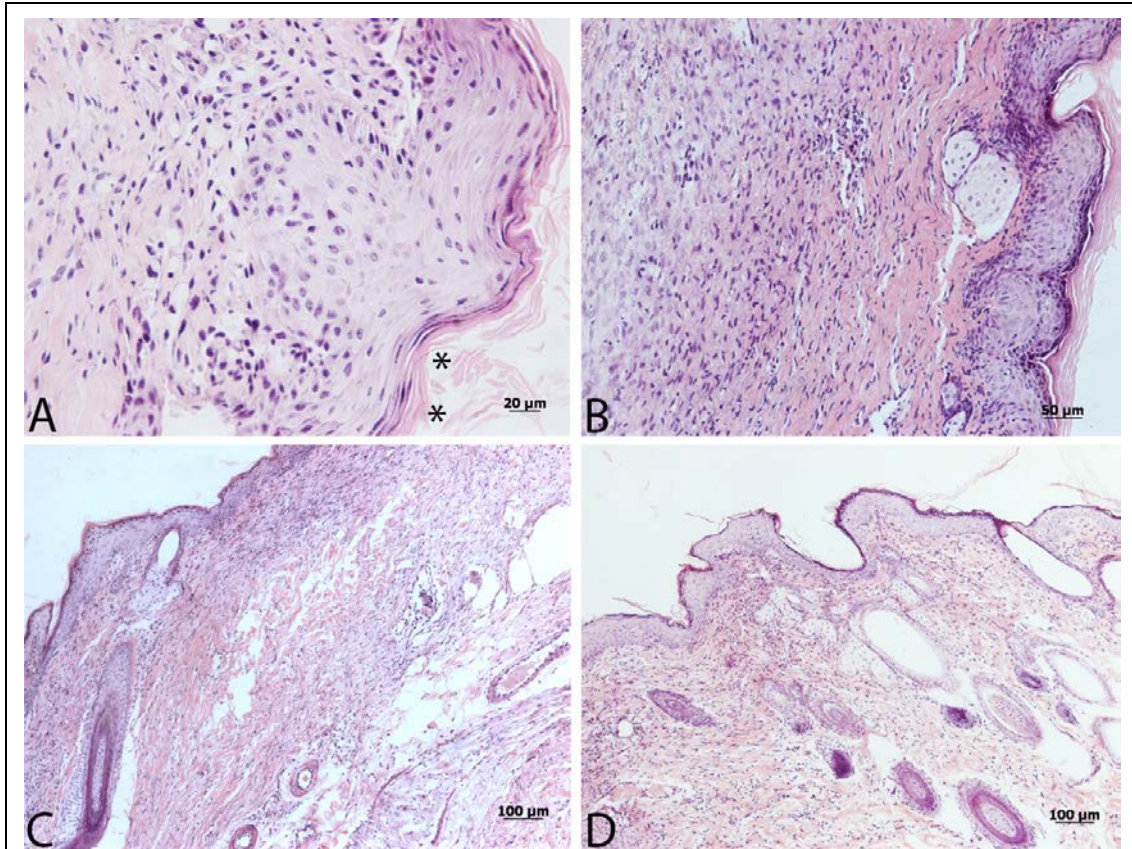
**Figura 4-** Fotodocumentação de animal de G1M1 e G2M1



destacada do tecido subjacente (\*). C,D) mostrando o enxerto de pele autóloga (GC) em G1 e G2, respectivamente.

Fonte: Material elaborado pelo autor

**Figura 5-** Fotodocumentação de animal de G1M2 e G2 M2

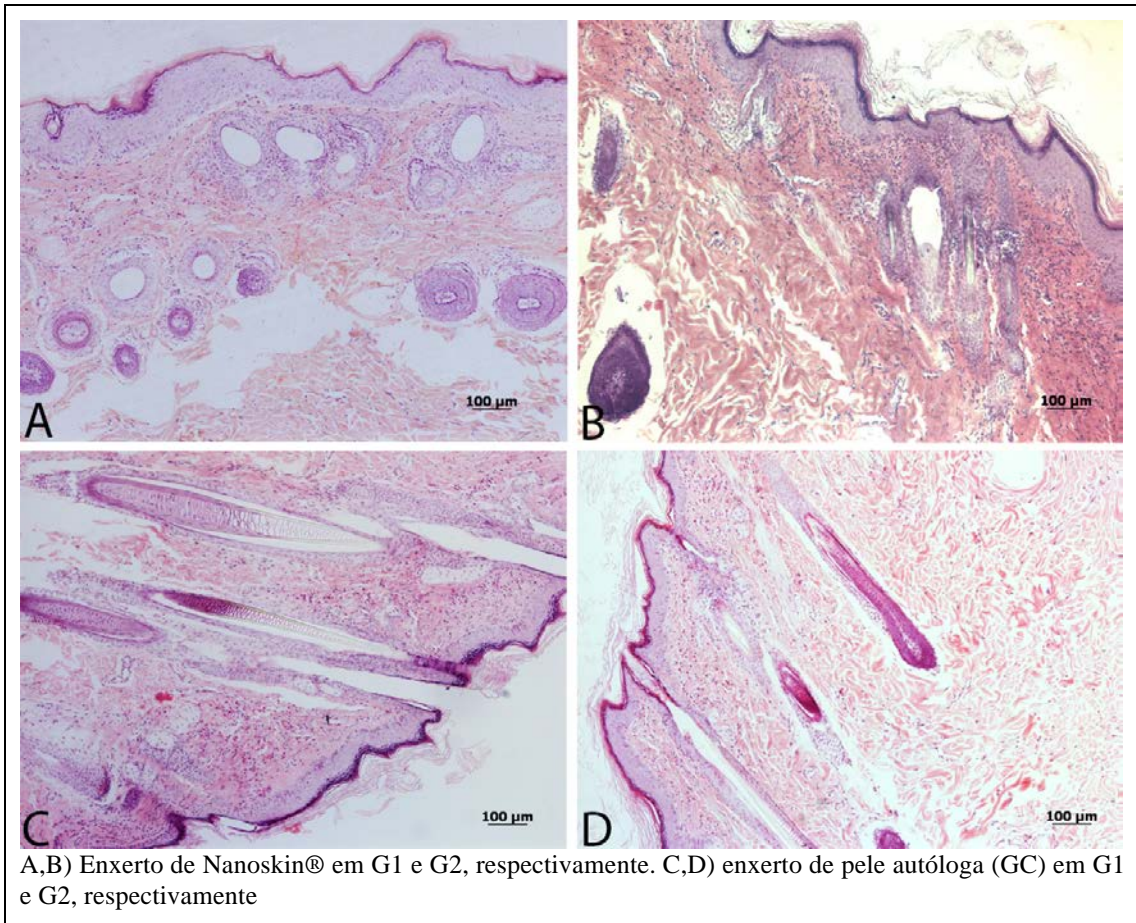


A,B) Enxerto de Nanoskin® em G1 e G2, respectivamente. Em A observa-se a Nanoskin® se destacando em lamelas do tecido subjacente (\*) C,D) enxerto de pele autóloga (GC) em G1 e G2, respectivamente.

Fonte: Material elaborado pelo autor



**Figura 6-** Fotodocumentação de animal de G1M3 e G2M3.

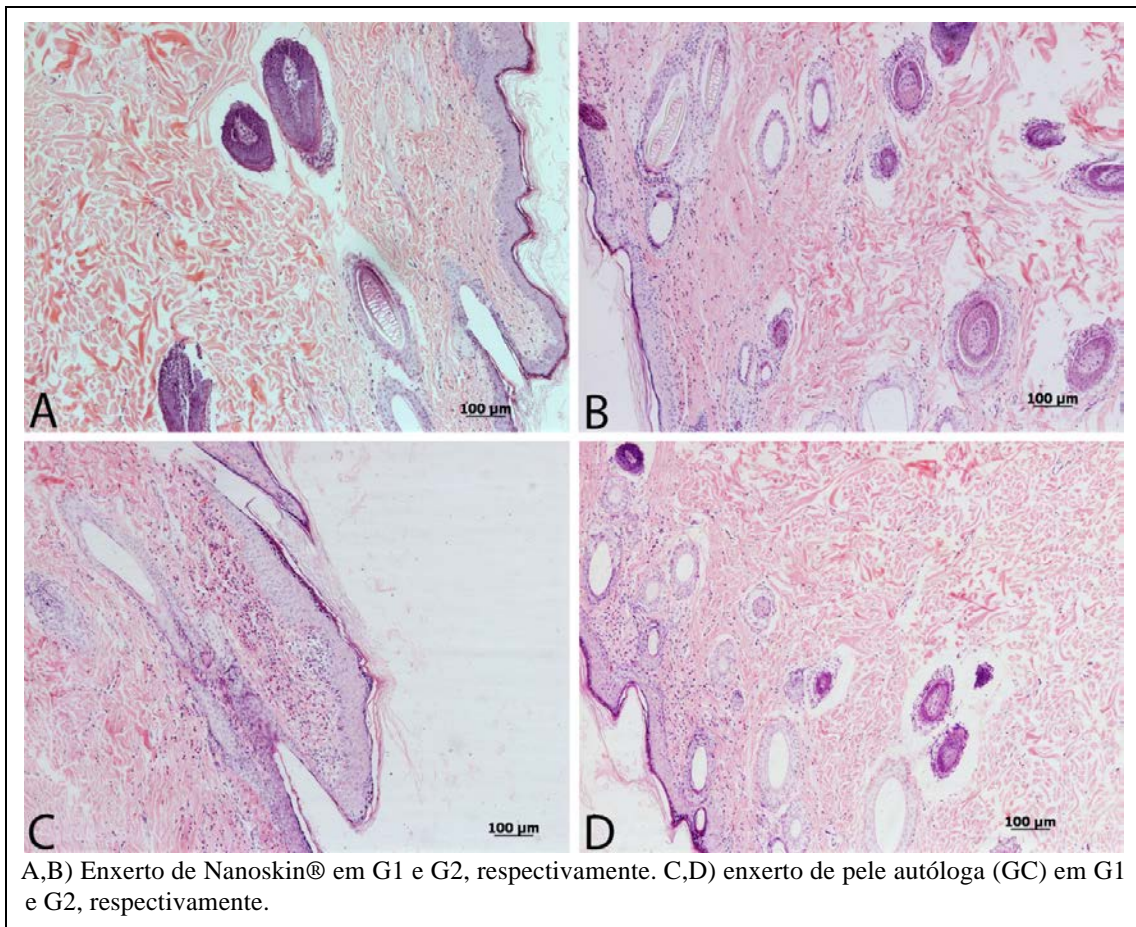


A,B) Enxerto de Nanoskin® em G1 e G2, respectivamente. C,D) enxerto de pele autóloga (GC) em G1 e G2, respectivamente

Fonte: Material elaborado pelo autor



**Figura 7-** Fotodocumentação de animal de G1M4 e G2M4



Fonte: Material elaborado pelo autor

#### 4. Exame morfométrico

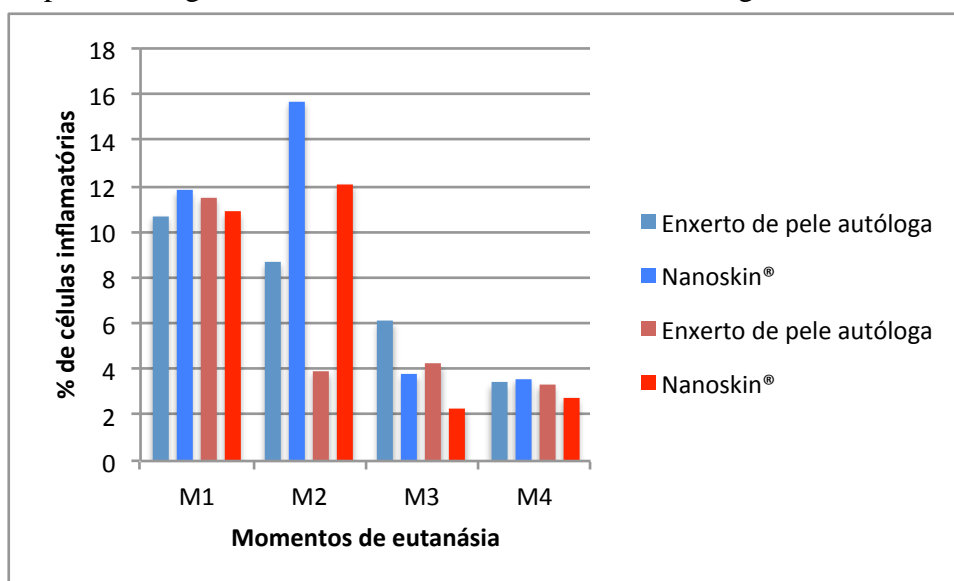
A avaliação morfométrica feita sobre as lâminas histológicas envolveu a avaliação da celularidade observada nos enxertos e a área de inflamação, nos dois grupos e em todos os momentos experimentais e consta da Tabela 2. A comparação da porcentagem de células inflamatórias entre os grupos G1 e G2 com relação ao enxerto de pele autóloga (GC) mostrou apenas uma diferença significativa, quando G1 teve mais células inflamatórias que G2, 30 dias após a cirurgia (M2). Ou seja, os enxertos de pele autóloga tiveram comportamento semelhante praticamente em todo o experimento (Gráfico 1).

A Nanoskin® enxertada na superfície da pele, sem cobertura (G1) ou com cobertura de gelatina (G2) teve a mesma resposta com relação ao percentual de células inflamatórias nos momentos experimentais M1, M3 e M4, ou seja, ambos os biomateriais incitaram a mesma inflamação quando implantados na superfície da pele das cobaias demonstrando não haver influência da cobertura de gelatina no processo de cicatrização. O

único momento em que houve diferença entre os grupos foi no M2 (30 dias), quando houve maior porcentagem de células inflamatórias no G1, quando comparado ao G2. A celularidade sempre foi maior nos momentos iniciais (M1 e M2) que nos demais momentos (M3 e M4), ou seja, a inflamação é maior no início e decai ao longo do experimento. Ainda com relação à celularidade, a comparação entre enxerto de pele autóloga (GC) e implante de biomaterial mostrou que a inflamação foi semelhante em todos os grupos e momentos experimentais, tanto nos enxertos de pele autóloga (GC), como nos enxertos de Nanoskin®, com (G2) ou sem gel (G1), exceto no momento M2 do G2, quando o enxerto de pele autóloga teve inflamação significativamente menor que a observada com Nanoskin® (Gráfico 1).

Com relação à área de inflamação, os resultados corroboram os dados obtidos quanto à celularidade, ou seja, a área de inflamação foi semelhante nos enxertos de pele autóloga e nos de Nanoskin® e decaíram ao longo do experimento, exceto no momento M2 (30 dias) em que a área não decaiu com relação a M1 (7 dias). No momento M2, o autoenxerto de pele (GC) e o implante de biomaterial apresentaram área inflamatória maior em G1, quando comparados a G2. A comparação dos enxertos de pele autóloga e os de Nanoskin® apontaram como única diferença a maior celularidade nos enxertos de Nanoskin® no momento M2 (Gráfico 2).

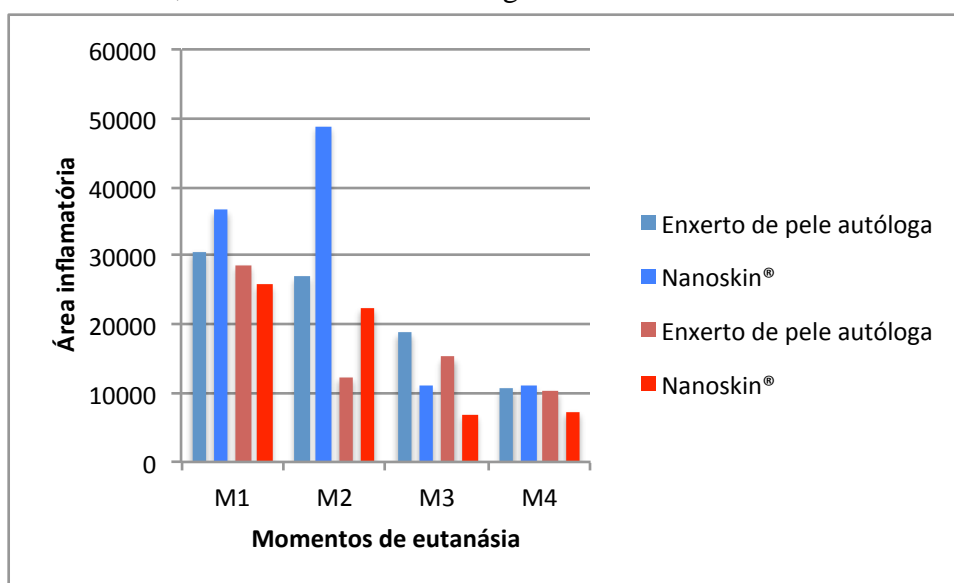
**Gráfico 1-**Gráfico demonstrando a porcentagem de células inflamatórias, segundo grupo e momento de eutanásia em cobaias que receberam enxerto de pele autóloga e Nanoskin®, sem ou com cobertura de gelatina



Barra Azul: Grupo G1 (sem cobertura de gelatina)

Barra Vermelha: Grupo G2 (com cobertura de gelatina)

**Gráfico 2-** Gráfico demonstrando a área inflamatória, segundo grupo e momento de eutanásia em cobaias que receberam enxerto de pele autóloga e Nanoskin®, sem e com cobertura de gelatina



Barra Azul: Grupo G1 (sem cobertura de gelatina)

Barra Vermelha: Grupo G2 (com cobertura de gelatina)

Na Tabela 2 encontra-se a avaliação da espessura do epitélio regenerativo após a colocação dos enxertos. No M1, ou seja, sete dias após a colocação dos enxertos, a espessura do epitélio foi menor e aumentou em direção aos demais momentos, não havendo diferença entre os momentos depois do M1 (M2=M3=M4), ou seja, o epitélio aos sete dias foi menos espesso; na avaliação dos 30 dias, apresentava a mesma espessura que foi detectada aos 90 e aos 180 dias após a cirurgia. Assim, é possível afirmar que a espessura do epitélio foi homogênea durante todo o período experimental, tanto quando se usou a Nanoskin®, sem ou com a cobertura de gelatina (G1=G2).

**Tabela 2-** Mediana e valores mínimos e máximos da espessura do epitélio regenerativo após utilização de Nanoskin® com (G2) e sem cobertura de gelatina (G1) sobre feridas extensas da pele do dorso de cobaias.

Grupo	Momento de Eutanásia				Valor p
	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	
G1	125,7 (120,0;131,5) <b>A</b>	715,8(528,5;778,2) <b>B</b>	611,9 (491,4;7688,0) <b>B</b>	534,0(484,6;590,3) <b>B</b>	<b>p&lt;0,05</b>
G2	154,5(147,9;161,2) <b>A</b>	539,5(316,7;744,7) <b>B</b>	560,08(547,4;569,6) <b>B</b>	481,1(366,8;633,3) <b>B</b>	<b>p&lt;0,05</b>
	<b>p&gt;0,05</b>	<b>p&gt;0,05</b>	<b>p&gt;0,05</b>	<b>p&gt;0,05</b>	

G1 – Nanoskin® sem cobertura de gelatina

G2 – Nanoskin® com cobertura de gelatina

M1= 7dias; M2=30 dias;M3=90 dias; M4=180 dias

Letras iguais significam que não houve diferença estatística

## 5. Exame ultraestrutural

Os resultados ultraestruturais apresentados se referem principalmente ao tecido regenerativo observado nos grupos analisados. Houve semelhança entre os grupos, motivo da apresentação dos resultados em conjunto.

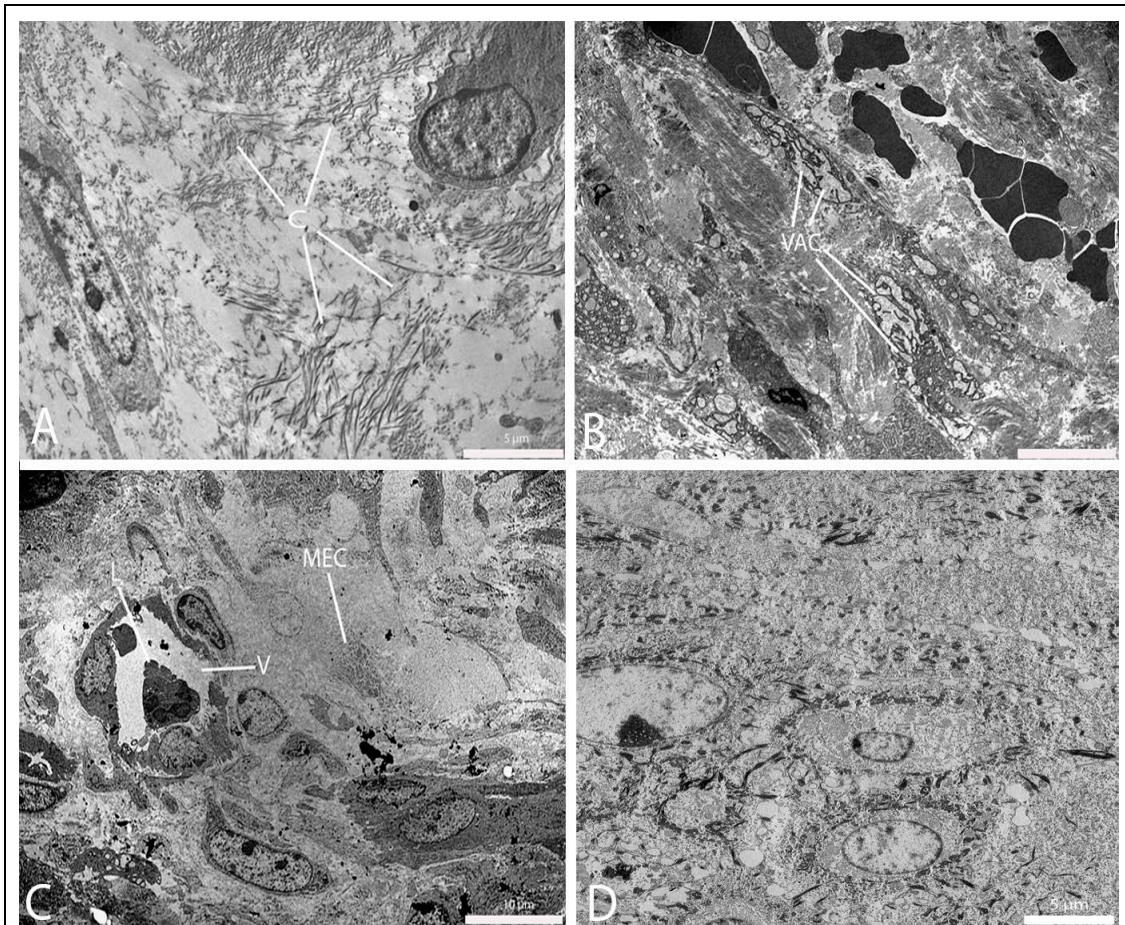
**GC/G1M1/G2M1** – nos animais com enxerto de Nanoskin® o tecido reparativo apresentava-se ainda não organizado, evidenciado pela disposição desordenada das fibras de colágeno (Figura 8A). Algumas áreas do tecido apresentavam matriz extracelular de aspecto floculado, destituídas de fibras de colágeno (Figura 8C), assim como tecido discretamente alterado, observando-se fragmentos celulares contendo grandes vacuolizações citoplasmáticas (Figura 8B), hemácias e vasos com leucócitos (Figura 8C). A Nanoskin® pode ser identificada como finos filamentos, organizados na forma de feixes (Figura 9A). Tais filamentos não se integram com o tecido subjacente, restando como um “resíduo” na superfície da derme. O tecido reparativo ainda se encontrava em organização, mostrando rarefação da matriz extracelular, com grandes áreas claras, destituídas de colágeno ou de células (Figura 9B). Em regiões mais compactas do tecido, observou-se áreas citoplasmáticas com vacuolização (Figura 9C). Fibroblastos com núcleo descondensado e organelas citoplasmáticas (mitocôndrias, retículos endoplasmático rugoso) homoganeamente distribuídas no citoplasma. Essa desorganização do tecido adjacente foi menos evidenciada no autoenxerto de pele (GC) (Figura 8D).

**GC/G1M4/G2M4**– Após 180 dias da realização dos implantes, nos enxertos de pele autóloga (GC) os fibroblastos possuíam aspecto semelhante aos normais (Figura 10A), com núcleos grandes e cromatina densa próxima da carioteca, retículo endoplasmático liso e rugoso e mitocôndrias (Figura 10B). O citoplasma se continuava com longos filamentos na forma de feixes, dispostos em diversos sentidos de orientação espacial, entre os quais haviam espaços claros (Figuras 10 A, B). Não houve diferença entre as áreas que receberam a Nanoskin® com gelatina (G2) (Figuras 11 A ,B), das que receberam Nanoskin® sem gelatina (G1) após 180 dias da cirurgia (M4) (Figuras 10 A, B), restando a área reparativa com aspecto semelhante a área que recebeu o enxerto de pele autóloga (GC).

Não houve diferença entre as áreas que receberam a Nanoskin® com gelatina (G2) (Figuras 11 A,B), das que receberam Nanoskin® sem gelatina (G1), após 180 dias da cirurgia (M4) (Figuras 10 A,B), restando a área reparativa com aspecto semelhante à área que recebeu o enxerto de pele autóloga.



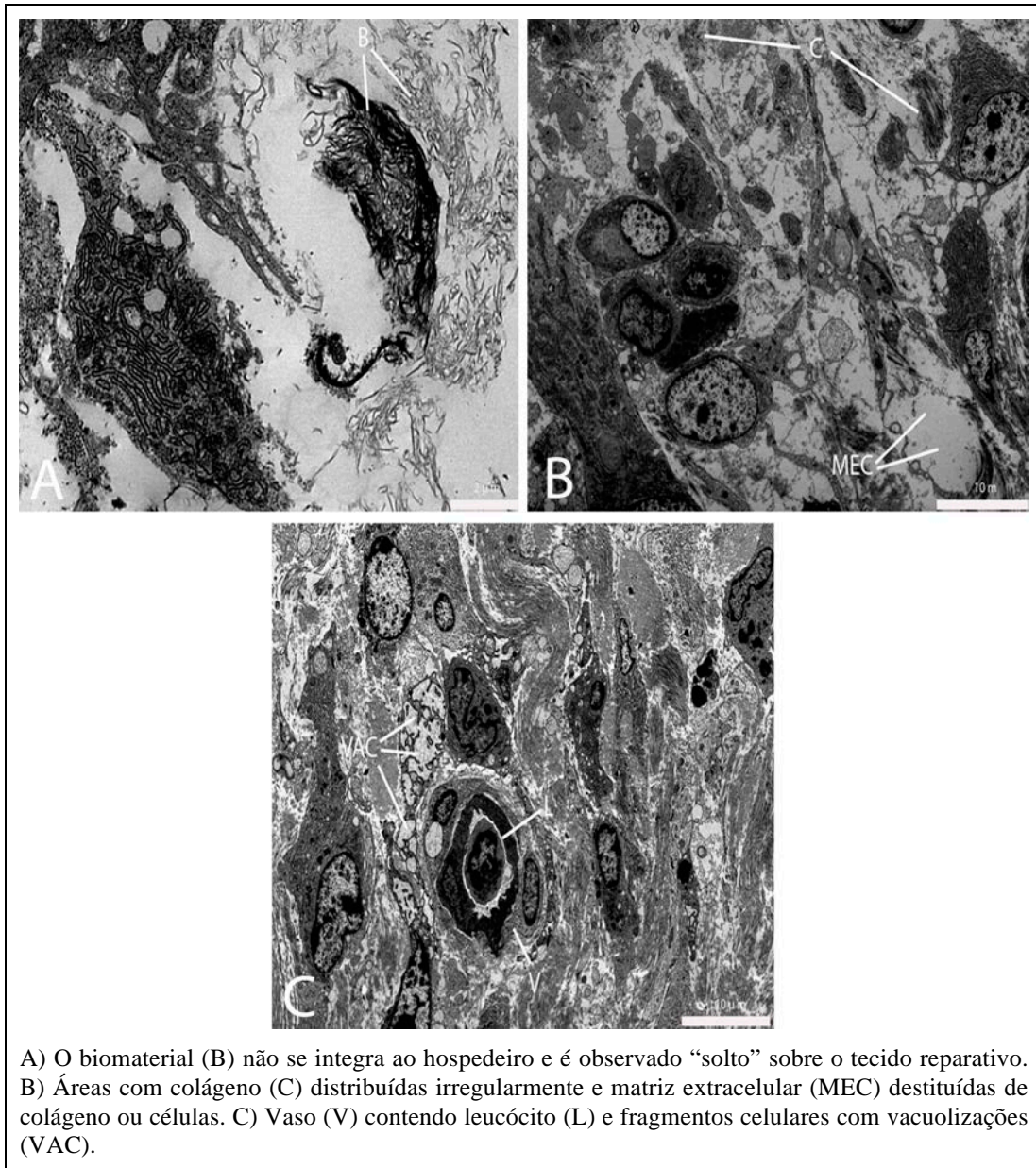
**Figura 8-** Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de G1M1 e enxerto de pele autóloga (GC)



A) Observam-se as fibras de colágeno (C) dispostas irregularmente. B) Fragmentos de células exibindo grandes vacuolizações (VAC). C) Matriz extracelular (MEC) de aspecto floculado destituída de fibras de colágeno, vaso (V) contendo leucócito (L). D) Autoenxerto de pele (GC) demonstrando menor desorganização do tecido que o implante de biomaterial.

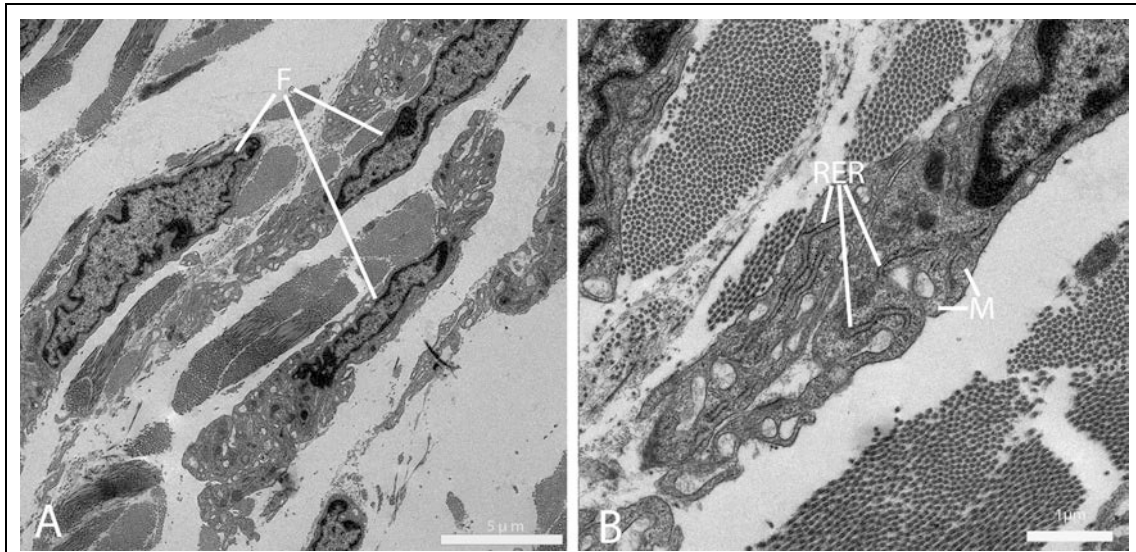
Fonte: Imagem elaborada pelo autor

**Figura 9-** Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de G2M1



Fonte: Imagem elaborada pelo autor

**Figura 10-** Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de G1M4

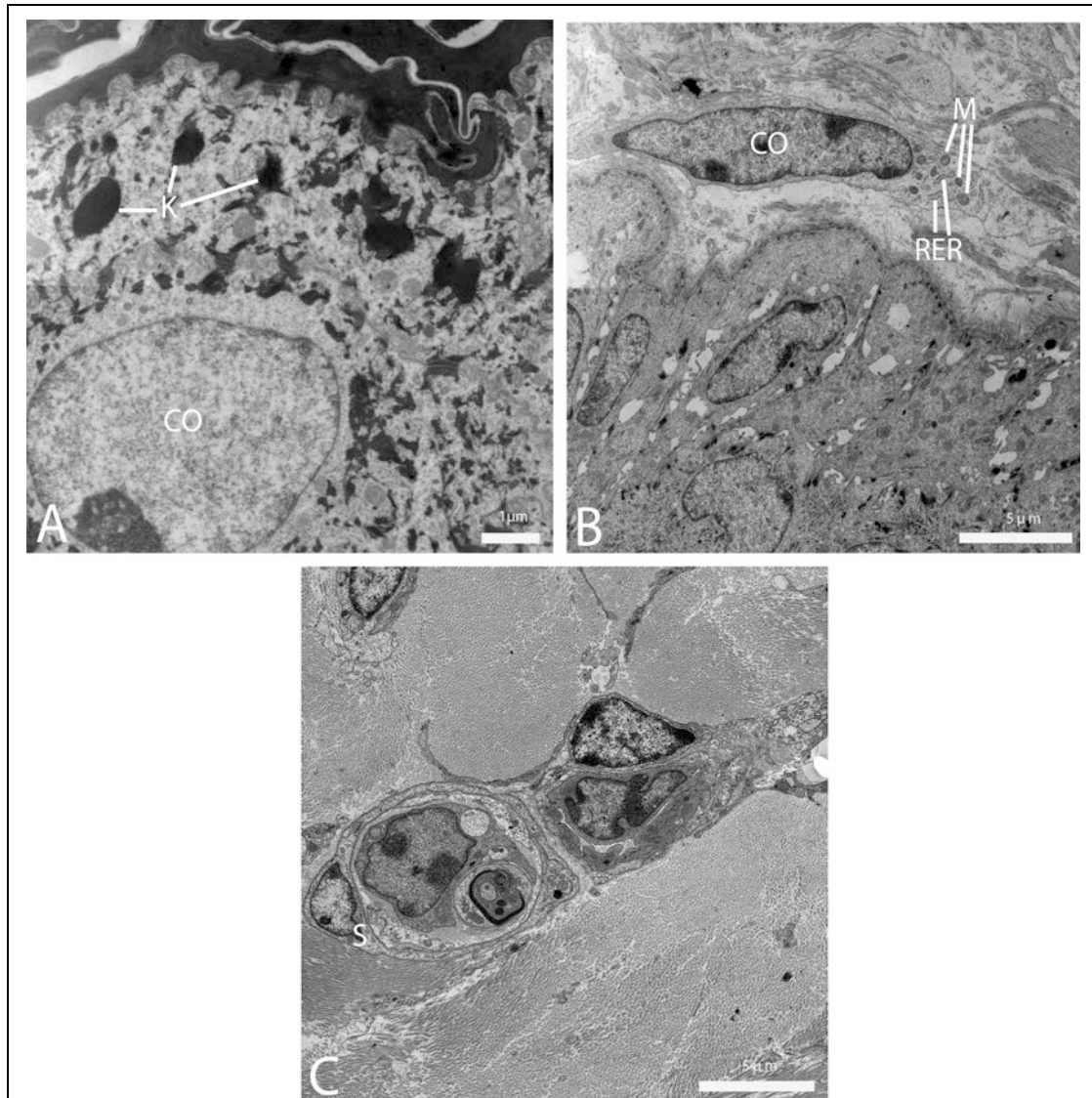


A) Fibroblastos (F) possuem morfologia semelhante ao tecido normal, com núcleos grandes e cromatina densa próximo da carioteca, com maior concentração de organelas citoplasmáticas na região perinuclear. B) Feixes de prolongamentos citoplasmáticos se organizam possuindo orientação paralela e dispostos com distância homogênea entre eles. Retículo endoplasmático rugoso (RER) e mitocôndrias (M) podem ser observados nos prolongamentos citoplasmáticos de fibroblastos

Fonte: Material elaborado pelo autor



**Figura 11-** Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de G2M4 e enxerto de pele autóloga (GC)



A) Imagem de animal de G2M4 mostrando detalhe da queratina (K), na superfície mostrando completa cicatrização. B) Imagem de animal de G2M4 mostrando fibroblasto semelhante ao normal com o núcleo (CO), alongado e citoplasma contendo mitocôndrias (M) e retículo endoplasmático rugoso (RER). C) Enxerto de pele autóloga em animal em M4 mostrando completa regeneração, com terminação nervosa contendo a célula de Schwann (S).

Fonte: Material elaborado pelo autor

## DISCUSSÃO

O presente estudo foi realizado a fim de analisar a resposta tecidual ao enxerto de um novo nanocomposto, a Nanoskin®, como proposta a ser empregada para reparação da superfície da pele de cobaias, pressupondo posterior uso clínico para reparação de feridas extensas da pele. Trata-se de um bioproduto preparado utilizando-se a bactéria *Acetobacter xylinum* e um substrato de chá verde no qual a bactéria utiliza a sucrose para produção de uma



celulose, ou seja, a bactéria possui propriedade de produzir um biopolissacáride, resultando em finos filmes ou outras composições que podem ser usadas para fins diversos (Kongruang, 2008).

Foram utilizadas cobaias e os enxertos foram feitos na região dorsal, já que em outras localizações o animal poderia manipular a área operatória, alterando a resposta a ser observada. Há necessidade de alocar um animal por caixa no período pós-operatório para impedir a manipulação que poderia ser feita também por outro animal.

Foi utilizado antibiótico sistêmico apenas no pós-operatório imediato, embora alguns sugiram o uso contínuo de antibióticos para evitar contaminações que muito frequentemente ocorrem e que podem ter sido responsáveis pelo processo inflamatório exuberante, observado principalmente nas fases iniciais do experimento, especialmente quando os animais foram eutanasiados 30 dias após a cirurgia, cujos resultados podem ter sofrido interferência de processo infeccioso mais exacerbado.

O processo cicatricial pode ocorrer por segunda intenção em ferimentos pequenos, assim como a ferida pode sofrer contração durante o processo de cicatrização (Cahn & Kyriakides, 2008). Por estes motivos, foram criadas feridas de 2X4 cm, com colocação de dois enxertos de 2X2 cm, tendo em vista informações da literatura em que foram realizados ferimentos de 1X1,5 cm<sup>2</sup> em ratos e cobaias (Cahn & Kyriakides, 2008), e ferimentos de 1,5X2,5 cm em ratos (Hoyama *et al.*, 2005) com bons resultados para análise das feridas cirúrgicas.

Também foi tomado o cuidado de retirar a espessura total da pele, já que a lesão que envolve a membrana basal do epitélio possui padrão de cicatrização diferente ao que se observa quando a membrana basal permanece intacta. Quando a lesão atinge a matriz extracelular (derme) provoca um fenômeno de reparação tecidual induzindo a formação de cicatrizes teciduais, ao contrário da regeneração que ocorre nas agressões superficiais (Kumar *et al.*, 2010).

O modelo experimental aqui utilizado procurou ainda comparar a cicatrização quando se utiliza o enxerto autólogo, o padrão-ouro nas reconstruções de perda de pele de espessura total (Metcalf & Ferguson, 2007), com a que ocorre quando se utiliza a Nanoskin®. E ainda, tendo em vista a importante função da pele normal que atua nos mecanismos de troca entre o organismo e o meio ambiente e que impede a evaporação de

líquidos corpóreos, foram utilizados dois diferentes tipos de Nanoskin®, uma sem revestimento e outra revestida com gelatina.

O emprego da Nanoskin® revestida por gelatina foi feito com base em estudo prévio que mostrou melhor cicatrização quando o tecido Xenoderma® (Homus Biotecnologia Com. Ind. Ltda.), uma pele artificial porcina, foi revestida por filmes plásticos (Hoyama *et al.*, 2005). O raciocínio seria que a evaporação poderia levar a dessecação e dificultar a cicatrização e a gelatina, assim como o filme plástico, poderia ter efeito positivo impedindo a evaporação. No entanto, não foram observadas diferenças com a Nanoskin® com ou sem a gelatina, o que nos autoriza o uso sem a cobertura com gelatina.

Optou-se por estudo observacional, histológico, morfométrico e ultraestrutural, com o intuito de melhor conhecer os detalhes do processo cicatricial e quantificar os fenômenos observados.

Durante o pós-operatório, a observação ectoscópica revelou que a cicatrização da superfície da pele ocorreu de forma semelhante nos dois fragmentos: pele autóloga e Nanoskin®, tanto o revestido, como o não revestido por gelatina. A formação da espessa crosta hematomelicérica que permaneceu para além do 7º pós-operatório dificultou a visibilização da ferida e facilitou a permanência de microrganismos no sítio de lesão. No entanto, não houve processo infeccioso em nenhum dos animais, tendo ocorrido o óbito de um único animal logo após o período operatório, muito provavelmente por sobredose de anestésico.

Após os primeiros dias, a crosta se despreendeu e foi possível observar que a cicatriz seguiu o padrão de regeneração centrípeta, ou seja, ficando o centro por último para a reparação total da ferida, vista em muitos animais até por volta do 30º dia após a cirurgia.

Assim, o exame histológico mostrou que a Nanoskin® produziu reação inflamatória pouco importante e que houve cicatrização de forma centrípeta, com reposição da pele perdida por outra de características semelhantes à normal, inclusive com epitélio de mesma espessura e a presença dos anexos semelhantes à área adjacente, área que não sofreu a injúria.

A análise histológica mostrou no M1 infiltrado celular exuberante, que diminuiu sensivelmente em M3 e M4. O exame morfométrico não mostrou queda das células inflamatórias em M2 quando comparado ao M1 e a razão pode ter sido processo infeccioso ou

a retenção de células inflamatórias pelo efeito de barreira da gelatina (no grupo G2), presente em alguns enxertos, que poderia impedir a livre circulação dos fluidos e células resultantes do afluxo existente no processo de cicatrização. Esta segunda hipótese é possível, uma vez que os demais parâmetros analisados (ectoscópico, morfometria dos enxertos, análise ultra-estrutural) não demonstraram sinais de infecção vigente, apesar desse resultado ter ocorrido em ambos os grupos (G1 e G2) no momento M2. O processo inflamatório foi sempre mais intenso próximo à área de lesão e provavelmente esteve associado a contaminação da ferida operatória que é comum em biotérios que não mantem condições estéreis.

Células inflamatórias, fibroblastos e células de defesa foram observadas infiltrando a própria Nanoskin®, assim como os tecidos regenerativos do hospedeiro. Os neovasos estão envolvidos no carregamento de células, hemácias e fatores pró-inflamatórios, participando ativamente dos fenômenos de reparação e foram comumente encontrados circundando o tecido ou ao redor da Nanoskin® (Kumar *et al.*, 2010).

Com relação à Nanoskin®, observou-se discreta reação inflamatória no subcutâneo, não se encontrando células macrofágicas na área de reparação tecidual, embora o biomaterial parecesse menos íntegro e até não foi encontrado em alguns animais de M4. A macrofagia poderia ser evidenciada pela presença de células gigantes multinucleadas que também não foram detectadas. Assim como neste, em outro estudo os sinais de macrofagia estiveram ausentes aos 3 e aos 6 meses após a implantação da Nanoskin® no dorso nasal de 20 coelhos, mesmo que tenha sido evidenciada fragmentação parcial do biomaterial em alguns animais (Amorim *et al.*, 2009).

O biomaterial empregado na superfície da pele esteve praticamente ausente após 90 e 180 dias (M3 e M4). O fato da cicatrização ter ocorrido de forma centrípeta, com manutenção da área cruenta no centro da ferida de alguns animais até por volta dos 30 dias após a cirurgia, pode ser indício de que a Nanoskin® funcionou apenas como um curativo biológico. A aplicação de curativos biológicos também é de grande interesse para aplicações biomédicas, tais como material para arcabouço para crescimento de enxerto ósseo (Fricain *et al.*, 2002), enxertos vasculares (Klemm *et al.*, 2001; Andrade *et al.*, 2010), de cartilagem (Andersson *et al.*, 2010), dentre outros.

Além de controlar o tamanho e a forma do curativo biológico derivado da celulose bacteriana, a morfologia microscópica pode também ser alterada de várias maneiras, tais como diferentes porosidades, condições de fermentação (tempo de cultivo e volume de

inoculação) e outros métodos que modificam o processo de cicatrização (tratamento alcalino, métodos de secagem, adição de amido) (Bäckdahl *et al.*, 2008; Grande *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2010).

Nossos resultados permitiram observar a boa biocompatibilidade da Nanoskin® com os tecidos do hospedeiro, com boa reparação tecidual com o seu emprego. Outros estudos já utilizaram a celulose bacteriana também com bons resultados, porém empregada de forma diferente. A biocompatibilidade, adesão e proliferação celular de um cultivo de células-tronco derivadas de tecido adiposo humano foi testada tendo como substrato a celulose bacteriana também produzida pelo *Acetobacter xylinum*, mostrando boa biocompatibilidade e atividade de fosfatase alcalina semelhante ao tecido celular, o que demonstra ser ela um meio adequado para a colonização de células-tronco, com capacidade de promover a proliferação celular, sem induzir citotoxicidade (Oliveira *et al.*, 2012).

Portanto, a Nanoskin® pode ter ampla aplicação em medicina regenerativa. Alterações simples no processo de fermentação da celulose bacteriana podem modificar a morfologia da mesma, possibilitando desenvolver opções particularizadas para aplicabilidade em locais específicos.

## CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, a Nanoskin® é um biomaterial inerte, capaz de auxiliar nos fenômenos regenerativos da pele. As observações realizadas sugerem que a Nanoskin®, com ou sem revestimento de gelatina, funciona como curativo biológico na reparação da pele.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amorim WL, Costa HO, Souza FC, Castro MG, Silva L. Estudo experimental da resposta tecidual à presença de celulose produzida por *Acetobacter xylinum* no dorso nasal de coelhos. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2009; 75(2):200-7.
- Andersson J, Stenhamre H, Bäckdahl,, Gatenholm P. Behavior of human chondrocytes in engineered porous bacterial cellulose scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research A.* 2010; 94A(4):1124-32.
- Andrade FK, Costa R, Domingues L, Soares R, Gama M. Improving bacterial cellulose for blood vessel replacement: Functionalization with a chimeric protein containing a cellulose-binding module and an adhesion peptide. *Acta Biomaterialia.* 2010; 6:4034–41.
- Basmaji P. Nanoskin® for medical applications. *Nanotech.* 2011; 1: 193-6.
- Bäckdahl H, Esguerra M, Delbro D, Risberg B, Gatenholm P. Engineering microporosity in bacterial cellulose Scaffolds. *J Tissue Eng Regen Med.* 2008; 2:320–30
- Cahn F, Kyriakides TR. Generation of an artificial skin construct containing a non-degradable fiber mesh: a potential transcutaneous interface. Generation of an artificial skin construct containing a non-degradable fiber mesh: a potential transcutaneous interface. *Biomed Mater.*2008; 3(3): 034110. doi 10.1088/1748-6041/3/3/034110.
- Campbell KT, Burns NK, Ensor J, Butler CE. Metrics of Cellular and Vascular Infiltration of Human Acellular Dermal Matrix in Ventral Hernia Repairs. *Plast Reconstr Surg.* 2012;129(4): 888–96.
- Costa LMM, Olyveira GM, Basmaji P, Xavier Filho L. Nanopores structure in electrospun bacterial cellulose. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology.*2012; 3: 92-6.
- Czaja WK, Young DJ, Kawecki M, Brown Jr RM. The Future Prospects of Microbial Cellulose in Biomedical Applications. *Biomacromolecules.* 2007; 8(1):1-12.

Fernandes J B V, Nunes T P, Matayoshi S, Moura E M. Enxerto de mucosa do palato duro: complicações na área doadora – Relato de casos. *Arq bras oftalmol.*2003; 66:884-6.

Fricain JC, Granja PL, Barbosa MA, de Jéso B, Barthe N, Baquey C. Cellulose phosphates as biomaterials. In vivo biocompatibility studies. *Biomaterials.* 2002; 23:971-80.

Grande JC, Torres FG, Gomez CM et al. Development of self-assembled bacterial cellulose–starch nanocomposites. *Mater Sci Eng.* 2009; C29:1098–104.

Hoyama E, Schellini SA, Pellizon CH, Marques MEA, Padovanni CR, Rossa R. Tratamento de feridas cutâneas extensas usando tecido dérmico acelar porcino com e sem cobertura impermeável. *Ann Bras Dermatol.* 2005; 80(4):369-74.

Klemm D, Schumann D, Udhardt U, Marsch S. Bacterial synthesized cellulose — artificial blood vessels for microsurgery. *Progress in Polymer Science.*2001; 26(9): 1561-1603.

Kongruang S. Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* strains from agricultural waste products. *Appl Biochem Biotechnol.* 2008; 148:245–56.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Renovação, regeneração e reparo dos tecidos. In: Robbins & Cotran *Patologia: Bases patológicas das doenças.* 8° ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010. p. 79- 108.

Metcalfe AD, Ferguson MWKJ. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *JR Soc Interface* 2007; 4(14):413-37.

Nanoskin®. BioNanofuture [Internet] [Acesso 2015 Maio 14]. Disponível em [www.bionanofuture.com](http://www.bionanofuture.com).

Norman GR, Streiner DL. *Biostatistics: the bare essentials.*3 ed. St Louis: Mosby Year Book, 2008. 393p.

Oliveira CR, Carvalho JL, Novikoff S, Berti F, Porto FV, Porto LM, Gomes DA, Goes AF. Bacterial cellulose membranes constitute biocompatible biomaterials for

mesenchymal and induced pluripotent stem cell culture and tissue Engineering. *J Tissue Sci Eng.* 2012; S11:005. doi:10.4172/2157-7552.S11-005.

Petersen N, Gatenholm P. Bacterial cellulose-based materials and medical devices:current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011; 91:1277-86.

Tang W, Jia S, Jia Y, et al. The influence of fermentation conditions and post-treatment methods on porosity of bacterial cellulose membrane. *World J Microbiol Biotechnol.* 2010; 26:125–31.

Wayne Rasband. ImageJ - Image Processing and Analysis in Java [Internet] [Access 2015 May 14]. Available from [www.imagej.nih.gov](http://www.imagej.nih.gov).

## **5. COMENTÁRIOS**



## 5. COMENTÁRIOS

A Nanoskin® apresentou bons resultados quando implantada no subcutâneo, sendo que o grupo G2 (sem gelatina) não apresentou redução significativa da reação inflamatória no decorrer dos momentos (M1 ao M4) quando comparada ao G1 pelo exame morfométrico, apesar de os exames histológico, ectoscópico e ultraestrutural não demonstrarem diferença entre G1 e G2.

Quanto a implantação da Nanoskin® na superfície, os exames histológico, ectoscópico, morfométrico e ultraestrutural demonstraram semelhança entre os dois grupos e redução da reação inflamatória com o decorrer dos momentos (M1 ao M4). No exame morfométrico das lâminas histológicas, em G1M2 os resultados foram bastante diferentes do esperado, com alta celularidade e com área inflamatória, podendo ser devido a algum processo infeccioso especificamente nestes animais, apesar de o exame ectoscópico diário não ter revelado esse tipo de alteração.

Comparativamente, a celulose bacteriana incitou menor reação inflamatória no subcutâneo que na pele, não tendo sido observadas células macrofágicas em nenhum dos materiais examinados. Em outras palavras, a resposta à implantação da Nanoskin® foi melhor quando utilizada nos tecidos profundos do que na superfície da pele e este fato pode ser decorrente de fatores como se ter exposição aos agentes agressores e microrganismos quando o biomaterial é colocado na superfície corpórea.

Vários estudos estão sendo realizados para utilização da celulose bacteriana para a regeneração de tecidos na medicina. Por ser um polímero natural, a celulose bacteriana apresenta-se similar a macromoléculas biológicas facilitando seu reconhecimento e reduzindo a reação inflamatória e a toxicidade que polímeros sintéticos podem induzir (Basmaji, 2011). Sua semelhança morfológica com o colágeno da matriz extracelular facilita a adesão de células para neoformação tecidual (Petersen & Gatenholm, 2011), e sua estrutura nanométrica e microporosa permite a troca de gases e preservação da umidade adequada (Costa *et al.*, 2012).

A modificação da celulose bacteriana através da adição de outros componentes ou modificações em seu meio de cultivo pode ser utilizada para melhorar suas propriedades, de acordo a necessidade de cada tecido (Torres *et al.*, 2012; Olyveira *et al.*, 2013), assim como tentamos com o revestimento de gelatina. Em ambos os experimentos, a gelatina teria funções

distintas, caso a proposta chegue a utilização clínica. No primeiro que antevê o uso para refazer a porção profunda da pálpebra, a gelatina protegeria os tecidos oculares, quando ficaria voltada para a superfície ocular, visando a reposição do tarso e conjuntiva com o biomaterial. No segundo, quando o uso seria para repor a pele palpebral, a gelatina visaria impedir a evaporação. Os nossos resultados apontam para a semelhança de resposta com ambos os usos. Ou seja, a adição de uma camada de gelatina não interferiu na cicatrização quando a Nanoskin® foi colocada no subcutâneo, assim como na superfície.

Importante ressaltar que a Nanoskin® quando colocada na superfície atuou como um curativo biológico, não tendo demonstrado integração tecidual.

Ao finalizarmos os experimentos, acreditamos que a metodologia empregada foi suficiente para indicar que o biomaterial testado é biocompatível e que pode ter aplicabilidade no reparo de tecidos profundos e superficiais.

Desta forma, os estudos clínicos devem ser delineados, a fim de permitir de modo definitivo que se possa indicar a Nanoskin® para o reparo de feridas palpebrais de espessura total e extensas.

## **6. CONCLUSÃO**

## 6. CONCLUSÃO

A Nanoskin® mostrou ser um nanocomposto biocompatível, tanto quando empregada no subcutâneo, assim como quando empregada na superfície da pele.

A Nanoskin ® revestida ou não por gelatina incita reação tecidual semelhante.

A cicatrização quando a Nanoskin® é colocada na superfície segue o padrão de curativo biológico.

Devido aos bons resultados do presente estudo, concluiu-se que a Nanoskin® pode auxiliar na regeneração/reparação de tecidos e que estudos clínicos devam ser providenciados a fim de validar a utilização da Nanoskin® para o reparo de feridas extensas das pálpebras.

## **7. REFERÊNCIAS**

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andersson J, Stenhamre H, Bäckdahl H, Gatenholm P. Behavior of human chondrocytes in engineered porous bacterial cellulose scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. 2010; 94A(4):1124-32

Antonio RV, Recouvreux DOS, Nazario AC, Timboni D, Ferrarini E, Rodowanski GP, et al. Produção de celulose bacteriana a partir de diferentes substratos. *Rev Téc Científ (IFSC)*. 2012; 3(1):176-82.

Apligraf.com. Apligraf – add life to healing [Internet]. Massachusetts; 2010 [access 2015 May 14]. Available from: [www.apligraf.com](http://www.apligraf.com).

Basmaji P. Nanoskin® for medical applications. *Nanotech*. 2011; 1: 193-6.

Brohem CA, Cardeal LBS, Tiago M, Soengas MS, Barros SBM, Maria-Engler SS. Artificial skin in perspective: concepts and applications. *Artificial Skin in Perspective: Concepts and Applications. Pigment Cell Melanoma Res*. 2011; 24(1):35-50.

Bichakjian CK, Johnson TM. Anatomia da pele. In: Baker SR. *Retalhos locais em reconstrução facial*. 2a ed. Rio de Janeiro: Dilivros; 2009. p. 4.

Brusselaers N, Pirayesh A, Hoeksema H, Richters CD, Verbelen J, Beeler H, et al. Skin replacement in burn wounds - review article. *J Trauma*. 2010; 68(2):490-501.

Costa LMM, Olyveira GM, Basmaji P, Xavier Filho L. Nanopores structure in electrospun bacterial cellulose. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*. 2012; 3: 92-6.

Czaja WK, Young DJ, Kawecki M, Brown Jr RM. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. *Biomacromolecules*. 2007; 8(1):1-12.

Fernandes J B V, Nunes T P, Matayoshi S, Moura E M. Enxerto de mucosa do palato duro: complicações na área doadora – Relato de casos. *Arq bras oftalmol*. 2003; 66:884-6.

Fricain JC, Granja PL, Barbosa MA, de Jéso B, Barthe N, Baquey C. Cellulose phosphates as biomaterials. In vivo biocompatibility studies. *Biomaterials*. 2002; 23:971-80.

Gartner LP, Hiatt JL. Tegumento. In: Gartner LP, Hiatt JL. *Tratado de histologia em cores*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007. p. 333-49.

Gu J, Wang Z, Sun M, Yuan J, Chen J. Posterior lamellar eyelid reconstruction with acellular dermis allograft in severe cicatricial entropion. *Ann Plast Surg*. 2009; 62(3):268-74.

Gu J, Zhai J, Chen J. The use of acellular human dermis composite graft for upper eyelid reconstruction in ocular injury. *J Trauma Acute Care Surg*. 2012; 72(1):288-92.

Halim AS, Khoo TL, Yussof SJ. Biologic and synthetic skin substitutes: an overview. *Indian J Plast Surg*. 2010; 43(Suppl):S23-8.

Hansen SL, Voigt DW, Wiebelhaus P, Paul CN. Using skin replacement products to treat burns and wounds. *Adv Skin Wound Care*. 2001; 14(1):37-46.

Hoyama E, Schellini SA, Pellizon CH, Marques MEA, Padovanni CR, Rossa R. Tratamento de feridas cutâneas extensas usando tecido dérmico acelular porcino com e sem cobertura impermeável. *Ann Bras Dermatol*. 2005; 80(4):369-74.

Innovatecs.com. Innovatec's Co. [Internet] [Access 2015 May 14]. Available from: [www.innovatecs.com](http://www.innovatecs.com).

Junqueira LC, Carneiro J. Pele e anexos. In: Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica*. 11ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p. 359-70.

Kikkawa DO, Vasani SN. Anatomia periorbitária. In: Chen WP. *Cirurgia plástica oftalmológica: princípios e prática*. Rio de Janeiro: Revinter; 2005. p. 1-19.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Renovação, regeneração e reparo dos tecidos. In: Robbins SL, Cotran RS, Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC, et al. *Robbins & Cotran patologia: bases patológicas das doenças*. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010. p. 79-108.

Liu W, Cao Y. Application of scaffold materials in tissue reconstruction in immune competent mammals: our experience and future requirements. *Biomaterials*. 2007;28:5078-86.

Matayoshi S. Anatomia Cirúrgica. In: Matayoshi S, Forno EA, Moura EM. Manual de Cirurgia Plástica Ocular. São Paulo: Editora Rocca; 2004. p. 1-19.

McCord C, Nahai FR, Codner MA, Nahai F, Hester TR. Use of porcine acellular dermal matrix (Enduragen) grafts in eyelids: a review of 69 patients and 129 eyelids. *Plast Reconstr Surg*. 2008; 122(4):1206-13.

Metcalf AD, Ferguson MWKJ. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *J R Soc Interface*. 2007; 4(14):413-37.

Mohamed A, Xing MM. Nanomaterials and nanotechnology for skin tissue engineering. *Int J Burns Trauma*. 2012; 2(1):29-41.

Oliveira Filho J. Estrutura e função da pele. In: Cucé LC, Festa Neto C. Manual de Dermatologia. 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 2001. p.1-11.

Oliveira CR, Carvalho JL, Novikoff S, Berti F, Porto FV, Porto LM, et al. Bacterial cellulose membranes constitute biocompatible biomaterials for mesenchymal and induced pluripotent stem cell culture and tissue engineering. *J Tissue Sci Eng*. 2012; S11:005. doi:10.4172/2157-7552.S11-005.

Olyveira GM, Costa LMM, Basmaji P, Xavier Filho L. Bacterial cellulose for medicine regenerative. *J Nanotech Eng Med*. 2011a; 1-9.

Olyveira GM, Costa LM, Basmaji P. Nanoskin® bacterial cellulose structured – Towards the development of degenerative medicine. *Nanotechnology*. 2011b; 3:267-70.

Olyveira GM, Costa LMM, Acasigua GAX, Pranke P, Basmaji P, Xavier Filho L, et al. Bacterial cellulose for future medical materials. *J Biopharm Biotechnol*. 2013; 1:1-12.



Özkaya Ö, Karşidag S, Egemen O, Akçal AÖ, Şirvan S, Kabukçuoglu F. Comparative analysis of the nail xenografts with cartilage autografts in eyelid reconstruction. *J Craniofac Surg.* 2012; 23(4):1028-31.

Petersen N, Gatenholm P. Bacterial cellulose-based materials and medical devices: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011; 91:1277-86.

Sampaio SAP, Rivitti EA. Anatomia e fisiologia. In: Sampaio SAP, Rivitti EA. *Dermatologia.* 3ª ed. São Paulo: Artes Médicas; 2008. p. 1-37.

Sani A, Dahman Y. Improvements in the production of bacterial synthesized biocellulose nanofibres using different culture methods. *J Chem Technol Biotechnol.* 2010;85:151-64.

Shores JT, Gabriel A, Gupta S. Skin substitutes and alternatives: a review. *Adv Skin Wound Care.* 2007; 20:493-508.

Singh AK, Shenoy YR. Skin substitutes: an Indian perspective. *Indian J Plast Surg.* 2012; 45(2):388-95.

Stell G, Rikvold PA. Polydispersity in fluids, dispersions, and composites; some theoretical results. *Chem Eng Commun.* 1987;51:233-60.

Svensson A, Nicklasson E, Harrah T, Panilaitis B, Kaplan DL, Brittber M, et al. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. *Biomaterials.* 2005; 26(4): 419-31.

Thinda S, Wright HV, Mawn LA. Integra bilayer matrix wound dressing closure of large periorbital traumatic wound. *Arch Ophthalmol.* 2012; 130(2):217-9.

Torres FG, Commeaux S, Troncoso O. Review - biocompatibility of bacterial cellulose based biomaterials. *J. Funct Biomater.* 2012; 3:864-78.

Watanabe K, Yamanaka S. Effects of oxygen tension in the gaseous phase on production and physical properties of bacterial cellulose formed under static culture conditions. *Biosc Biotechnol Biochem.* 1995; 59:65-8.

Zhang Z, Michniak-Kohn BB. Tissue engineered human skin equivalents. *Pharmaceutics.* 2012; 4(1):26-41.

Wipperman J, Schumann D, Klemm D, Kohsmel H, Salehi-Gelani S, Wahlers T. Preliminary results of small arterial substitute performed with a new cylindrical biomaterial composed of bacterial cellulose. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2009; 37(5):592-6.

## **8. APÊNDICE**

## 8. APÊNDICE

### 8.1. Certificado de Aprovação do Comitê de Ética

	<p>UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE BOTUCATU FACULDADE DE MEDICINA</p>		 Comissão de Ética em Experimentação Animal  Criada através da Portaria DFM nº 30 de 26/04/99
<h1>Certificado</h1>			
<p>Certificamos que (Protocolo CEEA 902-2011) "<b>Implante dérmico acelular sintético no subcutâneo de cobaias</b>", a ser conduzido por <b>Kryscia Leiko Natsuaki</b>, orientada pela <b>Profª Titular Silvana Artioli Schellini</b>, com a colaboração do <b>Prof. Titular Carlos Roberto Padovani</b> está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que as "<b>cobaias</b>" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.</p>			
<p>Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em <b>29/09/2011</b>.</p>			
 Profª Drª Noeme Sousa Rocha Vice- Presidente da CEEA	 Alberto Santos Capellupi Secretário da CEEA		
<small>Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fone/Fax: (0xx14) 3811-9143 e-mail secretaria: <a href="mailto:capellup@fmb.unesp.br">capellup@fmb.unesp.br</a></small>			

## 8.2. Solicitação de alteração do projeto de pesquisa

Fis. 54  
Proc. 143/20  
Rub. 12

Botucatu, 19 de setembro de 2013

Ao  
Conselho do Programa de Pós-Graduação em Bases Gerais da Cirurgia  
Faculdade de Medicina de Botucatu -- Unesp

Prezados Senhores,

Considerando o estabelecido na legislação vigente, dirijo-me respeitosamente a esse Conselho solicitando a alteração do projeto de pesquisa, de meu(inha) orientado(a) Kryscia Natsuaki.

Título do Projeto inicial: **Implante dérmico acelular sintético no subcutâneo de cobaias**

Título do Projeto proposto: **Implante dérmico acelular sintético como reparador da pele e subcutâneo. Uso de implante dérmico acelular sintético para reparação de feridas superficiais e profundas da pele.**

Justificativa da alteração: No projeto inicial previmos a colocação do Nanoskin no subcutâneo dos animais. No entanto, como a reposição dos tecidos da pálpebra que seria a proposta do estudo pode ser necessária na superfície ou no subcutâneo, optamos por acrescentar ao projeto inicial o emprego do biomaterial também na superfície.

Atenciosamente,



Prof(a).Dr(a). Silvana Artioli Schellini  
Assinatura do Orientador(a)



Assinatura do Aluno(a) -

Obs: Projeto inicial e atual em anexo

### 8.3. Comprovante de alteração de título de projeto de doutorado



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



## MUDANÇA DE TÍTULO EM PROJETO DE PESQUISA

### Objetivo Acadêmico:

- ( ) Pós Doutorado  
(X) Tese Doutorado  
( ) Dissertação de Mestrado  
( ) Trabalho científico  
( ) Outros: Especificar

### Título Inicial:

Implante dérmico acelular sintético no subcutâneo de cobaias (Protocolo CEEA 902-2011)

### Título Final:

Implante dérmico acelular sintético no subcutâneo e na superfície da pele de cobaias.

**Data da reunião do CEP que aprovou o parecer inicial:** 09/09/2011

Declaro que o trabalho não sofreu alterações nos objetivos e/ou conteúdo metodológico da época de apresentação para análise do CEP.

Nome e Assinatura do Orientador(a)  
Dra. Silvana Artioli Schellini

Nome e Assinatura do Orientado(a)  
Kryscia Leiko Natsuaki

- **Projetos submetidos via Plataforma Brasil:** Preencher o formulário, digitalizar, protocolar no CEP e postar no sistema Plataforma Brasil.
- **Projetos submetidos anteriormente à Plataforma Brasil:** Preencher o formulário em duas vias e protocolar no CEP que emitiu o parecer inicial de aprovação.

09/04 15/05/2015 09:00:00 COMITE DE ETICA EM PESQUISA FMB - UNESP