

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ESTRUTURAL MOLECULAR E GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

DANIELE HNEDA

AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DA RESPOSTA TECIDUAL E DA EXPRESSÃO DE
METALOPROTEINASES AO IMPLANTE SUBCUTÂNEO DE FRAGMENTOS DE
LUFFA AEGYPTIACA MILL EM RATOS

PONTA GROSSA
2020

DANIELE HNEDA

AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DA RESPOSTA TECIDUAL E DA EXPRESSÃO DE
METALOPROTEINASES AO IMPLANTE SUBCUTÂNEO DE FRAGMENTOS DE
LUFFA AEGYPTIACA MILL EM RATOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biomédicas como parte dos requisitos
para obtenção do título de mestre, área de
Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. José Rosa Gomes

PONTA GROSSA
2020

H677 Hneda, Daniele
Avaliação morfológica da resposta tecidual e da expressão de metaloproteinases ao implante subcutâneo de fragmentos de *Luffa aegyptiaca* mill em ratos / Daniele Hneda. Ponta Grossa, 2020.
66 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas - Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. José Rosa Gomes.

1. Bucha vegetal. 2. Histocompatibilidade. 3. Biomateriais. I. Gomes, José Rosa. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Biologia Celular e Molecular. III.T.

CDD: 610.28



**Universidade Estadual
de Ponta Grossa**



ATA NÚMERO OITO DE 2020 REFERENTE A DEFESA DA DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NÍVEL DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOLOGIA CELULAR, DA MESTRANDA DANIELE HNEDA, REALIZADA NO DIA 14 NOVEMBRO DE 2020, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos quatorze dias do mês de novembro do ano de dois mil e vinte, as nove horas, por via remota, em sessão pública da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), sob a presidência do **Professor Dr. José Rosa Gomes**, reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da qualificação do trabalho de Mestrado em Ciências Biomédicas da mestranda DANIELE HNEDA na área de concentração em **BIOLOGIA CELULAR**, constituída pelos demais Doutores (membros titulares): **Professora Dra DANIELLE CRISTYANE KALVA BORATO (UEPG/PR)** e **Professora Dra. ANA CLAUDIA MUNIZ RENNO (UNIFESP/SP)**. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e à candidata das normas que regem a qualificação. O título da dissertação avaliada foi: **“Avaliação morfológica da resposta tecidual e da expressão de metaloproteínas ao implante subcutâneo de fragmentos de *Luffa aegyptiaca* mill, em ratos”** Encerrada a defesa, e após reunião, a banca comunicou o resultado final da avaliação da dissertação como **APROVADA**, considerado requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

DR JOSÉ ROSA GOMES- Presidente

DRA.DANIELLE CRISTYANE KALVA BORATO- Titular

DRA. ANA CLAUDIA MUNIZ RENNO- Titular.

Ponta Grossa, 14 de novembro de 2020.

RESUMO

Biomateriais são materiais produzidos em laboratório ou extraídos da natureza que apresentam compatibilidade com os tecidos animais. São utilizados como substitutos ou indutores da regeneração de tecidos e órgãos lesionados. A *Luffa aegyptiaca mill* é conhecida como bucha vegetal e possui um fruto poroso e fibroso, constituído por quitina. Estas características lhe conferem um potencial uso como suporte para processos celulares envolvidos na regeneração tecidual. Assim, este trabalho teve como objetivo geral avaliar a resposta tecidual e a expressão de MMPs (metaloproteinases da matriz), ao implante subcutâneo de fragmentos de *Luffa aegyptiaca mill* em ratos, nos tempos de 15, 45 e 90 dias. A resposta tecidual ao implante foi avaliada pela análise da contagem de eosinófilos e mastócitos e pela produção do colágeno na cápsula fibrosa, utilizando-se colorações histológicas de rotina. A expressão de MMP-2 e MMP-9 foi analisada pelos métodos de imunohistoquímica e zimografia. Os resultados mostraram diferenças estatísticas entre os tempos avaliados para o número de eosinófilos e mastócitos presentes dentro e fora da cápsula fibrosa. Ainda, observou-se a presença permanente de macrófagos e de células gigantes multinucleadas circunscrevendo os implantes. Um aumento progressivo da deposição de colágeno na cápsula também foi detectado, porém, houve uma redução significativa no tempo de 90 dias, e também visualmente, foi observado uma redução da espessura da cápsula fibrosa nesse período. A expressão de MMP-9 foi mais específica nas células gigantes multinucleadas em todos os tempos avaliados e, a expressão de MMP-2 foi detectada em células adiposas presentes ao redor dos implantes, principalmente no tempo de 90 dias. Dentro dos limites desse trabalho, podemos concluir que a resposta tecidual ao implante subcutâneo de fragmentos de *Luffa aegyptiaca mill* em ratos, está dentro de um nível aceitável, sem reação granulomatosa de corpo estranho intensa, com tendência a uma redução da espessura da cápsula fibrosa e evidências da participação das metaloproteinases nesta resposta, indicando um potencial de biocompatibilidade entre a bucha vegetal e o tecido animal avaliado.

Palavras-chave: Biomateriais. Bucha vegetal. Histocompatibilidade.

ABSTRACT

Biomaterials are three-dimensional structures produced in the laboratory or extracted from nature that shows morphofunctional compatibility with animal tissues. They are used to replace or induce the regeneration of injured tissues and organs. *Luffa aegyptiaca mill* is a vegetable species, known as *Loofah* that has a porous and fibrous fruit, consisting of chitin. These characteristics give it a potential use as a support for cellular processes involved in tissue regeneration. Thus, this work aimed to evaluate, through the tissue response and the expression of MMPs (matrix metalloproteinases), the biocompatibility potential of the subcutaneous implant of *Luffa aegyptiaca mill* fragments in rats, in the periods of 15, 45, and 90 days. The tissues responses were assessed by analyzing the count of eosinophils and mast cells and by depositing collagen in the fibrous capsule using histological routine stains. The expression of MMP-2 and MMP-9 was analyzed by immunohistochemistry and zymography methods. The results showed statistical differences between the times evaluated for the number of eosinophils and mast cells present inside and outside the fibrous capsule. Still, it was observed the permanent presence of macrophages and multinucleated giant cells circumscribing the implants. A progressive increase in the deposition of collagen in the capsule was also detected, but there was a significant reduction in the time of 90 days, and also, visually, a reduction in the thickness of the fibrous capsule was observed during this period. The expression of MMP-9 was more specific in the multinucleated giant cells at all times evaluated, and the expression of MMP-2 was detected in fat cells present around the implants, mainly in the time of 90 days. Within the limits of this work, we can conclude that the tissue response process to the subcutaneous implantation of fragments of *Luffa aegyptiaca mill* in rats is within an acceptable level, without an intense foreign body granulomatous reaction and the fibrous capsule with a tendency to reduce its thickness and that the metalloproteinases may participate in this responses indicating potential biocompatibility between the plant loofah and the evaluated animal tissue.

Keywords: Biomaterials. Vegetable Loofah. Histocompatibility.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Principais respostas aos biomateriais e sua aceitação.....	18
FIGURA 2 - Morfologia do fruto da <i>Luffa aegyptiaca mill</i>	27
FIGURA 3 - Peso corporal dos animais implantados com <i>Luffa aegyptiaca mill</i>	37
FIGURA 4 - Fotomicrografia por MEV do filamento da bucha vegetal.....	39
FIGURA 5 - Fotomicrografia por MEV de fragmentos da bucha vegetal implantadas no subcutâneo dos ratos.....	40
FIGURA 6 - Análise das células ao redor da <i>Luffa aegyptiaca mill</i>	42
FIGURA 7 - Estimativa da deposição de fibras colágenas durante a formação da cápsula.....	44
FIGURA 8 - Observação de eosinófilos e mastócitos ao redor da <i>Luffa aegyptiaca mill</i>	46
FIGURA 9 - Zimografia e Imunomarcagem de MMP-2 e MMP-9 no tecido com <i>Luffa aegyptiaca mill</i> implantada.....	48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	8
2.1 BIOENGENHARIA TECIDUAL E SUA IMPORTÂNCIA	8
2.2 BIOMATERIAIS E BIOCOMPATIBILIDADE.....	8
2.3 CARACTERÍSTICAS ESSENCIAIS QUE DEFINEM UM BIOMATERIAL.....	9
2.4 APLICAÇÕES DOS BIOMATERIAIS.....	10
2.5 BIOCOMPATIBILIDADE E REPARAÇÃO TECIDUAL.....	10
2.6 METALOPROTEINASES.....	15
2.7 AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE.....	16
2.8 PRODUTOS NATURAIS COMO POTENCIAIS BIOMATERIAIS.....	19
2.9 BIOMATERIAIS COMO "SCAFFOLDS"	24
2.10 BUCHA VEGETAL COMO UM POSSÍVEL BIOMATERIAL.....	26
3 OBJETIVOS.....	29
3.1 OBJETIVO GERAL.....	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO.....	30
4.2 ANIMAIS E GRUPOS.....	30
4.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	31
5 RESULTADOS.....	37
6 DISCUSSÃO.....	49
7 CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS.....	58
ANEXO A - CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

A bioengenharia tecidual se utiliza de conhecimentos e princípios de diferentes áreas, incluindo as biológicas, para o desenvolvimento ou o uso de biomateriais já existentes e que possam auxiliar no processo de regeneração de tecidos lesionados do corpo humano. Biomateriais são estruturas tridimensionais e podem ter origem em laboratório a partir de técnicas de engenharia de materiais, ou serem obtidas diretamente de seres vivos como fungos, animais ou vegetais. Antes de ser utilizado, qualquer biomaterial precisa passar por vários testes pré-clínicos (*in vitro* e *in vivo*) para que se possa analisar a sua biocompatibilidade por meio de técnicas histofisiológicas. Em animais é analisado, principalmente, o grau da reação inflamatória na presença de um potencial biomaterial, sendo esse um preditor da compatibilidade. O biomaterial não deve causar reações de inflamações graves quando em contato com os tecidos, já as reações inflamatórias leves são aceitáveis e indicam que o biomaterial apresenta um potencial para auxiliar na regeneração de tecidos corporais. Existem várias abordagens com diversos tipos de materiais sintéticos que não possuem origem animal ou vegetal mas, por terem um grau de compatibilidade também são chamados de biocompatíveis como por exemplo podemos citar polímeros, cerâmicas e metais. Já entre os biomateriais naturais estão a quitina de artrópodes e fungos, a celulose de bactérias e plantas, a queratina de penas e chifres, o colágeno, as resinas de plantas entre muitas outras. Assim, existem diferentes tipos de produtos naturais que podem ser testados quanto a sua potencialidade para se transformarem em biomaterial e muitos deles ainda não foram testados em animais, como é o caso da esponja ou bucha vegetal do gênero *Luffa*, denominada de *Luffa aegyptiaca mill.* Dessa forma, nesse trabalho será apresentado resultados referentes a estudo pré-clínico, em ratos, do potencial de biocompatibilidade desse material, considerando aspectos de morfologia, resposta inflamatória, análise imunohistoquímica e componentes da matriz extracelular.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOENGENHARIA TECIDUAL E SUA IMPORTÂNCIA

A Bioengenharia compreende a união de conhecimentos de grandes áreas da Ciência, como a Física, Engenharia de materiais, de Bioprocessos e a Biologia, entre outras, que são aplicados na medicina reparadora de tecidos e órgãos. Os avanços na área da engenharia tecidual possibilitaram o desenvolvimento e o aperfeiçoamento de novos biomateriais, os quais devem estimular a adesão, diferenciação e proliferação celular, e ainda, possibilitar a produção de moléculas específicas do tecido-alvo para auxiliar no processo de reparação tecidual (OLIVEIRA *et al.*, 2010; DOLCIMASCOLO, 2019).

Dentro da biotecnologia, o conhecimento da área biológica, especialmente da histologia e imunologia dos tecidos, tem tido um papel importante no desenvolvimento da engenharia de novos biomateriais, no tocante a avaliação e o entendimento dos processos de histocompatibilidade entre esses e o organismo (CHEN; LIU, 2016).

2.2 BIOMATERIAIS E BIOCOMPATIBILIDADE

Os biomateriais são utilizados para substituir ou reparar tecidos lesionados, e podem ser de origem natural ou sintetizados em laboratório, porém, devem possuir capacidade de interagir com tecidos, fluidos ou sistema do corpo humano sem causar dano de grau inaceitável ao local de implante (PIRES *et al.*, 2015).

Alguns biomateriais destacam-se pela sua capacidade de permanecer em contato com os tecidos do corpo humano de forma permanente, exemplos conhecidos são os metais como a platina e titânio, muito utilizados para substituir peças ósseas ou articulações. Entretanto, outros biomateriais podem permanecer por tempo limitado, o suficiente para estimular a proliferação das células do organismo auxiliando ou acelerando a reconstrução de tecidos perdidos. Neste processo, vários materiais biológicos podem servir como estruturas físicas denominadas de suportes ou *scaffolds*, cujo objetivo é orientar a organização das células durante o seu processo proliferativo e regenerativo no tecido. Dessa forma,

espera-se que os biomateriais contribuam para reduzir o tempo de regeneração dos tecidos afetados, promovendo a restauração do seu comportamento estrutural, funcional, metabólico e bioquímico (NASSAR *et al.*, 2011; DOLCIMASCOLO, 2019).

Já a biocompatibilidade é a capacidade que qualquer material sintético ou natural tem de exercer funções específicas quando aplicado em contato com tecidos vivos de determinado hospedeiro, sem contudo, causar danos, efeitos colaterais tóxicos ou alérgicos ao mesmo (CAVALCANTI, 2013; WU; ZHU; TAO, 2013). Porém a biocompatibilidade não se refere apenas à qualidade de não ter efeitos tóxicos nos sistemas biológicos, mas também à necessidade de ter uma resposta apropriada do organismo que o recebe, para garantir desempenho satisfatório na funcionalidade do órgão ou tecido em uma aplicação específica (TORRES; COMMEAUX; TRONCOSO, 2012).

2.3 CARACTERÍSTICAS ESSENCIAIS QUE DEFINEM UM BIOMATERIAL

As características que definem um biomaterial dizem respeito a algumas de suas propriedades que são elencadas abaixo, segundo Pires *et al.* (2015):

- Propriedades biológicas, como a sua biocompatibilidade, hemocompatibilidade, histocompatibilidade, citotoxicidade, estimulação da cinética celular;
- Propriedades físicas, como morfologia da superfície, encaixe anatômico, rugosidade, porosidade, permeabilidade;
- Propriedades mecânicas, como tensão de ruptura, alongamento e flexibilidade;
- Propriedades químicas, como densidade, estabilidade, resistência à esterilização e forma de degradação quando em contato com o organismo.

Todas essas propriedades precisam convergir para a principal delas que é a biofuncionalidade, ou seja, além de ser biocompatível, o biomaterial precisa possuir biofuncionalidade, que é a capacidade de realizar a função a qual está sendo exigida pelo tecido ou órgão lesionado (FONSECA; PEREIRA; SILVA, 2005).

2.4 APLICAÇÕES DOS BIOMATERIAIS

Os biomateriais estão presentes em nossas vidas há muitos anos e muitos já são utilizados amplamente na área oftalmológica, odontológica, ortopédica, cardiovascular, nas cirurgias plásticas e na contracepção, ou então como estruturas tridimensionais na engenharia e reconstrução de tecidos (HELMUS *et al.*, 2008).

Esses materiais podem ser encontrados nos dispositivos biomédicos como biossensores, tubos auriculares, tubos de circulação sanguínea, sistemas de hemodiálise, lentes intraoculares, lentes de contato, ou materiais implantáveis como suturas, implantes de mama, parafusos e placas de fixação óssea, telas ou malhas cirúrgicas, válvulas cardíacas, dispositivos intrauterinos, próteses e implantes dentários, desfibriladores implantáveis, marca-passo cardíaco e como dispositivos para a liberação de medicamentos como películas adesivas, cateteres, implantes subdérmicos, dentre muitos outros que são considerados biomateriais aceitáveis e já utilizados no corpo humano (PIRES *et al.*, 2015).

2.5 BIOCOMPATIBILIDADE E REPARAÇÃO TECIDUAL

A regeneração de tecidos e órgãos é um processo bem orquestrado e altamente eficiente que compreende a interação de vários tipos de células, citocinas e quimiocinas e um meio extracelular apropriado. Esse processo em condições normais ocorre durante o processo inflamatório que compreendem as etapas a inflamação, angiogênese, formação de tecido de granulação, remodelação tecidual e, finalmente, regeneração tecidual que se fazem presentes após o implante de qualquer biomaterial compatível (KLOPFLEISCH; JUNG, 2017; ANDERSON, 2019).

Segundo Anderson (2019) após o implante, as possíveis respostas do tecido animal aos diferentes materiais incluem:

- ✓ Inflamação aguda
- ✓ Formação provisória de matrizes
- ✓ Fase de remodelação
- ✓ Inflamação crônica
- ✓ Reação de corpo estranho
- ✓ Desenvolvimento de fibrose/cápsula fibrosa

Fase inflamatória aguda

Essa fase caracteriza-se, de início, por fenômenos vasculares, como hiperemia, vasodilatação e a saída de células de defesa dos vasos sanguíneos para o local da injúria (YUKI *et al.*, 2010).

As primeiras células de defesa a se localizarem na área são os polimorfonucleares neutrófilos realizando o processo de fagocitose no local e, a seguir, células de defesa mononucleares, linfócitos e monócitos. Em geral, os neutrófilos predominam nos primeiros dias após a lesão, têm vida curta, desintegram-se e desaparecem após 24-48 h e são substituídos por monócitos como o tipo celular predominante (YUKI *et al.*, 2010; KLOPFLEISCH; JUNG, 2017).

Após a emigração pela vasculatura no local da lesão, os monócitos se diferenciam em macrófagos, e essas células têm uma vida muito longa (até meses). A emigração de monócitos pode continuar por dias a semanas, dependendo da lesão e do biomaterial implantado. Simultaneamente à inflamação aguda acontece o processo de adsorção de proteínas e a cascata de coagulação sanguínea essencial para restabelecer a hemostasia e fornecer uma matriz provisória para a migração celular (YUKI *et al.*, 2010; ANDERSON, 2019).

Formação provisória de matrizes

As interações sangue-material e a resposta inflamatória estão intimamente ligadas, e independentemente do tecido no qual um biomaterial é implantado, a resposta inflamatória inicial é ativada por lesão no tecido conjuntivo vascularizado com a formação de trombo ou coágulo sanguíneo. A formação destes na superfície de um biomaterial está relacionada a adsorção de proteínas, e a deposição de proteínas do sangue na superfície de biomaterial, processo importante para a formação provisória de matriz (DEE; PULEO; BIZIOS, 2002; KLOPFLEISCH; JUNG, 2017; ANDERSON, 2019).

A lesão no tecido vascularizado pelo procedimento de implantação leva ao desenvolvimento da matriz provisória no local do implante. Essa matriz provisória consiste em fibrina e é produzida pela ativação dos sistemas coagulativo e de trombose, além dos produtos inflamatórios liberados pelo sistema

complemento, células inflamatórias e células endoteliais. Esses eventos ocorrem precocemente, dentro de minutos a horas após a implantação de qualquer material (KLOPFLEISCH; JUNG, 2017; ANDERSON, 2019).

Os componentes da matriz provisória iniciam os processos de resolução, reorganização e reparo, como recrutamento de células inflamatórias e fibroblastos. A matriz provisória fornece componentes estruturais e bioquímicos ao processo de regeneração e a complexa estrutura tridimensional da rede de fibrina com proteínas adesivas fornece um substrato para a adesão e migração celular. A presença de moléculas importantes como metaloproteinases, citocinas e fatores de crescimento na matriz provisória, fornece um meio rico de substâncias ativadoras e inibidoras para processos proliferativos e bioquímicos (WILLIANS, 2008; ANDERSON, 2019).

Fase de remodelação

Os macrófagos e outros leucócitos, os fibroblastos e os vasos sanguíneos neoformados movem-se e ocupam o espaço da matriz provisória formando o tecido de granulação. Dependendo da extensão da lesão, o tecido de granulação pode ser observado entre 3 e 5 dias após o implante de um biomaterial. Os macrófagos fornecem uma fonte contínua de fatores de crescimento necessários para estimular a produção de fibroblastos e a angiogênese; os fibroblastos produzem a nova matriz extracelular necessária para suportar o crescimento celular; e os vasos sanguíneos transportam oxigênio e nutrientes necessários para sustentar o metabolismo celular (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; ANDERSON, 2019).

Os fibroblastos proliferam no desenvolvimento de tecido de granulação e são ativos na síntese de colágeno e proteoglicanos. Nos estágios iniciais do desenvolvimento do tecido de granulação, os proteoglicanos predominam; mais tarde, no entanto, o colágeno (especialmente o colágeno tipo I) predomina no tecido e forma a cápsula fibrosa. O colágeno configura-se como um dos principais componentes junto aos biomateriais, devido à sua característica de orientar e de definir a maioria dos tecidos, intermediando os processos de remodelação para estabelecer uma possível biocompatibilidade entre o implante e o tecido implantado (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; WILLIANS, 2008).

Nessa fase caracteriza-se a remodelação da matriz extracelular (MEC), em que ocorre a reorganização do colágeno durante a transição de tecido de granulação para o de regeneração. O processo de remodelamento envolve etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibras de colágeno. A deposição de colágeno é feita a princípio de maneira aleatória tendo como orientação a organização da fibronectina e dependente da natureza e direção das tensões aplicadas ao tecido. Essas fibras são subsequentemente digeridas por collagenases como as metaloproteinases de matriz, ressintetizadas, rearranjadas de acordo com a organização das fibras do tecido conjuntivo adjacente. Desta forma, o detalhamento da quantidade e o tipo de colágeno presente constituem-se como uma das formas de caracterização de biomateriais (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; ZITKA *et al.*, 2010; JUNIOR *et al.*, 2017).

Inflamação crônica

Caso os estímulos inflamatórios sejam persistentes levam à inflamação crônica. A inflamação crônica com materiais biocompatíveis geralmente é de curta duração, alguns dias. Em geral, a inflamação crônica é caracterizada pela presença de monócitos, macrófagos, plasmócitos e linfócitos com a proliferação de vasos sanguíneos e tecido conjuntivo. No que tange as células de defesa, os linfócitos e as células plasmáticas são importantes mediadores da produção de anticorpos e respostas de hipersensibilidade tardias frente ao biomaterial (ANDERSON, 2019).

Destas células, o macrófago é provavelmente a célula mais influente na inflamação crônica devido ao grande número de produtos biologicamente ativos que produz, como fatores quimiotáticos, componentes do complemento, fatores de coagulação, fatores de promoção do crescimento e citocinas. Os fatores de crescimento como PDGF (Fator de crescimento derivado de plaquetas), fator de crescimento de fibroblastos, fator de transformação de crescimento (TGF- β , TGF- α) e IL-1 ou TNF (factor de necrose tumoral) são importantes para o crescimento de fibroblastos e vasos sanguíneos e a regeneração de células epiteliais no tecido lesionado. Os fatores de crescimento liberados pelas células ativadas estimulam a produção de uma ampla variedade de células envolvidas na migração celular,

diferenciação e remodelação de tecidos (WILLIAMS, 2008; HENG, 2011; ANDERSON, 2019).

Os macrófagos podem ser denominados de M1 e são considerados pró-inflamatórios pela produção de citocinas pró-inflamatórias, ao contrário dos macrófagos M2 ou anti-inflamatórios que promovem a reparação tecidual a partir da produção de fatores de crescimento, produção de citocinas de caráter anti-inflamatório e imunomoduladores (KHANNA, 2010). Durante a fase mais tardia do processo de regeneração, os macrófagos normalmente se diferenciam para o fenótipo M2, produzindo Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF) e Fator de Crescimento Transformador- β 1 (TGF- β 1) para estimular a proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno na regeneração (WEIGERT, 2017).

Reação granulomatosa de corpo estranho

A inflamação crônica pode persistir por muitos dias e induzir estímulos inflamatórios persistentes que levam a formação de granulomas, que nada mais são do que uma aglomeração de células leucocitárias, como linfócitos, eosinófilos, os macrófagos e as células gigantes multinucleadas na tentativa de conter o agente agressor. Esse processo de formação de granulomas ao redor do biomaterial são denominados de reação granulomatosa do tipo corpo estranho (ANDERSON, 2019).

As células gigantes multinucleadas ou gigantócitos são formadas pelo processo de fusão de macrófagos em resposta a presença de um corpo estranho no tecido. Elas surgem, após falha ou "fagocitose frustrada", dos macrófagos isolados, sua fusão mediada principalmente pelas interleucinas, IL-4 e IL-13, aparentemente objetiva uma ação reforçada da ação inflamatória dos macrófagos. Os macrófagos e as células gigantes podem permanecer em torno do implante por longos períodos na tentativa de fagocitose do biomaterial implantado e não causar danos ao tecido (KLOPFLEISCH, 2016; KLOPFLEISCH; JUNG, 2017; ANDERSON, 2019).

Fibrose e encapsulamento fibroso

O reparo dos locais dos implantes pode envolver a regeneração, que é a substituição do tecido lesionado por células parenquimatosas do mesmo tipo ou a substituição pelo tecido conjuntivo que constitui a cápsula fibrosa. A resolução em resposta aos biomateriais é geralmente fibrose ou encapsulação fibrosa. Sabe-se que a formação da cápsula fibrosa ao redor do implante é geralmente uma ocorrência natural, resultado inevitável do mecanismo de defesa do organismo. A formação de cápsulas é influenciada por uma variedade de fatores de crescimento pró-fibróticos e angiogênicos, como PDGF (Fator de crescimento derivado de plaquetas), e TGF- β (O fator de transformação de crescimento beta) secretados por macrófagos e outras células imunes, queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais etc. (FRANÇA *et al.*, 2013; KLOPFLEISCH; JUNG, 2017; ANDERSON, 2019).

Na opinião de Ustundag *et al.* (2005) a barreira formada pela cápsula fibrosa ao redor do implante, isolando o mesmo do organismo, é um importante fator que mantém o implante por longo período no hospedeiro sem ser reabsorvido, e não causar danos ou efeitos colaterais ao tecido, cuja função é isolar o material do tecido adjacente e diminuir a ação do sistema imune sobre o mesmo.

2.6 METALOPROTEINASES

A degradação do colágeno no tecido com o biomaterial é controlada por várias enzimas proteolíticas denominadas metaloproteinases da matriz (MMPs), que são secretadas por macrófagos, neutrófilos, monócitos, células epidérmicas e células endoteliais, além de fibroblastos e outras células (ARAÚJO, 2011). No geral, as metaloproteinases são enzimas responsáveis pela remodelação tecidual por meio da degradação de componentes da matriz extracelular (MEC) lesionados no tecido para a deposição de uma nova matriz (ZITKA *et al.*, 2010). O reparo tecidual depende de combinações distintas do balanceamento das MMPs e seus inibidores teciduais de metaloproteinases; os TIMPs (*tissue inhibitor of metalloproteinases*) (ARAÚJO, 2011). As MMPs são endopeptidases dependentes de Zn^{2+} , dentre algumas podemos citar as gelatinases MMP-2 e a MMP-9 (MITTAL *et al.*, 2016).

A MMP-9 também conhecida como gelatinase B, é uma proteína sintetizada por uma ampla variedade de células, incluindo: macrófagos, fibroblastos, granulócitos, células T, células dendríticas, células epiteliais, queratinócitos, osteoblastos, mastócitos e possivelmente outras células (MITTAL *et al.*, 2016). No nível celular, essas proteases regulam a invasão, migração, apoptose e proliferação celular. O efeito pleiotrópico da MMP-9 é mediado por sua capacidade de degradar componentes da MEC, como colágeno I, III, IV, V, VII, X e XI, XIV, elastina, fibronectina e laminina (PARKS; WILSON; LOPEZ-BOADO, 2008). A MMP-9 é rapidamente expressa como uma resposta às lesões, assim a regulação da atividade proteolítica da MMP-9 é necessária para o reparo bem sucedido dos tecidos (MAURIS *et al.*, 2014).

A MMP-2 também conhecida como gelatinase A é expressa em quase todos os tecidos (GARG; VIJAY-KUMAR; WANG, 2009), sendo capaz de hidrolisar colágenos tipo I, IV, V, VII, X e XI, fibronectina, elastina, laminina e outras moléculas (OVERALL *et al.*, 2000). A MMP-2 está envolvida em diversas funções fisiológicas e patológicas, incluindo a reparação de tecidos (LUO *et al.*, 2018), e em processos inflamatórios e angiogênese (MITTAL *et al.*, 2016).

As MMPs têm sido encontradas em quantidade elevada em feridas crônicas, que não progridem para a devida resolução. Esses níveis elevados a longo prazo podem resultar numa degradação não-controlada e uma nova deposição de componentes da MEC como colágeno, glicosaminoglicanos e proteoglicanos, bem como na degradação de fatores de crescimento proteicos necessários a uma regeneração bem coordenada. O comportamento normal dessas enzimas seria um pico enzimático durante a regeneração, e então um declínio quando alcançado a homeostasia do tecido (ARAÚJO, 2011).

2.7 AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE

A avaliação histopatológica do tecido adjacente ao material implantado é o método mais utilizado para determinar a biocompatibilidade *in vivo*, baseando-se na aparência morfológica do tecido e quanto ao nível de resposta inflamatória ocorrida naquele local (JAMES, 2001). O teste de biocompatibilidade geralmente é realizado primeiramente em tecidos subcutâneos de ratos, porém pode ser realizado em

outros órgãos do animal, para finalmente ser estudado em testes clínicos (ARAÚJO *et al.*, 2011).

Pouco se sabe sobre os fatores que realmente determinam a biocompatibilidade dos diferentes tipos de materiais utilizados. Embora possam ser inertes e não tóxicos, os materiais podem mediar uma variedade de reações adversas no corpo hospedeiro, incluindo inflamação agravada, infecção e necrose. Dentre essas reações citadas a mais comum é o biomaterial induzir um processo de inflamação no tecido, cujas principais respostas inflamatórias detectáveis aos implantes podem ser uma inflamação aguda, inflamação crônica, fibrose, reação de granulomatosa de corpo estranho (KLOPFLEISCH; JUNG, 2017). O tipo, a intensidade e duração dessa resposta inflamatória dependem das características físico-químicas de cada biomaterial e o grau de sucesso da implantação de biomateriais está associado, entre outros fatores, à severidade do processo inflamatório desencadeado por ele no tecido (SANTOS *et al.*, 2013).

Uma resposta inflamatória aguda leve é aceitável, visto que é um processo natural do corpo humano frente à lesão e ao agente agressor, nesse caso, o biomaterial. Porém, há casos em que pode ocorrer uma resposta inflamatória aguda muito intensa devido às características do biomaterial, esse então é rejeitado devido ao fato de consequentemente desencadear um comprometimento sistêmico no organismo (JAMES, 2001; KLOPFLEISCH; JUNG, 2017).

Caso o estímulo inflamatório seja persistente ao biomaterial, ocorre um quadro de inflamação crônica. A inflamação crônica com materiais biocompatíveis geralmente é de curta duração, alguns dias, caso ela seja persistente por muitos dias não é aceitável para biocompatibilidade porque o organismo não reconhece o biomaterial e como forma de defesa estimula uma maior infiltração de células inflamatórias no tecido e lesão no tecido (JAMES, 2001; ANDERSON, 2019).

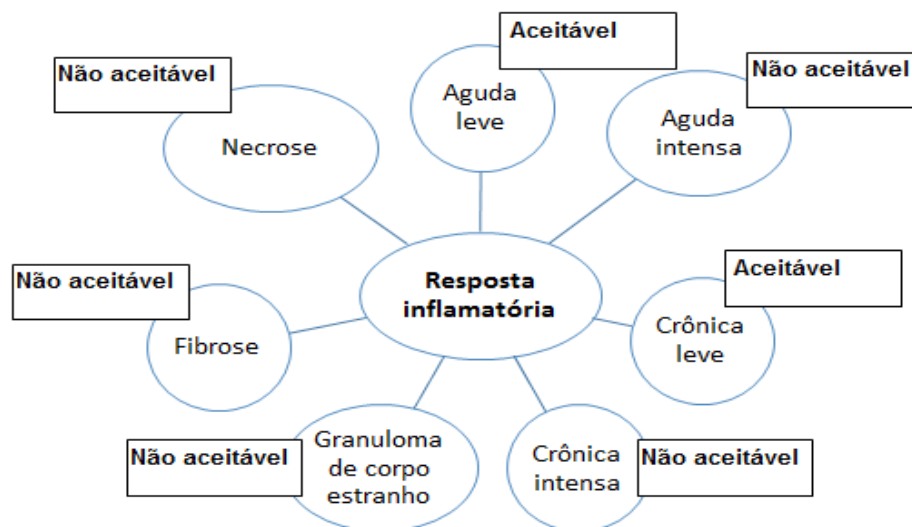
A inflamação crônica também pode resultar na formação de granulomas do tipo corpo estranho no tecido adjacente ao material implantado. Ao se observar histologicamente granuloma de corpo estranho, com muitas células inflamatórias, como macrófagos, linfócitos, células gigantes multinucleadas no tecido, o biomaterial é rejeitado. A formação desses granulomas na superfície do biomaterial é considerada indesejável, pois, a longo prazo, são a principal fonte de agentes biorreativos, como espécies reativas de oxigênio (ERO), enzimas e ácidos

degradantes, que levam à lesão do tecido (JAMES, 2001; FRANÇA *et al.*, 2013; KLOPFLEISCH; JUNG, 2017).

O biomaterial, quando implantado no tecido, induz esse a formar uma cápsula conjuntiva de fibras colágenas que o envolve. Quando a cápsula progride para uma estrutura contendo mais fibras do que células ela caracteriza uma condição denominada de fibrose. A condição de fibrose pode levar ao comprometimento mecânico ou falha na interação do biomaterial com o tecido circundante o que pode resultar em baixa compatibilidade do biomaterial principalmente em relação ao suprimento sanguíneo dos tecidos envolvidos. Além disso, durante a formação da cápsula normal, alguns fibroblastos se diferenciam em miofibroblastos sob a influência do TGF- β que pode contrair a cápsula e levar a deformação do tecido (KLOPFLEISCH; JUNG, 2017).

Em casos mais graves, a resposta ao material implantado pode levar a uma infecção grave e necrose tecidual. A necrose do tecido acontece devido ao fato de não haver principalmente angiogênese e vascularização no tecido em regeneração. A vascularização é de extrema importância no processo de regeneração de tecidos fornecendo nutrientes e oxigênio necessários para o bom funcionamento e recuperação do tecido (JAMES, 2001).

Figura 1 - Principais respostas aos biomateriais e sua aceitação



Representação esquemática da aceitação das respostas biológicas ao biomaterial implantado.

Fonte: (JAMES, 2001; KLOPFLEISCH; JUNG, 2017).

As reações imunes adversas a biomateriais são desafios cruciais, porque interferem na reparação, levando a resultados agudos imediatos, como dor imensa, inflamação excessiva, destruição de tecidos ou até isolamento e rejeição de dispositivos biomédicos (VISHWAKARMA *et al.*, 2016).

Portanto, o conhecimento dos processos comuns à inflamação e reparação tecidual, decorrentes da implantação do biomaterial é imprescindível, visto que o desenvolvimento e resposta do processo inflamatório são responsáveis pelo grau de sucesso da sua biocompatibilidade (RABBERS, 2019). A compatibilidade de um material pode ser visualizada por vários aspectos, tais como a fixação do biomaterial no local de implantação, duração do processo inflamatório, tipo celular presente após a implantação do material, remodelação da matriz, morfologia e vascularização do tecido formado adjacente ao biomaterial (ANDERSON, 2019).

2.8 PRODUTOS NATURAIS COMO POTENCIAIS BIOMATERIAIS

Entre os diferentes materiais já testados quanto a sua histocompatibilidade *in vivo*, utilizando ratos, podemos citar alguns muito conhecidos como a hidroxiapatita, biovidros, polianidrido, oligômeros de ácido lático entre outros, considerados biomateriais sintéticos. Entretanto, a obtenção desses materiais sintéticos tem um alto custo especialmente durante seu processo de obtenção com o uso de aparelhos cujo valor e manutenção são altos (SINHORETI; VITTI; CORRER-SOBRINHO, 2013; PIRES *et al.*, 2015).

Assim, é importante estudos que busquem testar novos materiais ou suas associações com os já existentes e que possam representar alternativas mais baratas mas que apresentem também um certo grau de histocompatibilidade com os tecidos lesionados. Surgem então, os biomateriais naturais como uma alternativa, pois como eles são obtidos de seres vivos ou da natureza, podem apresentar uma biocompatibilidade e especificidade com os tecidos dos animais (PIRES *et al.*, 2015; DOLCIMASCOLO, 2019).

Biomateriais naturais podem ser definidos como qualquer material extraído de seres vivos como fungos, plantas ou animais para aumentar, substituir ou reparar tecidos e órgãos do corpo humano. Os biomateriais naturais devem apresentar certa rigidez e porosidade, ou outras características importantes para que ocorram os

processos de cinética celular (proliferação, migração e diferenciação) na reparação tecidual (PIRES *et al.*, 2015; NASCIMENTO; LOMBELLO, 2016).

O uso de biomateriais naturais não é um conceito novo, eles têm sido usados por seres humanos há milhares de anos. Alguns dos registros mais antigos são do Egito antigo, cujas pessoas usavam suturas feitas de tendões de animais ou fibras vegetais, cascas de coco para crânios feridos e próteses de madeira. E recentemente, biomateriais naturais como resinas de plantas, queratina derivadas de cabelos humanos, lã, penas, chifres, cascos e unhas, pérola extraída de ostras, casca de ovo, celulose bacteriana, produtos extraídos de algas, ou mesmo estruturas retiradas do próprio organismo como âmnio, fibrina, queratina de cabelos humanos entre outros têm sido usados como uma boa alternativa aos materiais sintéticos para pesquisas biomédicas (PIRES *et al.*, 2015; DOLCIMASCOLO, 2019).

Mastrantonio e Ramalho (2003) analisaram a biocompatibilidade da resina do poliuretano vegetal da mamona (*Ricinus communis*) relatando que não houve uma síntese exacerbada de fibras colágenas pelos fibroblastos, indicando uma reação de pequena intensidade ao material implantado. Considerando um material biocompatível.

Lopes (2011) analisou extratos vegetais de árvores da floresta amazônica (Resina do Breu Branco – *Protium heptaphyllum march*, Resina do Jatobá - *Hymenaea courbaril*, e o leite do Amapádoce – *Brosimum parinarioides ducke*) em tecidos subcutâneos e enxertia óssea na calvaria dos ratos. Os resultados histológicos mostraram o leite de Amapá como menos biocompatível, apresentando um quadro inflamatório agudo intenso. Porém, ao misturar os 3 tipos de extratos, houve resultados satisfatórios na enxertia óssea, sendo possíveis materiais naturais biocompatíveis.

Foi avaliada a biocompatibilidade do extrato hidroalcoólico do *Cissus sicyoides* conhecido como insulina vegetal. Nos testes *in vitro* por meio do índice de aderência dos macrófagos foi relatado que este não foi biocompatível com as células, uma vez apresentou índice de aderência baixo e taxa de fagocitose elevada, indicativos de granulomas de corpo estranho. No teste *in vivo*, o mesmo não apresentou-se biocompatível visto que não acelerou a regeneração (CAVALCANTI, 2013).

Outro biomaterial interessante encontrado na natureza são as sedas produzidas pelos bichos-da-seda, elas são utilizadas como suturas devido a sua alta resistência, porém foi substituída por materiais sintéticos, devido a casos de hipersensibilidade à sericinas presentes na sua constituição. Mas estudos realizaram a purificação da seda removendo as sericinas e isso possibilitou uma seda biocompatível sem efeitos antigênicos (MEINEL *et al.*, 2005).

As queratinas são proteínas derivadas de cabelos humanos, lã, penas, chifres, cascos e unhas e devido a sua bioatividade, biodegradabilidade e abundância natural, elas são interessantes no processo de cicatrização de feridas. Em testes *in vivo* com ratos, um hidrogel de queratina extraído de penas de galinha foi biocompatível porque demonstrou formação de vasculatura de suporte, decréscimo das células inflamatórias, e sem elevações significativas nos níveis de citocinas que dependem da interação do implante e do sistema imunológico do hospedeiro (WANG *et al.*, 2017).

Outro material natural muito estudado é a celulose bacteriana (BC), um polissacarídeo natural puro, produzido por gêneros microbianos específicos e formado por rede de nanofibrilas com resistência à tração e excelente biocompatibilidade. A BC é um material aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) e já foram encontradas diversas aplicações no campo da engenharia de tecidos, como curativos, pele artificial, vasos sanguíneos artificiais, cartilagem artificial etc. (HOU *et al.*, 2018). A biocompatibilidade desse biomaterial natural para aplicações de engenharia de tecidos pode estar relacionada ao fato de sua estrutura mostrar semelhanças com componentes da matriz extracelular, como o colágeno (TORRES; COMMEAUX; TRONCOSO, 2012).

Mendes *et al.* (2009) avaliaram uma membrana de celulose bacteriana após implantação subcutânea em camundongos. Segundo os autores o tecido circundante aos 90 dias após a cirurgia não mostrou evidências de granuloma de corpo estranho.

Helenius *et al.* (2006) analisaram tecidos implantados de celulose bacteriana em ratos. Os autores não encontraram sinais histológicos de inflamação e presença de granulomas de corpo estranho, além do mais foi observada a formação de novos vasos sanguíneos ao redor e dentro da celulose implantada.

A baixa biodegradabilidade da celulose bacteriana é um fator que limita sua aplicação, porém essa condição foi melhorada com sucesso pela oxidação. A celulose bacteriana oxidada auxiliou no reparo de nervos periféricos *in vitro*, indicando que as taxas de degradação são altamente dependentes dos graus de oxidação (HOU *et al.*, 2018).

O ambiente aquático marinho ou de água doce também apresentam uma diversidade de organismos que despertam interesse como possíveis biomateriais naturais de interesse biomédico, entre eles a pele de peixes, pérola de ostras, exoesqueleto de caranguejos, estrutura dos corais, produtos obtidos de diversos tipos de algas entre outros.

A pele da tilápia desperta interesse como biomaterial para bioengenharia, porque possui resistência à tração, e colágeno em sua constituição. A análise histológica de tecido subcutâneo de rato tratado com a pele da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) demonstrou que a cicatrização nos grupos tratados com a pele da tilápia foi alta devido a sua capacidade de obstruir a ferida, minimizando exsudatos e a formação de crostas nas queimaduras de segundo grau profunda (JUNIOR *et al.*, 2017).

Segundo Popa *et al.* (2014) as carragenas obtidas a partir de algas marinhas vermelhas são atrativas para a engenharia de tecidos devido a sua semelhança estrutural com componentes da MEC como os glicosaminoglicanos, o que pode levar a reações biológicas compatíveis. Hidrogéis de carragenina não causaram sinais de infecção, necrose, reação inflamatória e a imunohistoquímica mostrou poucos linfócitos ativados positivos no implante subcutâneo de ratos indicando que elas podem ser mais estudados para aplicações regenerativas.

Outro material natural de interesse na área de biomateriais é o alginato, um polissacarídeo que tem como principal fonte a parede celular de diversas espécies de algas marinhas marrons, ou então pode ser sintetizado por algumas bactérias, como as espécies *Pseudomonas* e *Azotobacter*. Sendo um material de alta pureza e biocompatibilidade tem grande interesse em aplicações na área médica, principalmente como andaimos (PIRES *et al.*, 2015; DOLCIMASCOLO, 2019).

A pérola é o resultado de uma espécie de defesa de organismo do molusco, é feita de carbonato de cálcio, e contém moléculas de sinal que podem ativar as células da medula óssea relacionadas à osteogênese. Em cultura de células a

adição de pó de pérola a um polímero promoveu levemente a proliferação de CTMs (células-tronco mesenquimais) auxiliando na fixação e disseminação celular (WU *et al.*, 2019).

O corpo humano também pode oferecer biomateriais que podem auxiliar no processo de regeneração. O AM (âmnio) é uma estrutura que tem sido investigado como um biomaterial para a cura de lesões gerando uma baixa resposta imune e redução da formação de cicatrizes. O AM possui uma MEC rica em colágeno, laminina, fibronectina, elastina e proteoglicanos. A matriz do AM isolada contém fatores de crescimento e citocinas que são componentes importantes da cascata de cicatrização de feridas (HORTENSIUS; HARLEY, 2016).

O ácido hialurônico (HA) é uma substância natural, produzida pelo nosso corpo, que tem sido amplamente utilizado como material natural biodegradável. Em um modelo de camundongo o enchimento injetável de gordura autóloga com ácido hialurônico não induziu uma reação de corpo estranho e mostrou expressão do fator de crescimento endotelial vascular indicando biocompatibilidade (KIM *et al.*, 2020).

Já os adesivos fibrínicos são estruturas oriundas de proteínas do plasma da rede de coagulação de humanos ou de outros animais e são utilizados como agentes hemostáticos e indutores de processo de cicatrização, por ser uma membrana de fibrina é um biomaterial natural rico em glicoproteínas e em fatores de crescimento e por ser autólogo, existe baixo risco de rejeição (GRADY *et al.*, 2000; REZENDE *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2018).

Grady *et al.* (2000) em sua pesquisa com adesivo de fibrina em enxertos na pele de porcos demonstrou que não foram evidentes sinais de cicatrização anormal, inflamação exacerbada, porém relatou que o uso indiscriminado de adesivo de tecido de fibrina pode resultar em falha do enxerto por inibir a neovascularização.

A fibrina é um excelente material de suporte no entanto, as propriedades mecânicas da fibrina podem não ser suficientes. Mas, se combinada com materiais poliméricos exibe propriedades mecânicas equilibradas, bem como boas propriedades de compatibilidade celular; portanto, um material promissor de engenharia de tecidos (YANG; WANG, 2020).

2.9 BIOMATERIAIS COMO "SCAFFOLDS"

Os biomateriais podem ser utilizados como arcabouços e estes são fundamentais na Engenharia de Tecidos porque fornecem o suporte estrutural à fixação e crescimento das células, criando um microambiente propício para a substituição ou reparação dos tecidos, auxiliando estruturalmente o tecido recém-formado (HUANG, 2010).

Tais suportes, conhecidos pelo termo em inglês *scaffolds*, têm funções de serem uma matriz biocompatível com porosidade, rugosidade, estrutura tridimensional, propriedades mecânicas adequadas e devem ser feitos de materiais com biodegradabilidade ou biorreabsorbilidade controlada, para que o tecido acabe substituindo o andaime em tempo suficiente. Além de interagir com o local do implante, eles têm a capacidade de influenciar processos biológicos importantes para a regeneração do tecido, tais como cinética celular por meio de disponibilização às células de fatores de crescimento e outros sinais bioquímicos apropriados, de forma a propiciar um microambiente que mimetize a MEC (HUTMACHER, 2001; PIRES *et al.*, 2015; HORTENSIUS; HARLEY, 2016; DOLCIMASCOLO, 2019).

No geral uma ampla variedade de biomateriais naturais, incluindo quitina, celulose, colágeno, matriz óssea desmineralizada, gelatina, fibroína da seda, alginato, fibrina, quitosana, ácido hialurônico etc. têm sido usado como *scaffolds* para tratamento de diversos órgãos comprometidos no corpo humano e estudados atualmente para auxiliar no processo de cinética celular para o reparo tecidual (DOLCIMASCOLO, 2019).

Devido à sua biocompatibilidade, a celulose bacteriana tem sido muito usada como *scaffold* para aplicação em engenharia de tecidos. Vários estudos confirmaram que células diferentes, como condrócitos (SVENSSON *et al.*, 2005), células do músculo liso humano (BÄCKDAHL *et al.*, 2006), células renais embrionárias humanas (GRANDE *et al.*, 2009), osteoblastos formadores de ossos e fibroblastos (CHEN *et al.*, 2009) podem crescer na presença desse material.

O colágeno é um material natural extraído de fontes animais como vacas, cobras, porcos e ovelhas, que apresenta muitos estudos com relação a sua atuação como andaime para regeneração tecidual porque desempenha um papel importante

como proteína estrutural nos tecidos conjuntivos fornecendo suporte mecânico (WANG *et al.*, 2017).

Em geral, o colágeno não modificado, quando usado como material de andaime demonstrou taxas de degradação muito rápidas. Portanto, foram necessárias modificações químicas e reticulação química para melhorar suas propriedades físico-químicas. O colágeno extraído da escama de peixe e modificado para colágeno metilado aumentou a resistência à biodegradação dos adesivos de colágeno, e ausência de resposta imune exacerbada (WANG *et al.*, 2017).

Scaffolds tridimensionais estáveis de zeína (proteínas do milho) formadas por uma estrutura porosa com interconectivos exibiram bom comportamento de degradação, adesão, crescimento e proliferação de CTMs (células-tronco mesenquimais) indicando propriedades osteocondutoras (GONG *et al.*, 2006).

Scaffolds de queratina extraída da pena de galinha combinada com polímeros exibiram um aumento da resistência mecânica e a presença de queratina foi relacionada a um aumento da bioatividade no tecido, indicando uma boa compatibilidade (MOEIN; NADER; SHAHROKH, 2020).

Um *scaffold* vascular baseado em proteína de seda de aranha, gelatina e PLC (policaprolactona) como substitutos funcionais de vasos sanguíneos produziu maior suscetibilidade à porosidade, boas propriedades mecânicas, hemocompatibilidade, pouca resposta pró-inflamatória notável e facilitou o crescimento de células hospedeiras, portanto os autores consideraram-o como bom candidato para engenharia de tecidos vasculares (XIANG *et al.*, 2018).

Os *scaffolds* que merecem destaque são os derivados de polissacarídeos naturais e são promissores porque se assemelham aos glicosaminoglicanos da MEC. Ao mimetizarem a MEC, podem interagir com as células de maneira específica e direcionada a fim de obter comportamentos específicos, relacionados à adesão, espalhamento, crescimento e diferenciação celular (NASCIMENTO; LOMBELLO, 2016; DOLCIMASCOLO, 2019).

A quitina e quitosana são exemplos de polissacarídeos considerados como biomateriais que estão tendo resultados positivos em pesquisas. A quitina e quitosana são polímeros atóxicos, biodegradáveis, biocompatíveis apresentando um famoso potencial de uso na área biomédica e farmacêutica. São biomateriais úteis para o tratamento de lesões, uma vez que estão sendo capazes de acelerar a

cicatrização de lesões e a síntese de colágeno pelos fibroblastos, caracterizando-se como bioativos. São encontradas em diversas fontes naturais como algas, fungos e exoesqueleto de artrópodes. A quitosana é encontrada como produto da reação de desacetilação da quitina, tendo características similares à quitina (BRITO, 2009; PIRES *et al.*, 2015; DOLCIMASCOLO, 2019).

Um fator importantíssimo apresentado por quitina e quitosana é a sua biocompatibilidade e seu uso já aceito como biomaterial, o que viabiliza ainda mais as pesquisas em materiais que apresentam quitina ou componentes derivados de quitina e quitosana em sua constituição, como é o caso de uma planta que possui derivados de quitina na composição do seu fruto conhecido popularmente como bucha ou esponja vegetal (CROISIER; JEROME, 2013; MOUTINHO, 2019).

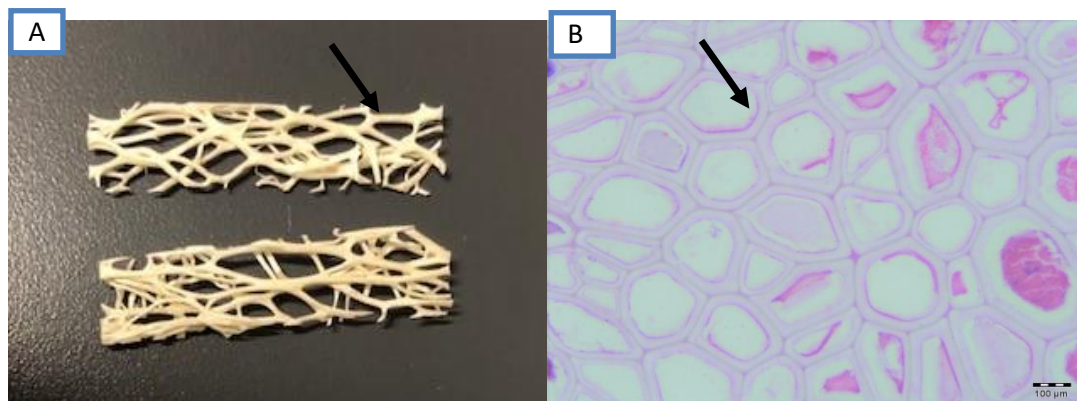
2.10 BUCHA VEGETAL COMO UM POSSÍVEL BIOMATERIAL TIPO SCAFFOLD

Dentre os diversos biomateriais vegetais disponíveis e interessantes para a análise de sua biocompatibilidade está a bucha vegetal, denominada cientificamente como *Luffa aegyptiaca mill.* As fibras da bucha possuem uma estrutura fibrosa, porosa e resistente, por isso, tem recebido atenção por parte dos pesquisadores para diversas aplicações nas áreas de engenharia civil e biomédicas (CHEN *et al.*, 2003; SOUZA, 2017).

A bucha vegetal pertence à família *Cucurbitaceae* e são uma das famílias mais importantes de plantas utilizadas para produção de fibras. O gênero *Luffa* é composto por várias espécies tais como *L. echinata*, *L. acutangula*, *L. Aegyptiaca mill*, e *L. graveolens*, *L. quinquefida*, *L. operculata* e *L. astorii* (BISOGLI, 2002). As espécies americanas são bastante semelhantes entre si, porém a *Luffa aegyptiaca mill* é a espécie mais cultivada (HEISER; SCHILLING, 1990).

De acordo com Zamperi *et al.* (2006) e Jiang *et al.* (2014) as fibras da bucha vegetal são formadas por vários filamentos entrelaçados (figura 2 A - seta) que apresentam em uma seção transversal, um formato arredondado formado por microcanais com diâmetro de 10–20 μm e um espaço central, como presente em outras fibras lignocelulósicas, e conforme mostrado na figura 2 B (seta).

Figura 2 - Morfologia do fruto da *Luffa aegyptiaca mill*



(A) Fragmento de bucha vegetal mostrando as filamentos entrelaçados da bucha vegetal. (B) Corte histológico transversal mostrando os microcanais (seta) que formam um filamento da bucha vegetal. Fonte: autores.

Segundo Jiang *et al.* (2014) devido ao fato das fibras secas da esponja serem tenazes e não apresentarem dissolução após a altas temperaturas suspeitou-se que um dos principais componentes dessas fibras fosse quitina. E assim, por meio das técnicas de cromatografia TLC (cromatografia em camada delgada, do inglês *Thin Layer Chromatography*) e HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) foi confirmado que a *Luffa aegyptiaca mill* é composta principalmente poli-N-acetilglucosamina, um dos principais componentes da quitina.

As características apresentadas pela esponja vegetal são propriedades físicas e químicas importantes para o processo de cinética celular, de adesão, proliferação e migração celular (PIRES *et al.*, 2015).

Em um estudo *in vivo* em ratos com a intenção de obter substituto de pele foi realizado um experimento com uma membrana obtida do fruto seco esponja vegetal (*Luffa aegyptiaca mill*). Os resultados indicaram que a membrana mostrou um aumento significativo na cicatrização da ferida em comparação com a gaze de algodão, e quando comparado com a membrana de quitina extraída do fungo *Ganoderma sp* a diferença da melhora cicatricial foi mínima (JIANG *et al.*, 2014). Porém vale ressaltar que nesse trabalho foi feito somente análises por observação visual e fotografias externas da pele, não foram realizados testes histológicos de histobiocompatibilidade.

Cecen *et al.* (2016) testaram a biocompatibilidade e as características biomecânicas de *scaffolds* fibrosos de bucha vegetal combinados com hidroxapatita (HA), celulose, suportes de ácido poli-ácido-lático (PLLA) com células da cartilagem

em condições *in vitro*. Foram feitos grupos de *scaffolds* à base de bucha, HA, PLLA e celulose. A avaliação histológica realizada indicou que o suporte fibroso a partir de bucha vegetal apresentou propriedades desejáveis e pode ser um bom candidato para aplicações de engenharia de tecido.

Chen e Liu (2005) em cultivo *in vitro* testaram um arcabouço de *Luffa* para a cultura de hepatócitos de ratos. Os experimentos demonstraram que a estrutura macroporosa e a natureza quitinosa do material fibroso desse material aumentaram a agregação de hepatócitos e facilitaram seu desempenho, e se mostrou um material compatível para engenharia de tecidos.

Em um outro experimento a esponja de *Luffa* foi investigada como um arcabouço tridimensional em uma cultura estacionária de hepatoblastoma C3A / HepG2 e comparada com a espuma de poliuretano (PU). As fibras da bucha poderiam fornecer mais locais para fixação e crescimento celular do que as da espuma de PU. Foi relatado também que as células sempre cresciam preferencialmente nos recortes da fibra da bucha, e por isso os recortes da bucha desempenham um papel importante no apoio ao crescimento das células, validando que a bucha pode apresentar um potencial biotecnológico na reparação de tecidos humanos e podem ser testados *in vivo* (CHEN *et al.*, 2003).

Dessa forma, a partir dessa breve revisão se observa que os estudos utilizando bucha vegetal na área de pesquisa biomédica ainda são iniciais e na maioria realizados com cultivo de células, o que limita os resultados de histocompatibilidade uma vez que em cultivo celular os componentes não sofrem a ação direta do sistema imunológico. Assim, diante do exposto, existe a necessidade da realização de testes *in vivo* para analisar a histocompatibilidade dos fragmentos da bucha vegetal quando em contato com tecidos animais.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar através da resposta tecidual e da expressão de MMPs, o potencial de biocompatibilidade de implante subcutâneo de fragmentos de *Luffa aegyptiaca mill* em ratos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar visualmente por microscopia de luz e por microscopia de varredura a evolução na formação da cápsula fibrosa.

- ✓ Determinar o número de eosinófilos e mastócitos dentro e fora da cápsula fibrosa induzida pelo implante da bucha vegetal.
- ✓ Avaliar visualmente a presença de macrófagos e células gigantes multinucleadas como componentes da reação tecidal.
- ✓ Estimar a deposição do colágeno na cápsula fibrosa como componentes da reação ao material implantado.
- ✓ Identificar a atividade das MMPs por técnicas de imunohistoquímica e zimografia.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO

O cálculo amostral foi realizado com base em estudos prévios realizados com metodologia semelhante descritos na literatura (WANG *et al.*, 2017; XIANG *et al.*, 2018). Foi adotado um nível de significância de $\alpha=0,05$ sendo que os cálculos foram realizados com base na variância média, desvio padrão e diferença mínima entre médias, por meio do teste ANOVA, com um poder do teste de 80%. Assim, se determinou um tamanho de amostra total de 4 animais por tempo de avaliação (grupos), através do uso do programa do Bioestat 5.3. O grupos/tempos avaliados foram de 15, 45 e 90 dias.

Neste estudo, considerando a necessidade da redução do número de animais utilizados em experimentação e de acordo com o preconizado pelos princípios dos 3R (do inglês: *Replacement, Reduction and Refinement*), não foram utilizados animais como grupo controle. Essa decisão se baseou em resultados anteriores do laboratório os quais mostraram que em animais do grupo controle não existe reação inflamatória no tecido subcutâneo em condições normais. Portanto, diante dessa constatação concluímos que usar animais controles não é relevante dentro de uma comparação com animais que sofrem um procedimento experimental de implante subcutâneo cujo interesse é a observação ao longo do tempo. Entretanto, para a técnica de zimografia, foram coletados fragmentos de pele distante do local de implantação da bucha vegetal, que foram denominados de grupo controle, para se realizar a comparação da expressão das MMPs com aqueles locais onde a bucha vegetal foi implantada.

4.2 ANIMAIS E GRUPOS

A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética do uso de animais da UEPG sob Protocolo n.º 19000002362-2/2019. Foram usados 12 ratos machos (aproximadamente 300g) da linhagem Wistar da população de criação do NAEVI da UEPG mantidos sobre condições de temperatura, luminosidade, alimentação e água padronizadas pelo NAEVI.

Foram utilizados 12 animais divididos em 3 (três) grupos:

Grupo A₁: animais sacrificados com 15 dias após etapa cirúrgica – 4 animais;

Grupo A₂: animais sacrificados com 45 dias após etapa cirúrgica – 4 animais;

Grupo A₃: animais sacrificados com 90 dias após etapa cirúrgica – 4 animais;

Grupo controle: fragmentos de tecidos de pele em regiões dos animais que não apresentavam o fragmento de esponja vegetal foram coletados apenas para a técnica de zimografia conforme já informado anteriormente.

4.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Obtenção da *Luffa aegyptiaca mill* (Bucha vegetal)

Para os procedimentos foi usada uma unidade de esponja vegetal obtida da localidade Ivaí no Estado do Paraná conforme as seguintes coordenadas geográficas: longitude 50°54'25.261"W, latitude 24°55'38.532"S e altitude de 561m.

A Lei nº 13.123 de 2015 determinou a elaboração de uma lista de espécies introduzidas no território nacional (exóticas). A pretensão na elaboração dessa lista de espécies de plantas é assegurar aos usuários regras claras sobre para quais espécies não se aplicam as regras da Lei da Biodiversidade e, portanto, as pesquisas com essas espécies não devem ser cadastradas no SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético). A lista de espécies vegetais introduzidas foi atualizada pela Instrução Normativa nº 3, de 20 de março de 2019, e nessa lista consta que a esponja vegetal da espécie *Luffa aegyptiaca mill* por ser uma espécie introduzida no país, não é considerada patrimônio genético brasileiro, estando isento o seu cadastro no SisGen.

Após retirada da casca o fruto da esponja vegetal, as fibras dos frutos secos foram cortadas em fragmentos menores, lavadas com hipoclorito a 0,1% para despigmentar as fibras e lavadas na sequência, para retirada do hipoclorito, com água deionizada. Após isso, foram secas em estufa a 50° C, foram reduzidas a fragmentos de 1,5 cm por 2cm, envelopadas em papel craft e esterilizadas durante 20 minutos a 120° C, e novamente secas em estufa a 50° C e mantidas sob pressão para redução da altura da trama fibrosa (JIANG *et al.*, 2014).

Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados com Pentobarbital 40mg/kg. Em seguida, foram posicionados em decúbito ventral para fazer a tricotomia do dorso entre as escápulas. Após isso, a assepsia do local e da pele foi feita com álcool 70%. Foram feitas duas incisões laterais de 3 a 4cm usando um bisturi e foi aberto um espaço entre a pele e o músculo utilizando uma tesoura cirúrgica previamente esterilizada e imediatamente a isso nas duas incisões laterais inseriram-se os fragmentos da *Luffa aegyptiaca mill* uma para cada corte. As suturas foram realizadas com fio de Nylon e a assepsia foi feita com álcool 70% na superfície da pele do local do implante. Após a cirurgia, ainda anestesiados, os animais receberam uma dose intraperitoneal de 30mg/kg de dipirona sódica. Os animais ficaram em observação por 48 horas após a cirurgia e receberam nesse período analgésico a cada 8 horas. Os animais foram monitorados diariamente, permanecendo em gaiolas separadas sob as condições padrões do biotério até a coleta das amostras.

Obtenção das amostras

Em cada tempo de avaliação (15, 45 e 90 dias) os ratos foram anestesiados com hidrato de cloral 10% via intraperitoneal para a tricotomia do dorso e a realização da biópsia excisional da área do implante com finalização da eutanásia após a coleta dos fragmentos de pele. Foram retirados os segmentos do tecido subcutâneo abrangendo toda a região dos implantes de esponja vegetal. O tecido subcutâneo extraído possuindo o biomaterial de cada animal foi dividido em três partes aonde duas imersas em fixador paraformaldeído a 2% por 24 horas e posteriormente estocado em álcool 70% para posterior processamento para as análises morfológicas por microscopia eletrônica de varredura, microscopia de luz e imunohistoquímica. O terceiro fragmento foi estocado em tampão de extração de proteína (Tris- HCl 50Mm, CaCl₂ 5mM, NaCl 0,9%, pH 7,5) a - 20°C para posterior análise por zimografia.

Processamento histológico

Após fixação em paraformaldeído 2% por 24 horas, as amostras foram desidratadas em série crescente alcóolica, diafanizadas em xilol e incluídas em paraplast. Foram obtidos por animal em cada tempo 3 lâminas contendo 3 cortes semi serriados em microtômo, com 5µm de espessura que foram submetidas aos métodos de colorações e imunohistoquímica.

Avaliação dos parâmetros de compatibilidade dos fragmentos de bucha

Peso dos animais e análise clínica: Todos os animais foram pesados no dia do procedimento cirúrgico, o que foi considerado como tempo zero para fins de comparação com o peso medido semanalmente após o procedimento cirúrgico. Uma avaliação clínica também foi realizada semanalmente por apalpação para se observar a presença do material implantado ao longo dos tempos estudados. Essas análises foram realizadas como parâmetros de controle da saúde dos animais.

Análise morfológica pela microscopia eletrônica de varredura: Após fixação, os fragmentos coletados foram processados para análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para isso as amostras foram desidratadas em série crescente de álcool etílico e secas na estufa a 37°C por uma semana. Posteriormente foram metalizadas e obtidas as imagens em MEV no complexo LABMU.

Avaliação de eosinófilos e mastócitos no processo inflamatório: Foi avaliado pela contagem dos eosinófilos e mastócitos após os cortes serem corados na solução de May-Grunwald-Giemsa. As contagens foram realizadas em 2 regiões: na cápsula fibrosa ao redor da esponja vegetal e no tecido conjuntivo situado fora da cápsula. Foram analisados 8 campos em 3 cortes por animal em cada tempo avaliado. As contagens foram realizadas em microscópio de luz no aumento de 400 X.

Avaliação visual de macrófagos e células gigantes multinucleadas na reação inflamatória: Essa análise foi realizada utilizando-se as lâminas coradas em hematoxilina e eosina (H&E) e coloração de Giemsa em aumento de 400X. Os macrófagos isolados foram identificados pela presença de material fagocitado, visíveis como estruturas amareladas e a presença de células gigantes foram

identificados como aglomerados de núcleos envolvidos por citoplasma. A coloração de violeta de genciana para foi usada para verificação da presença de bactérias em resposta a reação do tecido ao material implantado.

Avaliação visual da deposição das fibras colágenas na reparação tecidual:

Essa análise foi realizada utilizando-se as lâminas coradas em tricômico de Masson em aumento de 400X. Considerou-se para essa análise a presença de fibras colágenas presentes na cápsula conjuntiva localizada entre os fragmentos implantados e ao redor destes.

Estimativa da deposição de fibras colágenas durante a formação da cápsula:

Esta análise foi realizada nos cortes corados em tricômico de Masson, utilizando-se fotomicroscópio de luz no aumento de 1000X. Foram obtidas imagens de 3 campos em 3 cortes por rato e tempo de avaliação. Após isso, as imagens foram submetidas ao programa ImageJ utilizando a ferramenta *colour deconvolution* para quantificar a intensidade da cor das fibras colágenas expressa em pixel.

Análise imunohistoquímica para MMP-2 e MMP-9: Para esta análise, as lâminas contendo os cortes de cada rato por tempo avaliado, foram desparafinadas em xilol, reidratadas em soluções alcoólicas decrescentes (100% à 70%) e submetidas à recuperação antingênica em ácido cítrico 10 mM por 20 minutos a uma temperatura de 96 °C. Depois disso, os cortes foram tratados 3 vezes em peróxido de hidrogênio a 2% por 10 minutos cada, para inibir a atividade da peroxidase endógena. Os cortes foram lavados em água e em PBS tampão fosfato-salino (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 4,3 21 mM; KH₂PO₄ 1,47 mM, pH 7,4) e incubados em BSA (albumina de soro bovino) 3% por 1 h em temperatura ambiente para bloquear ligações inespecíficas. Após o bloqueio os cortes foram lavados em PBS e incubados por 8 horas com anticorpos primários anti-MMP-2 (MAB 13405) e anti-MMP-9 monoclonal (Millipore NG1865055) ambos nas concentrações de 1:500 diluídos em PBS contendo 1% de BSA (em cada lâmina dois cortes foram incubados com anticorpo e um corte foi usado como controle negativo, omitido o anticorpo primário). Os cortes foram então lavados em PBS e incubados com anticorpo secundário biotilado utilizando DAKO (kit Universal LSAB) durante 30 min a 37°C na estufa. Após lavagem em PBS, os cortes foram incubados em uma solução de 80 ml de PBS contendo 25mg de 3,3 diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich), 1 ml de H₂O₂ 20 volumes e 1 ml de DMSO (dimetilsulfóxido). O tempo de reação foi de 5

minutos, à temperatura ambiente. Os cortes foram lavados em água destilada e contracolorados com hematoxilina por 1 minuto. Após coloração, os cortes foram desidratados e montados com lâminulas usando Permount. Para a MMP-9, foram obtidas imagens com aumento de 400X e, após isso, as imagens foram submetidas ao programa Image J utilizando a ferramenta *colour deconvolution* para quantificar a intensidade média da imunomarcação sendo expressa em pixel.

Análise das MMPs por zimografia: para análise da atividade proteolítica de MMP-9 os fragmentos coletados em tampão de extração de proteína (Tris- HCl 50Mm, CaCl₂ 5mM, NaCl 0,9%, pH 7,5) foram submetidos a destruição mecânica com o uso do aparelho IKA T10 basic, para separação do fragmento do tecido subcutâneo, após isso o homogeneizado foi centrifugado à 4°C, 15.000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e de cada amostra foi determinada a quantidade de proteínas totais por meio do método de Bradford. Após isso, amostras contendo 3 µg/µl de proteína total de cada rato e por tempo foram misturadas e submetidas a técnica de zimografia em dois géis de poliacrilamida 10%, contendo 28mg/ml de gelatina como substrato. Como controle positivo da presença de proteases uma amostra de intestino obtida de rato com 30 dias de vida proveniente de trabalho anterior do laboratório também foi submetida a zimografia. Cabe ressaltar que na amostra positiva foi detectado anteriormente (DOS REIS, 2019) que não existe apenas metaloproteinases mas também cisteínases e serinases. Os géis foram submetidos à eletroforese com 120V à temperatura ambiente. Após a eletroforese os géis foram lavados duas vezes em Triton-X por 15 minutos cada, à temperatura ambiente, para eliminar o SDS dos géis e renaturar as proteases. Depois foram incubados separadamente por 16 horas à 37°C em tampão Tris-HCl 50 mM, CaCl 5 mM, pH 7,4. Em um dos tampões foi adicionado 5mM de 1,10-fenantrolina como inibidor específico de MMPs. Após o *overnight*, os géis foram corados com solução Comassie Brilliant Blue por 2 horas. A atividade enzimática foi detectada pelas bandas descoradas em fundo azul indicando degradação da gelatina ou ausência de bandas no gel submetido ao inibidor de MMPs.

Análise estatística

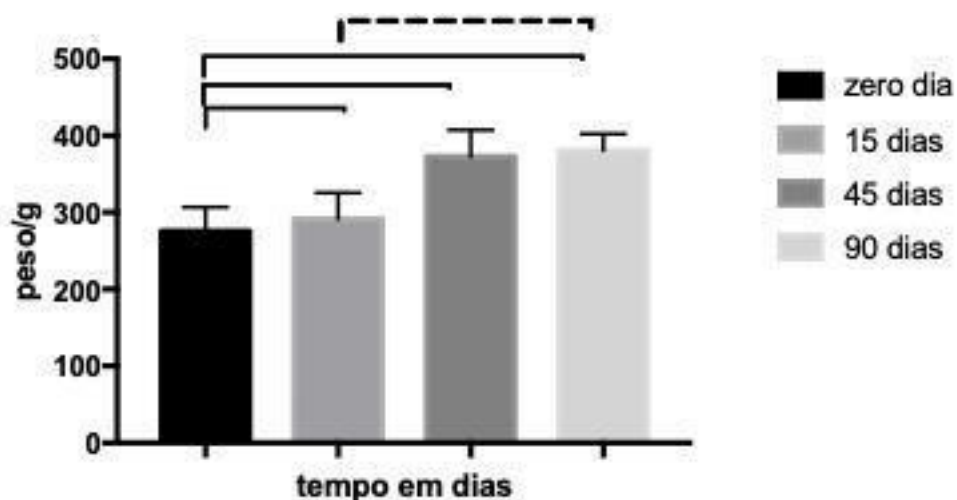
Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente pelo programa GraphPad Prism® 5.01. O teste de *Shapiro-Wilk* foi aplicado para verificar a aderência dos resultados à distribuição normal e, após isso, os resultados da contagem do número de eosinófilos e mastócitos, e da deposição do colágeno foram analisados pelo teste *Kruskal Wallis* com pós teste de Dunn para comparação das medianas. Os demais parâmetros foram analisados pelo método de Análise de Variância Simples (One Way ANOVA), com pós teste de Tukey, e foram expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. Para a verificação das diferenças estatísticas dos parâmetros avaliados foi adotado como critério de significância no nível de $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

Peso dos animais e avaliação clínica

A figura 3 mostra o resultado da média do peso dos animais no tempo zero, considerado como o dia do procedimento cirúrgico para comparação com o peso obtido em cada tempo avaliado (15, 45 e 90 dias). A análise estatística mostrou um aumento significativo ($P < 0,05$) do peso dos animais ao longo das semanas comparado com o tempo zero e, no tempo de 90 dias comparado com o tempo de 15 dias. A análise clínica mostrou que os fragmentos permaneceram implantados, entretanto, foi notado em alguns animais um constante movimento de prurido nos primeiros períodos avaliados, porém não foi constatado nenhum óbito dos animais.

Figura 3 - Peso corporal dos animais implantados com *Luffa aegyptiaca mill*



Média e desvio padrão do peso dos animais com o implante de *Luffa aegyptiaca mill* ao longo dos períodos de análises (zero dia, 15, 45 e 90 dias).

Fonte: Autores.

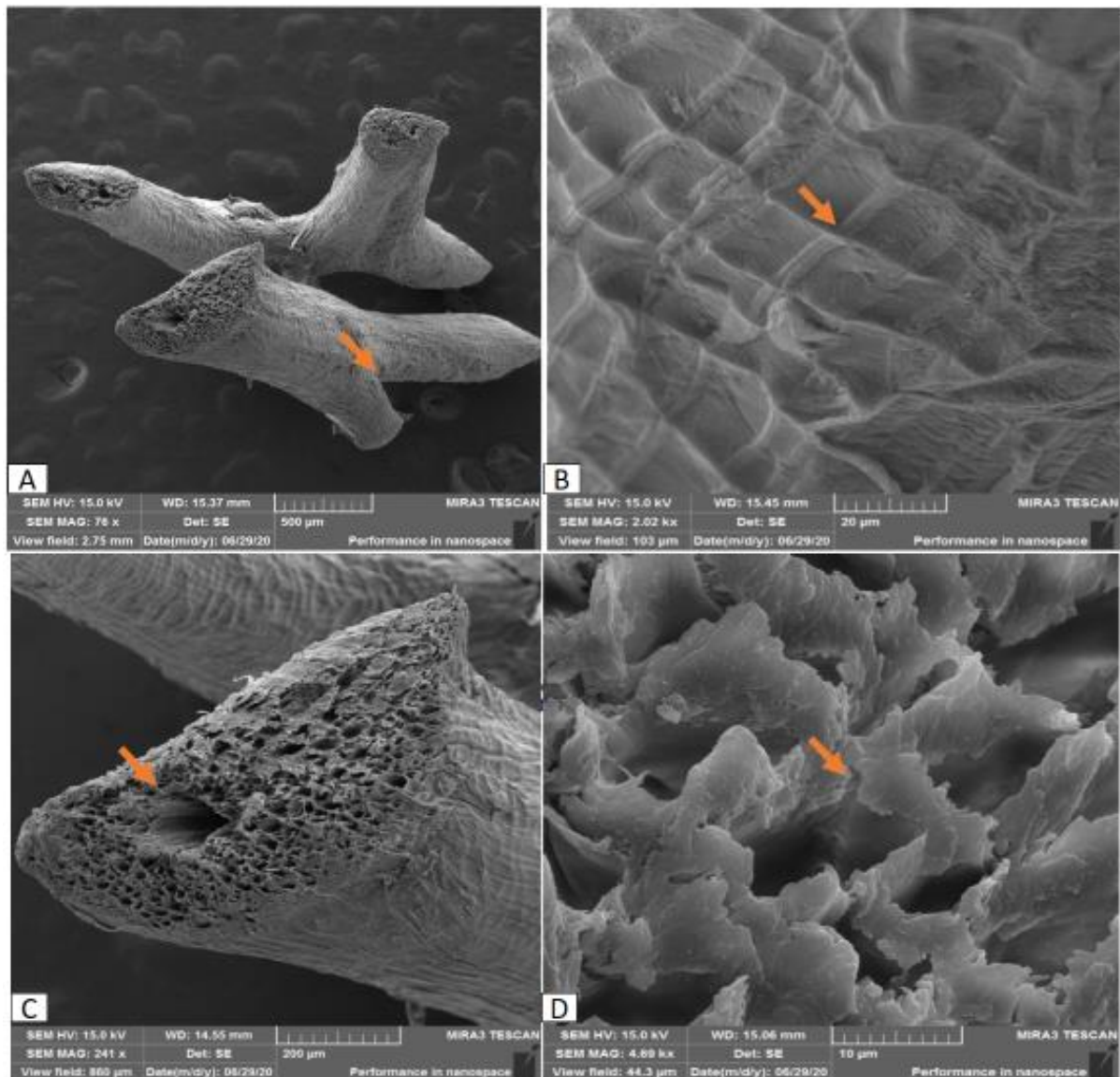
Avaliação visual da morfologia da *Luffa aegyptiaca mill* e da resposta tecidual em microscopia eletrônica de varredura e de luz

A análise morfológica por MEV mostra na figura 4 em A, um fragmento da estrutura de um filamento individual da bucha vegetal, destacando (seta) as bifurcações para formar uma estrutura filamentosa entrelaçada. A imagem B mostra a superfície escamosa e rugosa de um filamento da esponja vegetal com destaque (seta) para a região de contato entre as paredes adjacentes. Na imagem C é possível visualizar um corte transversal de um filamento individual mostrando o espaço central (seta) rodeado por microcanais que compõem cada filamento. Na imagem D é possível observar um corte transversal em maior detalhe da parede (seta) dos microcanais que compõem o filamento da *Luffa aegyptiaca mill* que se apresentam como estruturas escamosas e cônicas envolvendo o espaço que antes era preenchido pela célula vegetal.

Nos animais implantados com os fragmentos, a microscopia eletrônica de varredura mostra na figura 5 em (A, D, G) a presença de uma cápsula conjuntiva (setas) organizada de forma concêntrica ao redor das fibras e, desorganizada entre elas, em todos os tempos avaliados.

A observação em MEV mostrou que aos 15 dias (A, B, C) o interior do espaço central dos filamentos bem como dos microcanais na grande maioria ainda apresentavam uma luz visível (seta). Nos tempos de 45 dias (D, E, F) e 90 dias (G, H, I) a luz tanto do espaço central quanto das microcanais já se apresentavam preenchidos, na grande maioria, por prolongamentos de células (setas e círculos) com aspecto amorfo, e em alguns microcanais estruturas esféricas correspondentes a células, antes não observadas no tempo de 15 dias, indicando intensa migração das células para o interior dos microcanais do filamento da *Luffa aegyptiaca mill*.

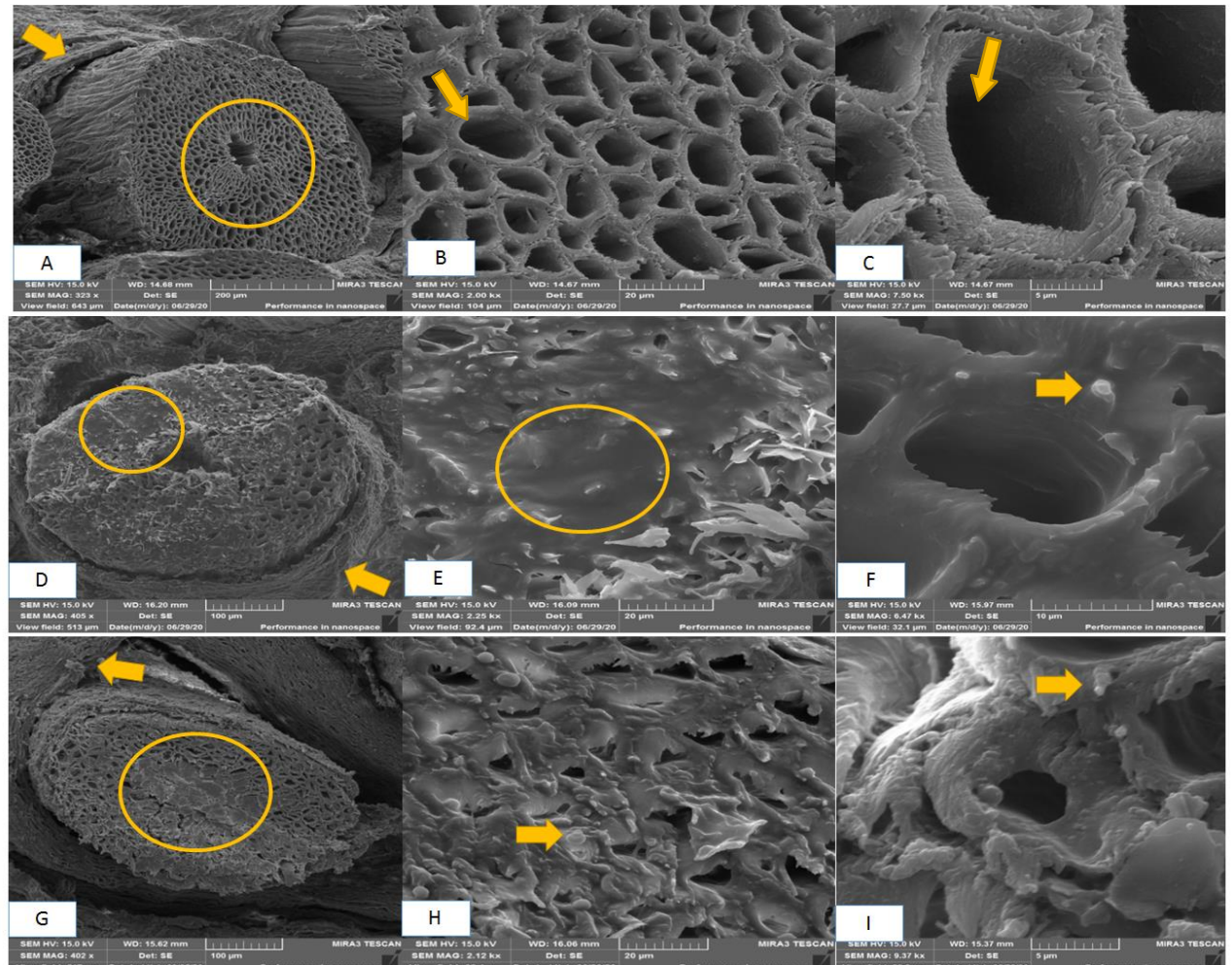
Figura 4 - Fotomicrografia por MEV do filamento da bucha vegetal



(A) Fragmentos individuais e suas bifurcações (seta). (B) Superfície externa da parede do filamento com aspecto rugoso e na seta, a região de ligação entre paredes adjacentes. (C) Secção transversal de um filamento mostrando o espaço central (seta) rodeado por microcanais. (D) Detalhe dos microcanais mostrando o padrão de organização.

Fonte: Autores.

Figura 5 - Fotomicrografia por MEV de fragmentos da bucha vegetal implantadas no subcutâneo dos ratos



Observação da cápsula conjuntiva (seta) em (A, D, G). (A) Secção transversal de um filamento de bucha vegetal no tempo de 15 dias com espaço central (círculo) rodeado por vários microcanais vazios, observados em detalhe em B e C. Com 45 dias (D) e 90 dias (G) os microcanais preenchidos (círculo) por células migratórias de diferentes tamanhos que podem ser observados nos detalhes (seta e círculo) em (E, F) e (H, I) correspondendo respectivamente aos tempos de 45 e 90 dias.

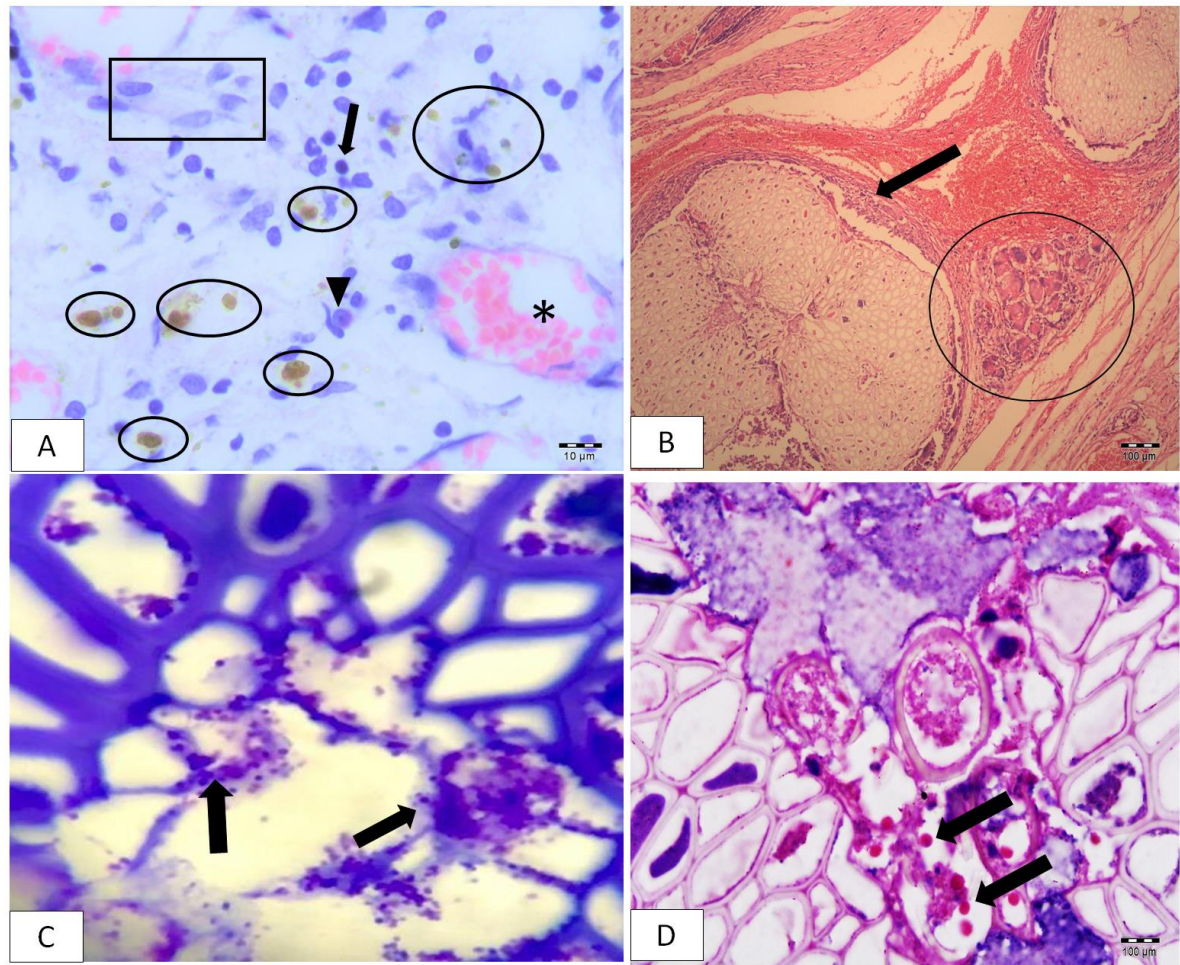
Fonte: Autores.

A análise visual por microscopia de luz mostrou nos cortes histológicos corados com Giemsa a presença de infiltrado inflamatório com destaques na figura 6 A para linfócitos (seta) plasmócitos (ponta de seta) macrófagos (círculo), além de fibroblastos (retângulo) e presença de vasos sanguíneos (*).

Em B corado em Hematoxilina e eosina (H&E) se destaca as células gigantes multinucleadas (círculo) formadas pela fusão de macrófagos, presentes entre o tecido conjuntivo fibroso (seta) produzido ao redor dos filamentos da bucha implantada. Aos 15 dias, as células gigantes eram pouco representativas ou ausentes em alguns cortes, porém no tempo de 45 dias elas foram observadas ao redor das cápsulas formando ilhas e, no período de 90 dias, essas células ainda estavam presentes no tecido.

Em todos tempos avaliados os microcanais encontravam-se preenchidos por células maiores de formato irregular, as quais não foi possível identificar se eram macrófagos ou fibroblastos e, por células muito pequenas e esféricas, onde após coloração com violeta de genciana figura 6 C (setas) presumiu-se serem bactérias do tipo cocos. Em alguns cortes também foram identificadas no interior dos fragmentos hemácias figura 6 D (seta), indicando migração de diferentes tipos de células para o interior dos microcanais dos filamentos da bucha implantados.

Figura 6 - Análise visual das células ao redor da *Luffa aegyptiaca* mill



(A) Presença de linfócitos (seta), plasmócitos (ponta de seta), macrófagos (círculo), fibroblastos (retângulo) e vasos sanguíneos (*) no tecido subcutâneo em Giemsa 1000x. (B) Observação de células gigantes multinucleadas (círculo) ao redor da bucha vegetal (seta) observadas em H&E 400x. (C) Presença de células redondas (seta) em coloração Genciana 1000x. E hemácias (seta) no espaço central da esponja em H&E 1000x (D).
Fonte: Autores.

Análise da organização das fibras colágenas da cápsula fibrosa

A implantação de fragmentos da esponja vegetal levou a formação de uma cápsula conjuntiva evidenciada pela coloração de Masson, que apresentou uma organização variada ao longo dos tempos avaliados conforme mostrado na figura 7.

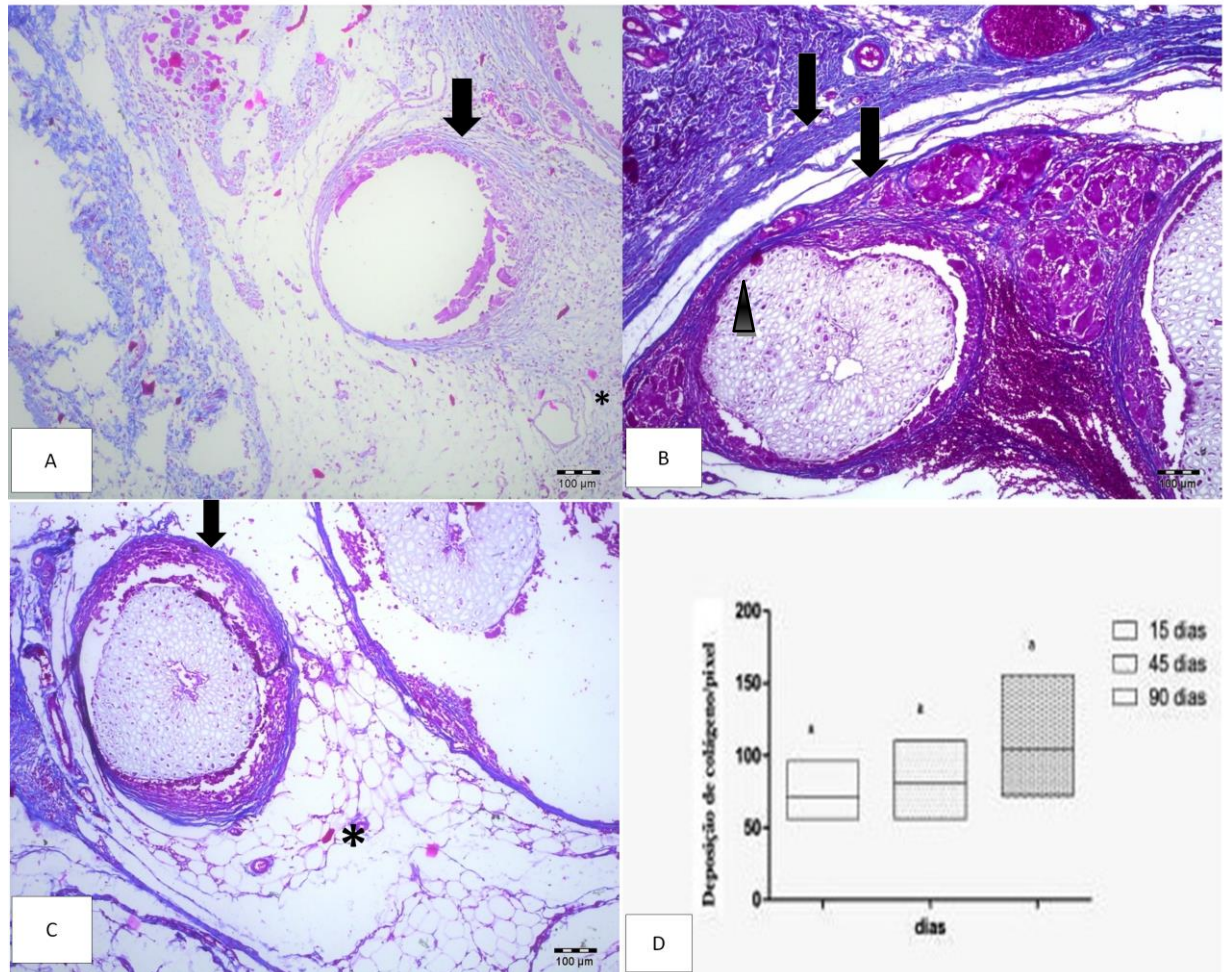
No tempo de 15 dias conforme a figura 7 A a análise visual mostrou que comparado com o tempo de 45 dias, a cápsula tinha uma espessura fina e frouxa composta principalmente por fibroblastos e poucas fibras colágenas (seta), porém, com um tecido conjuntivo mais frouxo entre os fragmentos da bucha ou em áreas mais distantes do fragmento (*).

No tempo de 45 dias a cápsula já se apresentava com uma espessura visivelmente mais densa, tanto ao redor dos fragmentos (seta) como também uma faixa de tecido conjuntivo fibroso (seta) mais organizado observado no limite entre a derme (*) e os fragmentos implantados (ponta da seta) sendo mostrado na figura 7 B.

Já no tempo de 90 dias mostrado na figura 7 C, a análise visual da morfologia da cápsula mostrou-se semelhante ao tempo de 15 dias, com redução visível dos seus componentes na cápsula e o tecido externo à cápsula mostrava a presença de tecido adiposo (*) composto por células adiposas multiloculares e uniloculares, o que não foi observado nos tempos anteriores.

Com o programa ImageJ e a coloração tricômico de Masson fez-se a análise quantitativa da deposição das fibras colágenas presentes na cápsula ao redor dos fragmentos implantados, sendo os resultados mostrados na Figura 7 D. A análise pelo programa ImageJ indica que quanto mais próximo de 200 pixel menor é a quantidade de fibras colágenas existentes. Dessa forma, a análise estatística mostrou que a quantidade das fibras colágenas é significativamente menor ($p < 0,05$) no tempo de 90 dias quando comparado com 45 e 15 dias respectivamente, e que entre 45 e 15 dias a proporção de fibras não se alterou.

Figura 7 - Estimativa da produção de fibras colágenas durante a formação da cápsula



Cortes histológicos em aumento de 400x: (A) 15 dias indicando a presença de poucas fibras colágenas na cápsula de espessura fina (seta) e no tecido (*). (B) Aos 45 dias, mostrando maior intensidade e organização de fibras colágenas na cápsula (seta) e ao redor da cápsula (seta) no limite entre a derme (*) e os fragmentos implantados (ponta da seta). (C) Aos 90 dias indicando a redução da espessura da cápsula e fibras colágenas no tecido circundante (seta) e presença do tecido adiposo (*). (D) Densidade das fibras colágenas na área implantada conforme software Image J, quanto maior o valor em pixel mais fraco é a densidade (letras diferentes indicam $P < 0.05$).

Fonte: Autores.

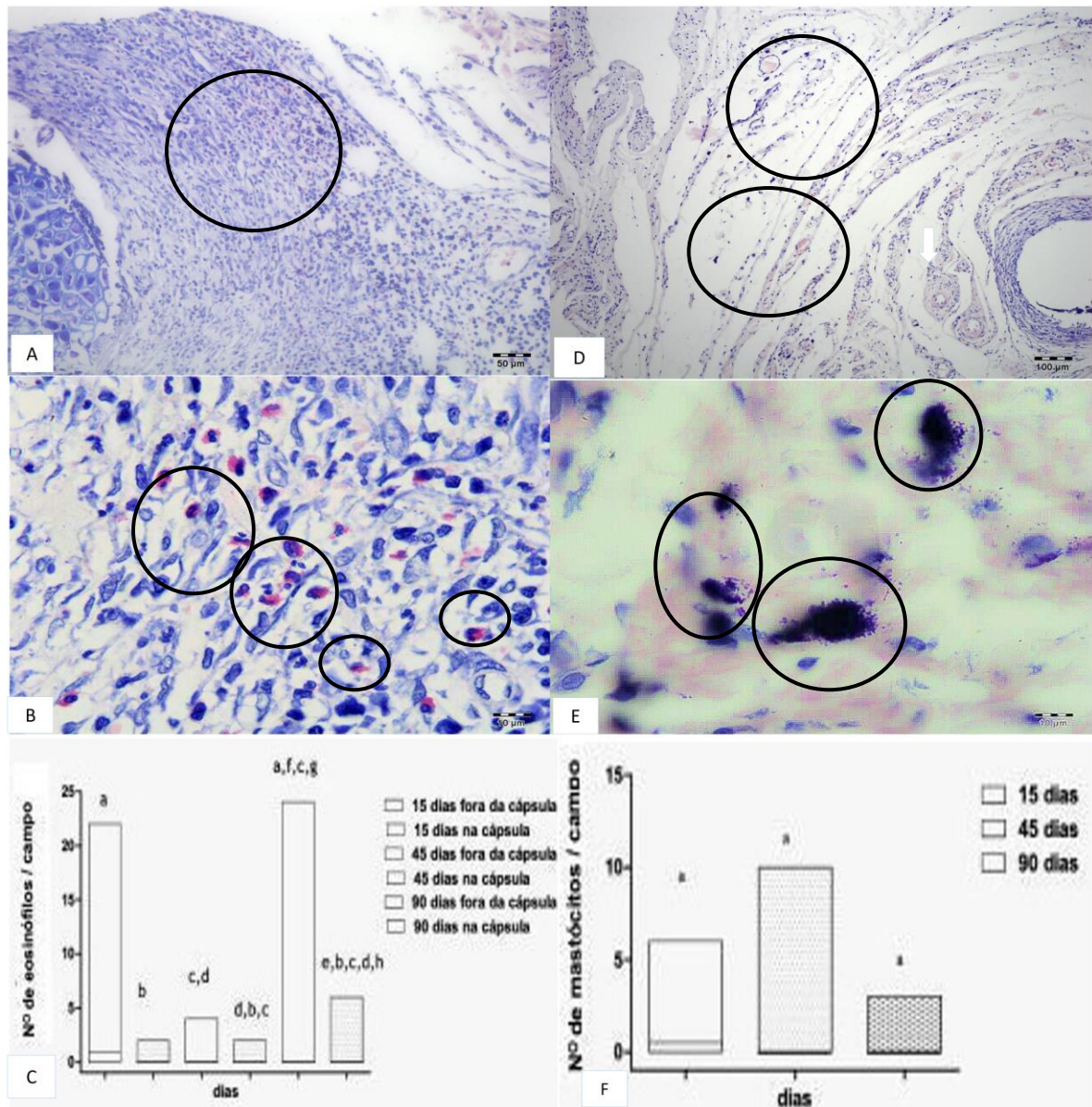
Análise de eosinófilos e mastócitos

Em relação aos eosinófilos a análise visual mostrou uma presença maior dessas células na região fora da cápsula quando comparadas com as células presentes na cápsula conforme mostra a figura 8 A (círculo) e em detalhes na figura 8 B (círculos).

A análise estatística mostrou que o número de eosinófilos fora da cápsula no tempo de 15 dias foi significativamente maior ($p < 0,05$) quando comparado com o número de eosinófilos contados na cápsula aos 15 dias, bem como foi maior ($p < 0,05$) dentro e fora da cápsula no tempo de 45 dias e, dentro da cápsula, no tempo de 90 dias respectivamente. No entanto, aos 90 dias o número de eosinófilos fora da cápsula foi estatisticamente maior ($p < 0,05$) quando comparado com os contados dentro da cápsula aos 90, 45 e 15 dias respectivamente conforme figura 8 C.

Para os mastócitos, a análise visual mostrou que essas células (círculos) estão presentes apenas na região externa da cápsula (seta) conforme mostra a figura 8 D e em detalhe na figura 8 E (círculos), entretanto, não se observou diferença estatística para o número de mastócitos fora da cápsula entre os tempos avaliados conforme mostra a figura 8 F.

Figura 8 - Presença de eosinófilos e mastócitos ao redor da *Luffa aegyptiaca* mill



(A) Observação dos eosinófilos (círculo) no tecido circundante à esponja vegetal em 400x e (B) detalhe dos eosinófilos em 1000x. (D) Observação dos mastócitos (círculo) ao redor da cápsula da esponja vegetal (seta) em 400x e (E) detalhe dos mastócitos em 1000x. (C,F) Mediana respectivamente da contagem de eosinófilos e mastócitos na cápsula e no tecido periférico à cápsula nos períodos de análises (15, 45 e 90 dias); (letras diferentes indicam $P < 0.05$).

Fonte: autores.

Análise da expressão da MMP-2 e MMP-9 por zimografia e imunohistoquímica

A zimografia mostrada na figura 9 A demonstrou que no tecido denominado de controle experimental ocorreu apenas a presença de duas bandas de MMP-2, a MMP-2 intermediária (66 kDa) e MMP-2 ativa (62 kDa), enquanto que em todos os tempos experimentais apareceram 3 bandas de MMP-2, a pró-MMP-2 (72 kDa), MMP-2 intermediária (66 kDa) e MMP-2 ativa (62 kDa). Quanto à MMP-9 foram detectadas duas bandas nas suas isoformas pró-MMP-9 (92kDa) e MMP-ativa (86 kDa) apenas nos tecidos implantados em todos os tempos avaliados.

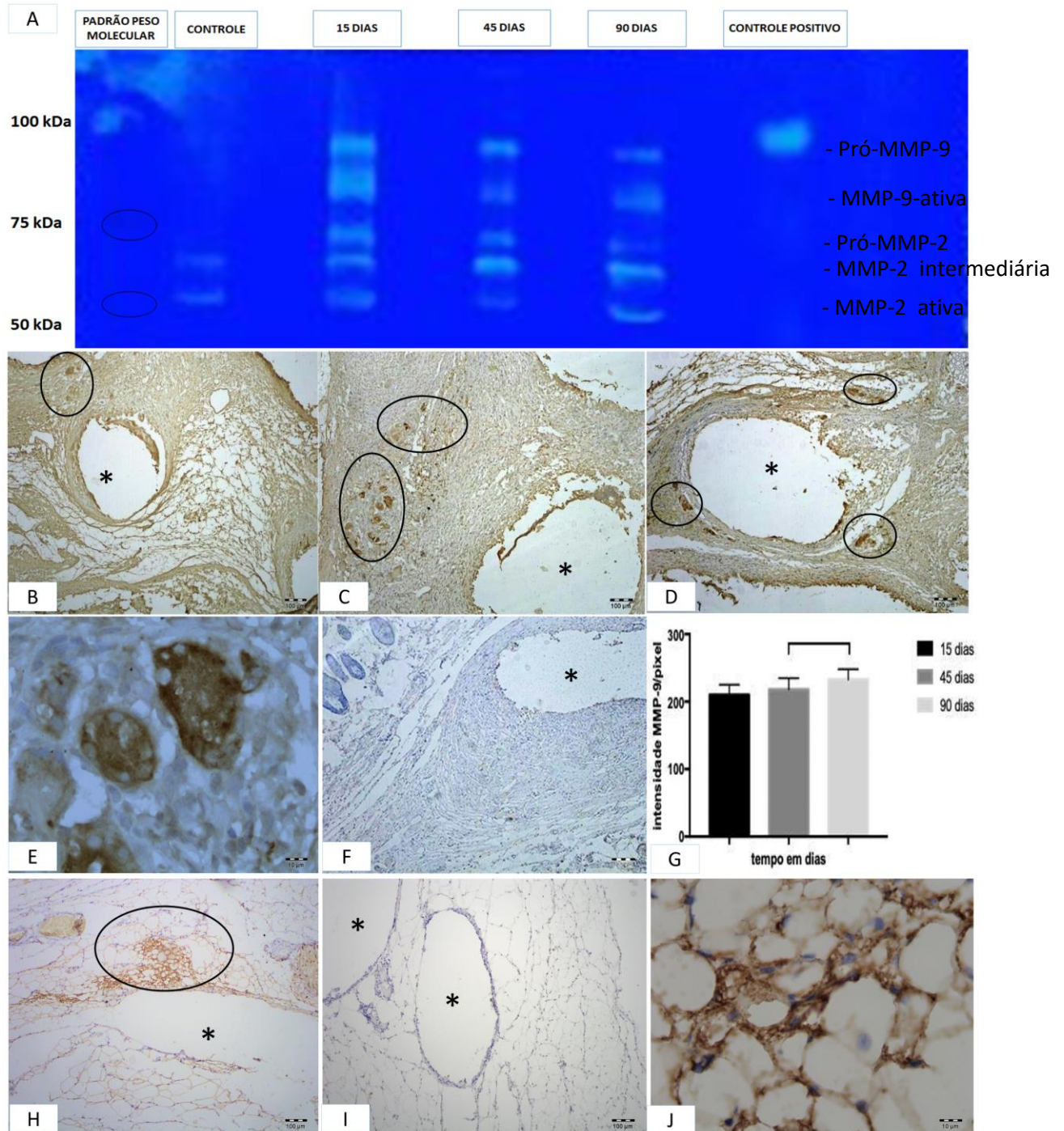
A confirmação de que essas bandas correspondiam a MMPs foi realizada pela inibição com fenantrolina na qual apenas a amostra controle positivo de intestino não foi inibida. Como informado no material e métodos essa amostra não contém apenas MMP-9 o que significa que a banda visível após a inibição não corresponde a MMP-9 mas a alguma outra protease.

A imunohistoquímica (IHQ) mostrou a expressão da MMP-9 em todos os períodos (15, 45 e 90 dias) como indicado respectivamente na figura 9 (B,C,D) sendo mais evidente nas células gigantes imunolocalizadas próximas as cápsulas envolvendo a esponja vegetal, mostrada em detalhe na figura 9 E. Na figura 9 F é mostrado o corte controle da reação IHQ onde se omitiu o anticorpo primário. Em função do processamento IHQ os fragmentos implantados se descolaram do tecido ficando o espaço ocupado pelos mesmos que são indicados com * na figura 9.

A análise quantitativa da IHQ para MMP-9 na figura 9 G, medida em pixel, mostrou que houve uma redução significativa ($P < 0,05$) da expressão de MMP-9 no tempo de 90 dias quando comparado com o tempo de 15 e 45 dias, onde valores próximos a zero indicam maior intensidade e valores de aproximados de 255 indicam menor intensidade.

Os resultados da IHQ para MMP-2 mostraram, surpreendentemente, uma marcação específica no tecido adiposo formado ao redor da cápsula fibrosa no tempo de 90 dias, conforme figura 9 H e observada em detalhe na figura 9 J, sendo o controle negativo da reação mostrado em figura 9 I.

Figura 9 - Zimografia e imunomarcção de MMP-2 e MMP-9 no tecido com *Luffa* implantada



(A) Amostras representativas de zimografia: Bandas equivalentes à pró-MMP-9 (92kDa), MMP-9 ativa (86 kDa), pró-MMP-2 (72 kDa), MMP-2 intermediária (66 kDa) e MMP-2 ativa (62 kDa) mostradas em: controle experimental, 15, 45 e 90 dias, e controle positivo. Imunomarcção das células gigantes (círculo) para Mmp-9 no tecido ao redor da bucha vegetal 15 dias (B), 45 dias (C) e 90 dias (D) e o controle negativo (F), todos em 400x. (E) Células gigantes imunomarcadas com MMP-9 em 1000x. (G) Intensidade da MMP-9 em pixel. Imunomarcção de MMP-2 em células adiposas em (H) e seu controle negativo (I) 400x. (J) Detalhe das células adiposas imunomarcadas 1000x.

6 DISCUSSÃO

Segundo Dolcimascolo (2019) o principal requisito de um biomaterial em andaime para a engenharia de tecidos é sua biocompatibilidade ou capacidade de promover a adesão, proliferação e migração celular para a superfície do andaime *in vitro* e *in vivo*. Além disso, após o implante, ele deve se integrar ao tecido do hospedeiro sem eliciar resposta imune, a fim de evitar uma reação inflamatória que possa diminuir a regeneração ou induzir a rejeição.

A esponja vegetal é interessante como biomaterial em *scaffolds* para o processo de regeneração de tecidos lesionados ou comprometidos pelo fato de ser uma planta extraída da natureza, e possuir características químicas e físicas importantes como presença de quitina, porosidade, rugosidade, filamentos entrelaçados, resistência à esterilização e presença de microcanais vazios. Essas características observadas nas análises morfológicas desta pesquisa indicam a possibilidade de uma maior especificidade e compatibilidade com o tecido hospedeiro (JIANG *et al.*, 2014). Segundo Dolcimascolo (2019) os biomateriais com composição química comparável ao tecido do hospedeiro podem promover o reconhecimento celular evocando uma resposta celular específica para apoiar o crescimento do tecido.

Até o momento desta pesquisa, os testes de compatibilidade com andaimes de esponja vegetal foram realizados em condições *in vitro* (CHEN *et al.*, 2003; CHEN; LIU, 2005; CECEN *et al.*, 2016). No entanto, neste trabalho foi feita análise *in vivo* da inclusão da esponja vegetal no tecido subcutâneo dos ratos para verificar a resposta tecidual. O tecido subcutâneo é uma camada de tecido conjuntivo frouxo localizada abaixo da derme, que une-a de maneira pouco firme aos órgãos adjacentes, e é constituído por vasos sanguíneos e linfáticos, fibras colágenas e células adiposas. Sendo o tecido mais utilizado para teste de biocompatibilidade *in vivo* (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; ARAÚJO *et al.*, 2011).

As análises em MEV permitiram mostrar a estrutura dos fragmentos da *Luffa aegyptiaca mill* implantados no tecido dos animais, mais especificamente os filamentos que compõem a bucha vegetal, evidenciando que o filamento é constituído por várias bifurcações formando uma estrutura entrelaçada e com várias reentrâncias. Além do mais, os filamentos possuem uma superfície externa com

aspecto rugoso e constituídos por vários microcanais vazios envoltos de um espaço central (ZAMPERI *et al.*, 2006).

As características morfológicas dos fragmentos da esponja vegetal podem ser consideradas importantes para a cinética das células no tecido dos ratos. Nas análises em MEV foi verificado a presença de tecido no suporte estrutural oferecido pela esponja vegetal, indicando migração de células e fibras colágenas provavelmente da conjuntiva para os espaços vazios dos microcanais e espaço central do filamento. Essas observações foram mais visíveis nos períodos de 45 e 90 dias, no tempo inicial de 15 dias os microcanais e o espaço central encontravam-se vazios ou com pouco crescimento de células.

As análises histológicas em microscopia de luz também permitiram verificar que os microcanais e o espaço central da *Luffa aegyptiaca mill* estavam preenchidos com células de várias formas e tamanhos, as quais não foi possível identificar. Em algumas amostras foi possível verificar a presença de células menores e esféricas na estrutura da esponja vegetal, o que presumiu-se ser colônias de bactérias do tipo cocos. Essas células eram ausentes no tempo de 15 dias, sendo evidentes nos tempos de 45 e 90 dias, correspondente ao período em que ocorreu simultaneamente à presença de outras células da conjuntiva. Os pressupostos da presença dessas bactérias são de que elas sejam oriundas do corpo do próprio hospedeiro, ou então, adquiridas do ambiente pelos animais ao longo dos tempos experimentais. A presença destas bactérias não foi associado a um resultado negativo porque não foi possível verificar um processo de infecção e comprometimento do tecido dos ratos.

Os fatos observados em microscopia de varredura e de luz indicam que realmente houve uma migração de diferentes tipos de células no interior dos microcanais e espaço central, os quais eram antes ocupados por células vegetais. Esses resultados podem apoiar os testes de compatibilidade *in vitro*, os quais mostraram que os filamentos da bucha vegetal forneciam locais para fixação e crescimento celular, validando que a bucha vegetal apresenta um potencial biotecnológico na reparação de tecidos humanos (CHEN *et al.*, 2003; CHEN; LIU, 2005; CECEN *et al.*, 2016).

Após o procedimento cirúrgico de implantação dos fragmentos da bucha vegetal foi verificado que houve um aumento significativo do peso corporal dos ratos

desde o dia do operatório considerado como tempo zero até o último período pós-operatório. Esses dados indicam que não houve comprometimento do peso e desenvolvimento dos *animais* em decorrência do implante no tecido. Além disso, baseado na observação clínica das condições de saúde dos animais não houve sinais visíveis de infecção e necrose no tecido, e nenhum óbito animal durante o período do experimento, essas condições são importantes para uma boa compatibilidade do biomaterial (JAMES, 2001).

Com relação a resposta do tecido à esponja vegetal foi observado uma reação inflamatória caracterizada principalmente pela presença de mastócitos, eosinófilos, macrófagos, células gigantes multinucleadas e outras células do sistema imune, juntamente com vasos sanguíneos e uma cápsula fibrosa desde o primeiro período de avaliação (ESCOBAR; JARAMILLO, 2009; FRANÇA *et al.*, 2011).

Nas observações histológicas foi constatado a formação de uma cápsula fibrosa ao redor dos fragmentos da *Luffa aegyptiaca mill* em todos os tempos experimentais. Essa cápsula era formada por vários fibroblastos e fibras colágenas de forma circunscrita ao biomaterial, de modo a formar um invólucro englobando o processo inflamatório juntamente com o material implantado e isolando-o do tecido circundante (RABBERS, 2019).

Devido à formação da cápsula fibrosa em torno dos fragmentos da bucha vegetal foi analisado a resposta tecidual pela quantidade de eosinófilos e mastócitos presentes dentro da cápsula, como uma forma de avaliar o processo inflamatório ocorrendo intimamente com o material, e também o processo acontecendo fora da cápsula, mais especificamente no tecido conjuntivo adjacente.

Quanto à análise comparativa de eosinófilos dentro e fora da cápsula nos tempos experimentais, as observações visuais permitiram mostrar uma maior presença dessas células na região fora da cápsula. Esses dados são confirmados pela análise quantitativa, a qual mostrou que o número de eosinófilos é menor na cápsula que envolve os fragmentos em todos os tempos avaliados, sendo significativamente menor nos tempos de 15 e 90 dias ($P < 0,05$), porém sem diferenças significativas no tempo de 45 dias. Escobar (2009) também relatou a presença de infiltrado eosinofílico em todos os períodos de análises em diferentes graus usando pasta óssea de hidroxiapatita compatível.

A presença dos eosinófilos em maior quantidade fora da cápsula é indicativo de que o processo inflamatório acontece mais intensamente no tecido circundante ao biomaterial. Entre as hipóteses da presença de eosinófilos fora da cápsula pode-se citar a atuação deles no tecido conjuntivo fagocitando partículas estranhas e ou secretando citocinas e fatores de crescimento que contribuem para a remodelação tecidual (PARHAM, 2001; BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; CHAUFFAILLE, 2010; CRUVINEL, 2010). Os eosinófilos juntamente com os mastócitos também podem estar relacionados à reação alérgica e de hipersensibilidade, em virtude de que houve uma presença de prurido nos animais nos períodos iniciais, o qual foi diminuindo nos dias subsequentes (CHAUFFAILLE, 2010).

A análise dos eosinófilos ao longo dos tempos experimentais somente fora da cápsula mostrou que quando comparado com os 15 dias iniciais houve uma redução significativa aos 45 dias, e sem diferenças estatísticas aos 90 dias. Esses dados podem mostrar que fora da cápsula não houve uma resposta imune de eosinófilos aumentada devido à presença da *Luffa aegyptiaca mill.*

A comparação do número de eosinófilos somente dentro da cápsula mostrou que não houve diferença estatística ao longo dos tempos avaliados. A cápsula é o local específico do processo inflamatório e está ligada intimamente ao biomaterial e, conforme as análises não houve uma alteração do processo inflamatório com eosinófilos dentro da cápsula, o que mostra ser um implante biocompatível sem reação inflamatória intensa.

Os mastócitos estão geralmente envolvidos com reações alérgicas, mas eles também liberam substâncias com atividades biológicas responsáveis pela modulação das respostas inflamatórias e imunológicas, assim como em processos de angiogênese e remodelamento tecidual (SISMANOPOULOS *et al.*, 2013; BUECHLER; KRAUTBAUER; EISINGER, 2015).

Para Noli (2001) e Rezzani *et al.* (2004) os mastócitos desempenham papel fundamental no controle da inflamação local e regeneração de tecidos pela degranulação e liberação de seus produtos, como a histamina. Os mastócitos que armazenam e liberam grandes quantidades de histamina, costumam ser encontrados próximos às superfícies dos implantes, essa liberação de histamina é conhecida por favorecer a permeabilidade dos vasos sanguíneos e promover a transmigração de fagócitos, principalmente macrófagos para o local.

Neste trabalho a análise visual mostrou a presença dos mastócitos em todos os períodos experimentais. Porém, ao contrário dos eosinófilos não foi observado mastócitos dentro da cápsula fibrosa, indicando que a atuação dos mastócitos seria somente fora da cápsula.

Um dos pressupostos da atuação dos mastócitos somente fora da cápsula é que a sua degranulação próxima aos implantes e vasos sanguíneos seria responsável pelo recrutamento de outras células inflamatórias, principalmente fagócitos para o local. Por meio das análises histológicas foi verificado que os mastócitos estiveram presentes desde o primeiro período de avaliação e concomitantemente houve o recrutamento de macrófagos (OLIVEIRA; SADIGURSK, 2008; BUECHLER; KRAUTBAUER; EISINGER, 2015).

Segundo a análise estatística, embora sendo encontrado um número maior de mastócitos aos 45 dias e, posteriormente menor no tempo de 90 dias, não houve uma diferença estatística entre os tempos avaliados. Esses dados indicam que a presença da esponja vegetal não gerou uma resposta inflamatória exacerbada ao longo dos períodos de análises, apontando que a resposta imune manteve-se estável ao implante.

Com relação a formação da cápsula fibrosa e a deposição de colágeno no tecido implantado ao longo dos períodos, as análises visuais permitiram verificar a diminuição da espessura da cápsula fibrosa e fibras colágenas no tempo de 90 dias. Sendo confirmada pela análise quantitativa, a qual mostrou uma deposição de colágeno significativamente menor aos 90 dias quando comparados com os períodos anteriores de 15 e 45 dias.

No período de 45 dias foi observado uma cápsula mais espessa de fibroblastos ao redor dos fragmentos e também densa deposição de colágeno no tecido conjuntivo circundante. A análise quantitativa também mostrou deposição de colágeno significativamente maior nesse período quando comparado com 90 dias. Os dados podem corroborar com os achados de maior agregação de fibroblastos e, conseqüentemente, maior produção de colágeno (RABBERS, 2019).

As análises visuais mostraram aos 15 dias uma cápsula de espessura frouxa composta principalmente por fibroblastos e poucas fibras colágenas, porém as análises estatísticas demonstraram uma deposição de colágeno no tecido conjuntivo

significativamente maior quando comparado com 90 dias, e sem diferenças estatísticas com o período de 45 dias.

Esses indicativos mostram que não houve uma deposição exacerbada de colágeno, e podem ser interpretados como uma tendência a organização tecidual ao redor do biomaterial, característica essa desejável, indicando biocompatibilidade com reorganização tecidual e redução da cápsula fibrosa ao longo do tempo, mesmas condições observadas com um compósito de fibroína de seda (GONÇALVES, 2016).

Segundo Anderson (2019) os macrófagos e as células gigantes multinucleadas são células comumente encontradas no tecido na tentativa de fagocitose e degradação do implante. Por isso, materiais implantáveis que não são biodegradáveis podem permanecer com essas células em quantidades estáveis por longos períodos ou toda vida útil do implante sem causar danos ao tecido. Dependendo de sua aplicação clínica, em algumas situações é desejável que os biomateriais sejam reabsorvidos no tecido, e em outras que eles sejam permanentes.

Neste trabalho quando retirado as amostras para as análises verificou-se que até o último período experimental o material não foi reabsorvido no tecido, permanecendo com sua estrutura intacta. Porém, não é possível afirmar se o implante é permanente ou não, necessitando-se para isso um maior período de avaliação.

A análise histológica descritiva demonstrou a presença de macrófagos e células gigantes multinucleadas em todos os períodos de análises. Ambas as células foram observadas no tecido ao redor da cápsula, porém, as células gigantes foram observadas como agrupamento de células formando ilhas. No tempo inicial as células gigantes eram poucas ou ausentes, aos 45 dias já eram mais evidentes, e aos 90 dias essas células permaneceram estáveis no tecido, não sendo verificado um aumento. Esses dados podem indicar que a esponja vegetal não degradada pelo tecido fez com que as células fagocíticas permanecessem estáveis em torno da bucha vegetal sem a persistência de processo inflamatório crônico.

Esses achados corroboram com o estudo de Wang *et al.* (2006) que observaram a persistência de células fagocíticas em quantidade estável após implante de esponja a base de colágeno e quitosana em ratos. Os mesmos

pesquisadores descreveram, ainda, a formação de cápsula fibrosa e intensa neovascularização, porém não correlacionaram essas características com processo inflamatório crônico.

Por outro lado, neste trabalho foi investigado durante o pós-operatório como era o perfil da atividade e expressão da gelatinase A (MMP-2) e gelatinase B (MMP-9) na regeneração tecidual. Sabe-se que a MMP-2 e a MMP-9 estão envolvidas no processo de remodelação e sinalização na matriz extracelular como a proliferação celular em um reparo normal do tecido. Trata-se de enzimas com função específica de degradar proteínas, principalmente o colágeno e elementos estranhos da MEC danificada de tal forma que novos tecidos possam se formar e a regeneração progrida de forma ordenada (STAMENKOVIC, 2003; PHILLIPS *et al.*, 2017; NAWAZ *et al.*, 2018).

Com relação à expressão da MMP-9, esta foi detectada no zimograma em todos os tempos experimentais avaliados nas suas isoformas pró-MMP-9 (92kDa) e MMP-ativa (86 kDa). Com base nas análises de IHQ foi possível observar a imunomarcação da MMP-9 nas células gigantes multinucleadas em todos os tempos avaliados. Houve uma maior imunomarcação dessas células no tempo de 45 e 90 dias quando comparado com 15 dias, período esse que foi observado uma menor quantidade ou até ausência dessas células no tecido. É importante ressaltar que houve a expressão da MMP-9 em outras regiões da MEC do tecido, o que indica que o tecido implantado é um local de intensa produção e atuação das metaloproteinases, e que essas proteases atuam na remodelação do tecido.

A análise estatística da expressão da MMP-9 no tecido implantado mostrou uma redução significativa da sua expressão no tempo de 90 dias quando comparado com os tempos anteriores. Esses dados podem ser condizentes com as análises visuais, em que pôde ser observado que entre o período de 45 dias até 90 dias não houve um aumento das células gigantes, as quais permaneceram estáveis no tecido, e conseqüentemente houve uma redução da expressão da MMP-9 no tecido.

Para a biocompatibilidade esses indícios podem sugerir a atuação da MMP-9 no remodelamento do tecido, com a reorganização das fibras colágenas na MEC e, o comportamento das metaloproteinases seria um pico enzimático durante a regeneração, e então um declínio da expressão quando alcançado a homeostasia do tecido (ARAÚJO, 2011).

Quanto à expressão da MMP-2, esta também foi detectada no zimograma em todos os tempos experimentais nas suas três isoformas: pró-MMP-2 (72 kDa), MMP-2 intermediária (66 kDa) e MMP-2 ativa (62 kDa). No controle negativo que corresponde ao tecido sem o implante de bucha vegetal observou-se MMP-2 somente nas suas isoformas MMP-2 intermediária (66 kDa) e MMP-2 ativa (62 kDa). Esses dados indicam que houve a expressão e atuação da MMP-2 no tecido implantado com a *Luffa aegyptiaca mill* ao longo dos períodos experimentais, em razão de que foi observado a isoforma pró-MMP-2 (72 kDa), a qual não é observada em controle.

A imunohistoquímica mostrou a imunolocalização dessa metaloproteínase em células adiposas, evidenciando uma maior expressão no período de 90 dias, correspondente ao tempo que foi observado uma maior presença de tecido adiposo substituindo o tecido conjuntivo próximo à esponja vegetal. Entretanto, apesar do conhecimento existente sobre MMP-2 e sua presença em vários órgãos, há poucos estudos dessas enzimas sendo expressas por células adiposas.

Segundo Lin e Kang (2016) as MMPs desempenham um papel importante sobre o remodelamento do tecido adiposo. Essa informação pode ser confirmada pelas análises deste trabalho, as quais mostraram a expressão de MMPs no tecido conjuntivo e também no tecido adiposo, o que confirma que essas enzimas têm uma função importante na remodelação tecidual.

Segundo Jansen *et al.* (2007) a MMP-2 desempenha um papel crucial na cicatrização de lesões e na resposta inflamatória, além de ser a chave reguladora destes processos e de comandar a remodelação dos tecidos. Desta forma, estes dados poderiam sugerir o início da fase de remodelamento, desde os primeiros períodos de análises e sendo mais potencializada aos 90 dias devido à maior expressão da MMP-2 no tecido adiposo.

Provavelmente, a MMP-2 se expressou no nosso estudo com o objetivo de dar prosseguimento ao remodelamento do tecido, com a reorganização das fibras colágenas e assim, reduziu sua expressão a partir do momento em que o tecido conseguiu alcançar sua homeostase.

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos e dentro dos limites desta pesquisa, a avaliação da resposta tecidual ao implante subcutâneo de fragmentos de *Luffa aegyptiaca mill* em ratos, conclui-se que:

- A resposta tecidual está dentro de um nível aceitável, sem reação granulomatosa de corpo estranho intensa e sem processo de fibrose.
- Há evidências de que a MMP-2 e MMP-9 possuem papel relevante na resposta tecidual induzida pelo implante da *Luffa aegyptiaca mill*.
- A *Luffa aegyptiaca mill* apresentou um potencial de biocompatibilidade com o tecido animal avaliado.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, J. M. **Principles of Regenerative Medicine**. London: Elsevier, 3^a ed., 2019.
- ARAÚJO, R. V. S. Metaloproteinases: aspectos fisiopatológicos sistêmicos e sua importância na cicatrização. **Revista de ciências médicas e biológicas**, v. 10, n. 1, 2011.
- ARAÚJO, F. J.; COSTA, B.; SÉRGIO, J.; RIBERIRO, M.; COSTA, P.; LESSANDRO, A.; RABELO, R.; JOSÉ, C.; RABELO, R. J. G.; TOURINO, M. Análise histológica da biocompatibilidade de adesivos dentários. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 9, n. 2, p. 247-254, 2011.
- BÄCKDAHL, H.; HELENIUS, G.; BODIN, A.; NANNMARK, U. Propriedades mecânicas da celulose bacteriana e interações com células do músculo. **Biomateriais**, v. 27, p. 2141-2149, 2006.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.
- BRITO, M. K. M. Inclusões de quitosana no subcutâneo de rato: avaliação clínica, histológica e morfométrica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 1, p. 35-40, 2009.
- BISOGNIN, D. A. Origem e evolução de cucurbitáceas cultivadas. **Ciência Rural**, v. 32, n. 4, p. 715-723, 2002.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Espécies introduzidas**. Brasília, 2015. Disponível em < <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/lista-de-especies-vegetais-introduzidas-no-brasil-e-atualizada-1>>. Acesso em 28 de outubro de 2020.
- BRASIL. Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015. Dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade. **Diário oficial da União**: Brasília, DF, 2015.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 3, de 20 de março de 2019. Lista de espécies vegetais introduzidas. **Diário oficial da União**, Seção 1, Brasília, DF, ed. 56, p. 4, 22 mar. 2019.
- BUECHLER, C.; KRAUTBAUER, S.; EISINGER, K. Adipose tissue fibrosis. **World Journal of Diabetes**, v. 6, n. 4, p. 548-553, 2015.
- CAVALCANTI, J. B. Estudo de biocompatibilidade in vivo e in vitro do extrato hidroalcoólico de *Cissus sicyoides* L. - Vitaceae em ratos. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v. 15, n. 4, p. 467-473, 2013.
- CECEN, B.; KOZACI, L. D.; YUKSEL, M.; USTUN, O.; ERGUR, B.U.; HAVITCIOGLU H. Biocompatibility and biomechanical characteristics of *loofah* based scaffolds combined with hydroxyapatite, cellulose, poly-L-lactic acid with chondrocyte-like cells. **Materials Science and Engineering**, v. 69, p. 437-446, 2016.

CHAUFFAILLE, M. L. L. F. Eosinofilia reacional, leucemia eosinofílica crônica e síndrome hipereosinofílica idiopática. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 5, p. 395-401, 2010.

CHEN, F. M.; LIU, X. *Loofa Sponge* as a scaffold for culture of rat hepatocits. **Biotechnology Progress**. China, v. 21, p. 315-319, 2005.

CHEN, F. M.; LIU, X. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. **Progress in Polymer Science**. China, v. 53, p. 86-168, 2016.

CHEN, J. P.; YU, S. C.; HSU, B. S.; FU, S. H.; LIU, H. S. *Loofa sponge* as a scaffold for the culture of human hepatocyte cell line. **Biotechnology Progress**. China, v. 19, p. 522-527, 2003.

CHEN, Y. M.; XI, T.; ZHENG, Y.; GUO, T.; HOU, J.; WAN, Y. Citotoxicidade *in vitro* de estruturas de celulose bacteriana utilizadas para ossos manipulados por tecidos. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 24, p.137 – 145, 2009.

CROISIER, F.; JEROME, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. **European Polymer Journal**, v. 49, n. 4, p. 780-792, 2013.

CRUVINEL, W. M. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista de Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-447, 2010.

DEE, K. C.; PULEO, D. A.; BIZIOS, R. **An Introduction to Tissue-Biomaterial Interactions**. New York, USA: John Wiley & Sons, 2002.

DOLCIMASCOLO, A.; CALABRESE, G.; CONOCI, S.; & PARENTI, R. **Innovative Biomaterials for Tissue Engineering. Biomaterial-Supported Tissue Reconstruction or Regeneration**. 2019. doi: 10.5772/intechopen.83839.

DOS REIS, C.A.; DE MIRANDA SOARES, M. A.; GOMES, J. R. Expression of the matrix metalloproteinases 2 and 9 in the rat small intestine during intrauterine and postnatal life. **Anatomical Record**, 2019.

ESCOBAR, D. M.; JARAMILLO, C. Preparación y evaluación de una pasta ósea para aplicaciones médicas. **Revista facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia**, v. 49, p.151-159, 2009.

FONSECA, K. B.; PEREIRA, H. H.; SILVA, S. N. Avaliação de falhas e implantes metálicos coxo-femoral e joelho retirados de pacientes. **Revista Material**, v. 10, n. 3, p. 472-480, 2005.

FRANÇA, D. C. C.; CASTRO, A. L.; SOUBHIA, A. M. P.; ROSA, E.; AGUIAR, S. M. H. C. Á. Evaluation of the biocompatibility of silicone gel implants on rat subcutaneous tissue – histomorphometric study. **Acta Informática médica**, v. 21, n. 2, p. 93–97, 2013.

GARG, P.; VIJAY-KUMAR, M.; WANG, L. Matrix metalloproteinase-9-mediated tissue injury overrides the protective effect of matrix metalloproteinase-2 during colitis. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal Liver Physiology**, v. 296, p. 75–184, 2009.

GONÇALVES, G. P. Characterization of hydroxyapatite and silk fibroin composite and assessment of its biocompatibility. **Locus UFV**, 2016.

GONG, S.; WANG, H.; SUN, Q.; XUE, S.; WANG, J. Mechanical properties and *in vitro* biocompatibility of porous zein scaffolds, **Biomaterials**, v. 27, n. 20, p. 3793-3799, 2006.

GRADY, K. M.; AGRAWAL, A.; BHATTACHARYYA, T. K.; SHAH, A.; TORIUMI, D. M. An Evaluation of Fibrin Tissue Adhesive Concentration and Application Thickness on Skin Graft Survival. **Laryngoscope**, v. 110, n. 11, p. 1931-1935, 2000.

GRANDE, C. J.; TORRES, F. G.; GOMEZ, C. M.; BAÑÓ, M. C. Nanocompósitos de celulose bacteriana / hidroxiapatita para aplicações biomédicas. **Acta Biomater**, v. 5, p. 1605-1615, 2009.

HEISER, C. B.; SCHILLING, E. E. O gênero *Luffa*: um problema na fitogeografia. **Biologia e utilização das Cucurbitaceae**. p. 120-133, 1990.

HELENIUS, G.; BÄCKDAHL, H.; BODIN, A.; NANNMARK, U.; GATENHOLM, P.; RISBERG, B. Biocompatibilidade *in vivo* de celulose bacteriana. **Journal of Biomedicine Materials Research**, v. 76, p. 431-438, 2006.

HELMUS, M. N.; GIBBONS, D. F.; & CEBON, D. Biocompatibility: Meeting a Key Functional Requirement of Next-Generation Medical Devices. **Toxicologic Pathology**, v.36, n. 1, p.70–80, 2008.

HENG, M. C. Y. Wound healing in adult skin: aiming for perfect regeneration. **International Journal of Dermatology**, v. 50, p. 1058-1066, 2011.

HOU, Y.; WANG, X.; YANG, J.; ZHU, R.; ZHANG, Z.; LI, Y. Development and biocompatibility evaluation of biodegradable bacterial cellulose as a novel peripheral nerve scaffold. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 106, n. 5, p. 1288-1298, 2018.

HORTENSIUS, R. A.; HARLEY, B. A. C. Naturally derived biomaterials for addressing inflammation in tissue regeneration. **Experimental Biology and Medicine**, v. 241, n. 10, p. 1015-1024, 2016.

HUANG, S.; FU, X. Naturally derived materials-based cell and drug delivery systems in skin regeneration. **Journal of Controlled Release**, v. 142, n. 2, p. 149-159, 2010.

HUTMACHER, D. W. Andaime design e tecnologias de fabricação de tecidos de engenharia: estado da arte e perspectivas futuras. **Journal of Biomaterials Science and Polymer**, p.107–124, 2001.

JAMES, M.A. Biological responses to materials. **Revisão Anual de Pesquisa de Materiais**. v.31, n.1 , p.81-110, 2001.

JANSEN, P. L.; KEVER, M.; ROSCH, R.; KROTT, E.; JANSEN, M.; ALFONSO, A.; DOOLEY, S.; KLINGE, U.; DLOVETT, D.H.; MERTENS, P.R. Polymeric meshes induce zonal regulation of matrix metalloproteinase-2 gene expression by macrophages and fibroblasts. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 1, p. 1047-1057, 2007.

JIANG, P. L.; CHIEN, M. Y.; SHEU, M. T.; HUANG, Y. Y.; CHEN, M. H.; SUC, H.; LIU, D. Z. Dried Fruit of the *Luffa* Sponge as a Source of Chitin for Applications as Skin Substitutes. **BioMed Research International**. Taiwan, v. 2014, p. 1-9, 2014.

JUNIOR, E. M. L.; PICOLLO, N. S.; MIRANDA, M. B.; RIBEIRO, W. L. C.; ALVES, A. P. N. N.; FERREIRA, G. E.; PARENTE, E. A.; MORAES-FILHO, M. O. The use of tilapia skin (*Oreochromis niloticus*), as an occlusive biological dressing, in the treatment of burn wounds. **Revista Brasileira de queimaduras**, v. 16, n. 1, p. 10-7, 2017.

JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2013.

KHANNA, S. Macrophage Dysfunction impairs resolution of inflammation in the wounds of diabetic mice. **PLos one**, v. 5, n. 3, p. 1-12, 2010.

KIM, J. H.; KIM, S. E.; KIM, Y. J. Comparação de Retenção de Volume e Biocompatibilidade de Matriz Dérmica Acelular / Enchimento de Ácido Hialurônico a Enxertos de Gordura Autóloga em um Modelo de Mouse. **Aesthetic Plastic Surgery**. 2020.

KLOPFLEISCH, R. Macrophage reaction against biomaterials in the mouse model - Phenotypes, functions and markers. **Acta Biomaterialia**, v. 43, p. 3-13, 2016.

KLOPFLEISCH, R.; JUNG, F. The pathology of the foreign body reaction against biomaterials. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 105, n. 3, p. 927-940, 2017.

LIN; C. T. H.; KANG, L. Adipose extracellular matrix remodelling in obesity and insulin resistance. **Biochemical Pharmacology**, 2016.

LOPES, D. K. Plant Extracts in the Bone Repair Process: A Systematic Review. **Mediators of inflammation**. 2011.

LUO, F.; TRAN, A. P.; XIN, L.; SANAPALA, C., LANG, B. T., SILVER, J.; YANG, Y. Modulation of proteoglycan receptor PTP σ enhances MMP-2 activity to promote recovery from multiple sclerosis. **Nature**, v. 9, p. 4126, 2018.

MACLAUHLAN, S. Macrophage fusion, giant cell formation, and the foreign body response require matrix metalloproteinase 9. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 85, n. 4, p. 617-626, 2009.

MASTRANTONIO, S. D. S. RAMALHO, L. T. O. Resposta do Tecido conjuntivo de camundongos ao poliuretano vegetal de óleo de mamona. **Revista de Odontology da UNESP**, v. 32, n. 1, p. 31-37, 2003.

MAURIS. J.; WOODWARD, A. M.; CAO, Z.; PANJWANI, N.; ARGUESO, P. Molecular basis for MMP-9 induction and disruption of epithelial cell-cell contacts by galectin-3. **Journal Cell Science**, v. 127, p. 3141–3148, 2014.

MEINEL, L.; HOFMANN, S.; KARAGEORGIOU, V.; KIRKER-HEAD, C.; MCCOOL, J.; GRONOWICZ, G.; ZICHER, L.; LANGER, R.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; KAPLAN, DAVID. L. The inflammatory responses to silk films in vitro and in vivo. **Biomaterials**, v. 26, n. 2, p. 147-155, 2005.

MENDES, P. N.; RAHAL, S. C.; PEREIRA-JUNIOR, O. P.; FABRIS, V. E.; LENHARO, S. L.; DE LIMA-NETO, J. F.; DA CRUZ LANDIM-ALVARENGA, F. Avaliação *in vivo* e *in vitro* de uma membrana de celulose microbiana sintetizada por *Acetobacter xylinum* destinada ao reparo guiado de tecidos. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 51, n. 12, 2009.

MITTAL, R.; PATEL, A. P.; DEBS, L. H.; NGUYEN, D.; PATEL, K.; GRATI, M'H.; MITTAL, J.; YAN, D.; CHAPAGAIN, P.; LIU, X. Z. Intricate Functions of Matrix Metalloproteinases in Physiological and Pathological Conditions. **Journal of Cellular Physiology**, v. 231, p. 2599–2621, 2016.

MOEIN, Z.; NADER, T.; SHAHROKH, Z. Quaternary derivatives derived from gallium pen with poly (3-hydroxybutyrate) electro-spun: manufacture, evaluation of biocompatibility in vitro and in vivo. **Revista de Aplicações de Biomateriais**, v. 34, p. 741-752, 2020.

MOUTINHO, I. Different Chitosan-Based Biomaterials and their Biomedical Applications. Different Chitosan-Based Biomaterials and their Biomedical Applications. **European Journal of Medical Research and Clinical Trials**, v. 1, p. 1-12, 2019.

NASCIMENTO, M. H. M.; LOMBELLO, C. B. Hidrogéis a base de ácido hialurônico e quitosana para engenharia de tecido cartilaginoso. **Polímeros**, v. 26, n. 4, p. 360-370, 2016.

NASSAR, E.; CIUFFI, K. J.; CALEFI, P. S.; ROCHA, A.; FARIA, E.; SILVA, M.; LUZ, P. P.; BANDEIRA, L. C.; CESTARI, A.; FERNANDES, C. Biomaterials and sol-gel process: a methodology for the preparation of funcional materials. **Biomaterials Science and Engineering**. 2011.

NAWAZ, M.; SHAH, N.; ZANETTI, B.R.; MAUGERI, M.; SILVESTRE, R.N.; FATIMA, F.; NEDER, L.; VALADI, H. Extracellular Vesicles and Matrix Remodeling Enzymes: The Emerging Roles in Extracellular Matrix Remodeling, Progression of Diseases and Tissue Repair. **Cells**, v. 13, 2018.

NOLI, C.; MIOLO, A. The mast cell in wound healing. **Veterinary Dermatology**. Oxford, v.12, n.6, p.303-313, 2001.

OLIVEIRA, C. S.; NASCIMENTO, M.; JUNIOR, E. A.; CRUSOÉ, M.; BAHIA, P. Avanços e aplicações da bioengenharia tecidual. **Revista da Ciências Médicas e biológicas**. Bahia, v. 9, p. 28-36, 2010.

OLIVEIRA, M.; SADIGURSKY, M. A biocompatibilidade dos materiais pode ser avaliada através dos mastócitos?. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. Salvador, v. 7, n. 1, p. 32-39, 2008.

OLIVEIRA, L. S. A. F.; OLIVEIRA, C. S.; MACHADO, A. P. L.; ROSA, F. P. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 9, 2010.

OVERALL, C. M.; TAM, E.; MCQUIBBAN, G. A.; MORRISON, C.; WALLON, U.M.; BIGG, H. F.; KING, A.E.; ROBERTS, C.R. Domain Interactions in the Gelatinase A TIMP-2 MT1MMP Activation Complex: The ectodomain of the 44-kDa form of membrane type-I Matrix Metalloproteinase does not modulate gelatinase A activation. **Journal of Biology Chemistry**, v. 275, p. 39497–39506, 2000.

PARHAM, P. **O sistema imune**. Porto Alegre: Artmed, 2001.

PARKS, W. C.; WILSON, C. L.; LOPEZ-BOADO, Y. S. Metaloproteinases de matriz como moduladores de inflamação e imunidade inata. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, p. 617–629, 2008.

PHILLIPS, T. M.; FADIA, M.; LEA-HENRY, T.N.; SMILES, J.; WALTERS, G.D.; JIANG, S.H. MMP2 and MMP9 associate with crescentic glomerulonephritis. **Clinical Kidney Journal**, v. 10, n. 2, p. 215-220, 2017.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, Â. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**. São Paulo, v. 38, n. 7, p. 957-971, 2015.

POPA, E. G.; CARVALHO, P. P.; DIAS, A. F.; SANTOS, T. C.; SANTO, V. E.; MARQUES, A. P; VIEGAS, C. A.; DIAS, I. R.; GOMES, M. E.; REIS, R. L. Evaluation of the in vitro and in vivo biocompatibility of carrageenan-based hydrogels. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 102, n. 11, p. 4087-4097, 2014.

RABBERS, A.S. Additive effect of pulp pequi oil (*Caryocar brasiliense Camb.*) on the biocompatibility of collagen and gelatin membranes in subcutaneous implants. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, n.3, p. 811-818, 2019.

REZENDE, M. C. R. A.; WADA, C. M.; CAPALBO, L. C.; GONÇALVES, V. M. Adesivo tecidual de fibrina e sua aplicação na implantodontia. **Archives of health investigation**, v. 3, n. 6, 2014.

REZZANI, R.; RODELLA, L.; TARTAGLIA, G.M.; PAGANELLI, C.; SAPELLI. Mastcells and the inflammatory response to different implanted biomaterials. **Archives of Histology and Cytology**, v. 67, n. 3, p. 211-217, 2004.

SANTOS, G. G.; MARINHO, S.; MIGUEL, F. B. Polímeros como biomateriais para o tecido cartilaginoso. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 12, n. 3, p. 367-373, 2013.

SINHORETI, M. A. C.; VITTI, R. P.; CORRER-SOBRINHO, L. Biomaterials in Dentistry: current view and future perspectives. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas**, v. 67, n. 4, 2013.

SISMANOPOULOS, N.; DELIVANIS, D. A.; MAVROMMATI, D.; HATZIAGELAKI, E.; CONTI, P.; THEOHARIDES, T. C. Do mast cells link obesity and asthma? **Allergy**, v. 68, n. 1, p. 8-15, 2013.

SOUZA, F. G.; FERNANDES, B. L.; AGUIAR, A. M.; FRACARO, L.; BROFMAN, P. R. Proliferação e diferenciação de células-tronco em contato com eluato de membrana de fibrina. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 53, n. 1.p. 45-52, 2018.

SOUZA, J. D. G. T. Modificação química superficial de fibras de bucha vegetal visando à compatibilização e aplicação como reforço em matriz cimentícia. **Ambiente Construído**, v. 17, n. 2, p. 269-283, 2017.

STAMENKOVIC, I. Extracellular matrix remodeling the role of matrix metalloproteinases. **Journal of Pathology**, v. 200, p. 448–464, 2003.

SVENSSON, A.; NICKLASSON, E.; HARRAH, T.; PANILAITIS, B.; KAPLAN, D. L.; BRITTBERG, M.; GATENHOLM, P. Celulose bacteriana como um andaime potencial para a engenharia de tecidos da cartilagem. **Biomateriais**, v. 26, p. 419-431, 2005.

TORRES, F. G.; COMMEAUX, S.; TRONCOSO, O. P. Biocompatibilidade de biomateriais à base de celulose bacteriana. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 3, n. 4, p. 864-878, 2012.

USTUNDAG, E.; BOYACI, Z.; KESKIN, G.; KAUR, A.; OZKARAKAS, H. Soft Tissue Response of the Larynx to Silicone, Gore-Tex, and Irradiated Cartilage Implants. **Laryngoscope**, v. 115, n. 6, p. 1009-1014, 2005.

VISHWAKARMA, A.; BHISE, N. S.; EVANGELISTA, M. B.; ROUWKEMA, J. Engineering Immunomodulatory Biomaterials to Tune the Inflammatory Response. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 6, p. 470-482, 2016.

XIANG, P. ; WANG, S.; HE, M.; HAN, Y. ; ZHOU, Z. ; CHEN, D. ; LI, M. ; MA, L. The *in vitro* and *in vivo* biocompatibility evaluation of electrospun recombinant spider silk protein/PCL/gelatin for small caliber vascular tissue engineering scaffolds. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.163, p. 19-28, 2018.

ZAMPERI, A.; MABANDE, G. T. P.; SELVAM, T.; SCHWIEGER, W.; RUDOLPH, A.; HERMANN, R.; SIEBER, H.; GREIL, P. "Biotemplating of *Luffa cylindrica* sponges to self-supporting hierarchical zeolite macrostructures for bio-inspired structured catalytic reactors". **Material Science and Engineering**, v. 26, n.1, p. 130-135, 2006.

ZITKA, O., KUKACKA, J., KRIZKOVA, S., HUSKA, D., ADAM, V., MASARIK, M., PRUSA, R., KIZEK, R. Matrix metalloproteinases. **Current Medicinal Chemical**, v. 17, p. 3751–3768, 2010.

YANG, L.; LI, X.; WANG, D. Improved mechanical properties by modifying fibrin scaffold with PCL and its biocompatibility evaluation. **Journal of Biomaterials Science and Polymers**, v. 31, n.5, p. 658-678, 2020.

YUKI, I.; UCHIYAMA, N.; MURAYAMA, Y.; NIEN, L.; LEE, D.; EBARA, M.; ISHII, A.; CHIANG, A.; VINTERS, H.; NISHIMURA, I.; WU, B.; VINUELA, F. Reações teciduais intravasculares induzidas por vários tipos de materiais poliméricos bioabsorvíveis: correlação entre os perfis de degradação e as correspondentes reações teciduais. **Interventional Neuroradiology**, v. 52, n. 11, p.1017, 2010.

WANG, J.; HAO, S.; LUO, T.; CHENG, Z.; LI, W.; GAO, F.; GUO, T.; GONG, Y. Feather keratin hydrogel for wound repair: Preparation, healing effect and biocompatibility evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 149, p. 341-350, 2017.

WANG, X. H.; YAN, Y. N.; ZHANG, R. J. A comparison of chitosan and collagen sponges as heostatic sressings. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 21, n. 1, p. 39-54, 2006.

WEIGERT, R. Implanted biomaterials: Dissecting fibrosis. **Nature Biomedical Engineering**, v.1, n. 1, p.1-1, 2017.

WILLIAMS, D. F. Sobre os mecanismos de biocompatibilidade. **Biomateriais**, v. 29, p. 2941-2953, 2008.

WU, Y.; DING, Z.; REN, H.; JI, M.; YAN, Y. Preparação, caracterização e avaliação biológica in vitro de um novo composto de pó de pérola / poli-aminoácido como um substituto potencial para reparo e reconstrução óssea. **Polímeros**, v. 11, p. 831, 2019.

WU, L.; ZHU, F.; TAO, G. *In-Vitro* Biocompatibility Evaluation of Collagen-Hyaluronic Acid/Bioactive Glass Nanocomposite Scaffold. **Journal of Macromolecular Science**, v..50, n. 11, p. 1121-1125, 2013.

ANEXO A – CONSIDERAÇÕES ÉTICAS



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Av. General Carlos Cavalcanti, 4748 - Bairro Uvaranas - CEP 84030-900 - Ponta Grossa - PR - <https://uepg.br>

CARTA

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAIS

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo/ Process CEUA – 0045183

Protocolo UEPG – 19000002362-2

Título – Avaliação da histocompatibilidade de implante subcutâneo de fragmentos de *Luffa aegyptiaca* em ratos. *Assessment of subcutaneous implant histocompatibility of *Luffa aegyptiaca* fragments in rats*

Interessado – Prof. José Rosa Gomes

e-mail: 1967jrgomes@gmail.com

Data de Entrada – 15/07/2019

Resultado: Aprovado

Ativar o Windows

Acesse Configurações para ativar o Windows.

Considerações

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa (CEUA-UEPG) certifica que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa acima especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCAs), estabelecida pelo Conselho Nacional para fins de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal. Dessa forma, fica autorizada a utilização de 20 ratos Wistar machos, de três meses de idade e 300 g para a execução desse projeto.

Ponta Grossa, 09 de agosto de 2019

Profa. Dra. Luciana da Silva Leal Karolewski
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG



Documento assinado eletronicamente por Luciana da Silva Leal Karolewski, Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais/PROPESP, em 09/08/2019, às 00:06, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <https://sei.uepg.br/autenticidade> informando o código verificador 0045183 e o código CRC 57473CE8.

Ativar o Windows

Acesse Configurações para ativar o Windows.