THAIS CLAUDINO LAGE

**Análise *in vitro* da citotoxicidade em osteoblastos de dispositivos poliméricos
incorporados com antimicrobianos para uso local**

São Paulo

2017

THAIS CLAUDINO LAGE

**Análise *in vitro* da citotoxicidade em osteoblastos de dispositivos poliméricos
incorporados com antimicrobianos para uso local**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas para obter o título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Clínica Integrada

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Adde

São Paulo

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Lage, Thais Claudino.
Análise in vitro da citotoxicidade em osteoblastos de dispositivos poliméricos incorporados com antimicrobianos para uso local / Thais Claudino Lage;
orientador: Carlos Alberto Adde -- São Paulo, 2017.

107 p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia.
Área de Concentração: Clínica Integrada. -- Faculdade de Odontologia da
Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Citotoxicidade. 2. Osteoblastos. 3. Antibacterianos. 4. Microscopia Eletrônica de Varredura. I. Adde, Carlos Alberto. II. Título.

Lage TC. Análise *in vitro* da citotoxicidade em osteoblastos de dispositivos poliméricos incorporados com antimicrobianos para uso local. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 08 / 08 /2017

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a).Flávia Gonçalves

Instituição: Universidade Ibirapuera

Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a).Victor Elias Arana-Chavez

Instituição: FOU SP

Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a).Marcelo M. Romano

Instituição: FOU SP

Julgamento: Aprovada

DEDICATÓRIA

Àos meus pais, Leila e Rubens, exemplos de integridade, determinação e grandes incentivadores. Agradeço por todo o apoio, dedicação e amor.

Às minhas irmãs, Caroline e Fabiana, pela ajuda, amizade, carinho e cumplicidade.

Ao Vitor Hugo Alves Úbeda, pelo amor, carinho e companheirismo em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Dr. Carlos Alberto Adde, que me acolheu desde o início da minha vida acadêmica, um exemplo de pessoa e profissional, obrigada por todas as oportunidades, amizade, carinho, confiança, dedicação e paciência.

Ao Professor Dr. Marcelo Munhóes Romano, agradeço pela oportunidade, paciência, compreensão e ajuda para a realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Victor Elias Arana-Chávez, o qual gentilmente cedeu seu laboratório para execução dessa pesquisa, sempre sanando as dúvidas, obrigada pelas valiosas sugestões.

À Professora Dra. Flávia Gonçalves, um exemplo de pessoa e profissional que me acolheu e sempre esteve disposta a ajudar durante toda essa jornada.

Ao Professor Dr. Luiz Henrique Catalani, que abriu as portas de seu laboratório para toda nossa equipe.

À Talita Girio Carnaval, uma pessoa incrível que sempre confiou em mim e me incentivou a continuar.

À Elisangela Chinen, sem a qual esse trabalho não teria sido finalizado. Um exemplo de pessoa e amiga. Muito obrigada por toda ajuda, carinho e amizade.

Ao Douglas Nesadal de Souza, obrigada por toda ajuda e paciência.

À Giovanna Piacenza Florezi, grande amiga da faculdade e de vida. Obrigada por todo o auxílio em todas as fases de minha vida.

Ao Emanuel da Silva Rovai, amigo de pós graduação que sempre se mostrou disposto a ajudar. Um grande exemplo de pesquisador e amigo.

À Isabela Goulart Gil Choi e Bruno Klouczeck Carrocini por sempre estarem dispostos a ajudar, pelo carinho e apoio.

À Cláudia Carrara Cotomacio e Lorraine Perciliano de Faria, colegas de pós graduação, agradeço por toda ajuda e conselhos.

Ao Carlos Eduardo Úbeda, por toda ajuda, atenção e carinho.

RESUMO

Lage TC. Análise *in vitro* da citotoxicidade em osteoblastos de dispositivos poliméricos incorporados com antimicrobianos para uso local [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2017. Versão Corrigida.

Os osteoblastos são células de origem mesenquimal envolvidas na formação óssea. Essas células podem sofrer alterações decorrentes de traumas, intervenções, e infecções. As infecções podem ser minimizadas a partir do uso de antimicrobianos. O poli(L-lactídeo) ou PLLA, é um polímero sintético que se destaca por sua biocompatibilidade e absorção, o qual pode ser utilizado como um liberador farmacológico local, como alternativa à terapêutica antimicrobiana sistêmica. Esse polímero também é empregado como matriz de suporte celular na engenharia de tecidos ósseos, por auxiliar na reparação e regeneração. A incorporação de partículas nesse polímero pode gerar reações adversas, portanto, devemos nos certificar que o dispositivo polimérico incorporado com antimicrobianos não seja citotóxico. **Proposição:** Analisar a estrutura e a citotoxicidade em osteoblastos de dispositivos poliméricos de PLLA incorporados com antimicrobianos, sendo eles: Amoxicilina ou Azitromicina ou Clindamicina ou Metronidazol para uso local. **Metodologia:** Foram confeccionados 270 dispositivos poliméricos com 6mm de diâmetro composto de PLLA com a incorporação de antimicrobianos a 20%, Amoxicilina (AM) ou Azitromicina (AZ) ou Clindamicina (CL) ou Metronidazol (ME) sendo confeccionados através de dois métodos: eletrofiação (malhas) ou deposição (filmes). Posteriormente, foi realizado o teste de citotoxicidade direta MTT nesses dispositivos com a cultura de osteoblastos em 24, 48 e 72h de experimento. Para análise da estrutura do dispositivo, foram feitas análises macroscópicas através de fotografias digitais e microscópicas com Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). **Resultados:** A reação de citotoxicidade mostrou que malhas e filmes incorporados à antimicrobianos são compatíveis com a cultura de osteoblastos, não apresentando citotoxicidade em nenhum momento do estudo ($p < 0.05$). Na fotografia pudemos observar que os dispositivos apresentam coloração semelhante em relação às

malhas e coloração diferenciada para filmes dependendo do tipo de antimicrobiano incorporado. No MEV, através da análise dos dispositivos pudemos notar que houve diferença no aspecto das superfícies dos filmes, sendo que os filmes de AM apresentaram aspecto irregular e poroso, enquanto AZ aparece liso com alguns grânulos, os de CL e ME possui superfícies ásperas e os de PLLA apresentaram superfície lisa. Quanto às malhas, notamos que todas as amostras apresentaram microfibras e poros que imitam a matriz extracelular, diferenciando-se apenas na espessura das fibras. Houve a presença de osteoblastos em todos os filmes confeccionados, mas os filmes de AM não induziram a proliferação, aparecendo apenas células isoladas. Enquanto nas malhas só foram observados osteoblastos em malhas de AM, ME e PLLA. **Conclusão:** Os dispositivos poliméricos confeccionados com PLLA incorporados com antimicrobianos podem ser usados na reparação e regeneração óssea uma vez que não apresentaram citotoxicidade em osteoblastos.

Palavras-chave: Citotoxicidade, Osteoblastos, PLLA, Antimicrobianos

ABSTRACT

Lage TC. In vitro analysis of cytotoxicity in osteoblasts of polymer devices incorporated with antimicrobials for local use [dissertation] São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2017. Versão Corrigida.

Osteoblasts are mesenchyma originated cells, which are involved in the bone formation. These cells may suffer alterations due to traumas, interventions and infections. The infections can be minimized by the handling of antimicrobials. Poly (L-lactide) or PLLA is a synthetic polymer known for its biocompatibility and absorption, which can be used as a local pharmacological releaser, as an alternative to the systemic antimicrobial therapy. This polymer also can be frequently used as a supporting structure to cellular matrix in the bone tissue engineering as it can be used for support in repair and regeneration. The particle incorporation in this polymer can create side effects, therefore, we need to certify that the polymeric device incorporated with antimicrobials are not cytotoxic. **Proposition:** Analyse the structure and cytotoxicity in osteoblasts of PLLA polymeric devices associated with antimicrobials, being them: Amoxicillin, Azithromycin, Clindamycin and Metronidazole. **Methods:** For this study 270 polymeric devices were manufactured with 6mm diameter of PLLA with a 20% antimicrobials incorporation of Amoxicillin (AM), Azithromycin (AZ), Clindamycin (CL) and Metronidazole (ME) that have been produced through two methods: electrospinning (mesh) or casting (film). Afterwards a MTT cytotoxicity test was made over the periods of 24, 48 and 72 hours of experiment. To make a structural analysis of the device a macroscopic analysis was performed through photographs and microscopic imaging with scanning electron microscope (SEM). **Results:** The cytotoxicity reaction exhibited that meshes and films incorporated with antimicrobials are comparable with the osteoblasts culture, indicating that there was no cytotoxicity in any moment ($p < 0.05$). In the photograph we could observe that the devices showed a similar coloration among the meshes and different coloration for the films depending on the incorporated antimicrobial. The SEM analysis displayed a difference in the surface appearance of the films. The AM films displayed an irregular and porous appearance, meanwhile, AZ looked smooth

with few grains, the CL and ME have rough surfaces and PLLA presents smooth surfaces. As for the meshes, we noticed that all the samples had microfibers and pores that mimic the extracellular matrix, differing only in the thickness of the fibers. Osteoblasts were present in all films but AM did not induce proliferation, with only isolated cells emerging. In meshes osteoblasts were only found in AM, ME and PLLA. **Conclusion:** Polymeric devices made with PLLA incorporated with antimicrobials can be used in bone repair and regeneration given that they did not offer cytotoxicity for osteoblasts.

Keywords: Cytotoxicity, Osteoblasts, PLLA, Antimicrobials.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 - Estrutura química do PLLA	34
Figura 2.2 - Simulação da formação de fibras por Eletrofiação	37
Figura 2.3 - Redução do MTT	40
Figura 2.4 - Molécula de Amoxicilina	50
Figura 2.5 - Molécula de Azitromicina	51
Figura 2.6 - Molécula de Clindamicina	52
Figura 2.7 - Molécula de Metronidazol	53
Quadro 4.1 - Nomeação dos dispositivos confeccionados	57
Gráfico 5.1 - Reação MTT em Filmes com 24h experimentais	66
Gráfico 5.2 - Reação MTT em Filmes com 48h experimentais	67
Gráfico 5.3 - Reação MTT em Filmes com 72h experimentais	68
Gráfico 5.4 - Reação MTT em Malhas com 24h experimentais	69
Gráfico 5.5 - Reação MTT em Malhas com 48h experimentais	70
Gráfico 5.6 - Reação MTT em Malhas com 72h experimentais	71
Gráfico 5.7 - Reação MTT em Filmes nos tempos de 24,48 e 72h	72
Gráfico 5.8 - Reação MTT em Malhas nos tempos de 24, 48 e 72h	72
Figura 5.1 - Fotografia de Filmes e Malhas	73
Figura 5.2 - Amoxicilina filme	75
Figura 5.3 - Amoxicilina malha	76
Figura 5.4 - Azitromicina filme	77
Figura 5.5 - Azitromicina malha	78
Figura 5.6 - Clindamicina filme	79
Figura 5.7 - Clindamicina malha	80

Figura 5.8 - Metronidazol filme.....	81
Figura 5.9 - Metronidazol malha	82
Figura 5.10 - PLLA filme	83
Figura 5.11 - PLLA malha	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Média e desvio padrão das amostras de Filme 24h.....	66
Tabela 5.2 - Média e desvio padrão das amostras de Filme 48h.....	67
Tabela 5.3 - Média e desvio padrão das amostras de Filme 72h.....	68
Tabela 5.4 - Média e desvio padrão das amostras de Malha 24h.....	69
Tabela 5.5 - Média e desvio padrão das amostras de Malha 48h.....	70
Tabela 5.6 - Média e desvio padrão das amostras de Malha 72h.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM	Amoxicilina
AZ	Azitromicina
CL	Clindamicina
cm	centímetros
DMSO	dimetilsulfóxido
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
h	Horas
HMDS	hexametildisilazano
Kv	quilovolts
ME	Metronidazol
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mg	miligramas
mm	milímetros
MTT	brometo 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio
PBS	tampão fosfato-salino
PDLA	poli-(D-lactídeo)
PLGA	poli-(L-glicólico)
PGA	poli-glicólico
PLA	poli-lactídeo
PLLA	poli-(L-lactídeo)
PO	polímero
SDH	succinato desidrogenase
T	temperatura

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
D	dextrógiro
L	levógiro
ZnO	óxido de zinco
μm	micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	JUSTIFICATIVA	24
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	TECIDO ÓSSEO	27
2.2	ENGENHARIA TECIDUAL E BIOMATERIAIS POLIMÉRICOS.....	30
2.3	CARACTERÍSTICAS DO POLI(L-LACTÍDEO) (PLLA).....	32
2.3.1	Eletrofiação (malhas)	35
2.3.2	Deposição (filmes).....	37
2.4	CITOTOXICIDADE EM OSTEÓBLASTOS.....	38
2.5	ANTIMICROBIANOS EM ODONTOLOGIA.....	40
2.5.1	Antimicrobianos para prevenção e controle de infecções	40
2.5.2	Antimicrobianos nas Especialidades Odontológicas	43
2.5.2.1	Periodontia	43
2.5.2.2	Implantodontia	45
2.5.2.3	Cirurgia	47
2.6	CARACTERÍSTICAS DOS ANTIMICROBIANOS ESTUDADOS	49
2.6.1	Amoxicilina	49
2.6.2	Azitromicina	50
2.6.3	Clindamicina	51
2.6.4	Metronidazol	52
2.7	ASSOCIAÇÃO POLÍMERO (PLLA) E ANTIMICROBIANOS.....	53
3	PROPOSIÇÃO	55
4	MATERIAL E MÉTODOS	57
4.1	MATERIAL	57
4.2	MÉTODOS	58
4.2.1	Confecção dos dispositivos poliméricos	58
4.2.2	Cultura de osteoblastos	59
4.2.3	Citotoxicidade direta em osteoblastos	60
4.2.4	Análise estatística	62
4.2.5	Análise estrutural	62
4.2.5.1	Fotografia	62

4.2.5.2	Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)	62
4.2.5.2.1	<i>Análise estrutural dos dispositivos e adesão celular</i>	62
4.2.5.2.2	<i>Criofratura</i>	63
4.2.5.2.3	<i>Diâmetro das fibras poliméricas (malhas)</i>	64
4.3	FLUXOGRAMA.....	64
5	RESULTADOS	65
5.1	CITOTOXICIDADE EM OSTEÓBLASTOS	65
5.1.1	Reação MTT em filmes 24h	65
5.1.2	Reação MTT em filmes 48h	66
5.1.3	Reação MTT em filmes 72h	67
5.1.4	Reação MTT em malhas 24h	68
5.1.5	Reação MTT em malhas 48h	69
5.1.6	Reação MTT em malhas 72h	70
5.1.7	Reação MTT em todos os períodos em Filmes e Malhas	72
5.2	ANÁLISE ESTRUTURAL	73
5.2.1	Fotografia	73
5.2.2	Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)	74
5.2.2.1	Amoxicilina.....	74
5.2.2.2	Azitromicina	76
5.2.2.3	Clindamicina	78
5.2.2.4	Metronidazol	80
5.2.2.5	PLLA	82
5.2.3	Diâmetro das fibras poliméricas (malhas)	85
6	DISCUSSÃO	87
7	CONCLUSÃO	93
	REFERÊNCIAS	95
	ANEXO	107

1 INTRODUÇÃO

Os osteoblastos são células de origem mesenquimal, responsáveis pela síntese e secreção dos componentes orgânicos da matriz óssea (Mackie, 2003; Arana-Chavez; Bradaschia, 2012). Além disso, funcionam como transmissores de sinais para a remodelação, um fenômeno que engloba formação e reabsorção óssea (Feng; McDonald, 2011; Ryser; Murgas, 2017).

Quando há um desequilíbrio na remodelação do osso, seja por traumas, cirurgias ou doenças infecciosas, há o favorecimento da reabsorção e, portanto, defeitos ósseos são criados (Kim et al., 2014).

Em Odontologia, os defeitos ósseos podem estar relacionados a patologias ao redor de dentes e implantes. As reabsorções ósseas relacionadas à periodontite ou periimplantite podem levar ao insucesso da terapia adotada devido a ampla gama de microorganismos envolvidos (Suárez-López et al., 2016; Surapaneni et al., 2016).

Atualmente, os polímeros atraem muita atenção na medicina regenerativa do tecido ósseo (Chen et al., 2008). São os candidatos preferidos para o desenvolvimento de dispositivos terapêuticos tais como próteses temporárias, veículos de liberação controlada de fármacos e estruturas porosas tridimensionais como matriz de suporte celular na engenharia de tecidos (Nair; Laurencin, 2007; Davachi et al., 2016).

Para delinear uma matriz de suporte celular na engenharia do tecido ósseo, é necessário um substrato que guie a adesão e proliferação celular. Os polímeros biodegradáveis são substratos amplamente investigados na regeneração óssea devido a não necessidade de um segundo procedimento cirúrgico para remover o dispositivo (Liu et al., 2004).

O poli(L-lactídeo) (PLLA), um dos poucos polímeros biodegradáveis sintéticos aprovados pela *Food and Drug Administration (FDA)* para certas aplicações clínicas humanas, tem se mostrado um substrato adequado na cultura de osteoblastos (Liu et al., 2004; Sadeghi-Avalshahr et al., 2016; Zeng et al., 2016).

Por isso, esse polímero tem sido amplamente utilizado como uma barreira de membrana segura na engenharia tecidual óssea para guiar a regeneração de tecidos e defeitos ósseos resultantes de processos de doença. Sua presença auxilia a reparação desse tecido através de dispositivos que funcionam como matriz de suporte celular que estimulam o osteoblasto a realizar sua função essencial (Hou et al., 2004).

Assim, biomateriais com potencial para estimular a formação óssea e induzir a regeneração possuem importantes aplicações em Odontologia, nas diversas especialidades como periodontia, implantodontia e cirurgia maxilofacial (Lafzi et al., 2016).

Quando a reabsorção óssea ocorre juntamente com infecções, utilizamos como terapia adicional a prescrição de antimicrobianos. Porém, a prescrição desses fármacos sistêmicos tem sido questionada devido a ausência de efetividade em tratamentos de profilaxia ou devido ao seu uso excessivo causar o surgimento de cepas bacterianas resistentes (Havard; Ray, 2011; Merlos et al., 2014; Surapaneni et al., 2016).

Para evitar a resistência bacteriana, dispositivos poliméricos incorporados com antimicrobianos para uso local têm sido desenvolvidos para liberação de fármacos no sítio alvo (Lyutakov et al., 2015). Esses dispositivos conferem vantagens por evitar efeitos indesejáveis, tais como, hipersensibilidade, problemas gastrointestinais e a seleção bacteriana, além de manter uma concentração ideal do fármaco no lugar da infecção (Rams; Slots, 1996).

Atualmente, existe uma grande variedade de biomateriais que podem ser empregados para a administração local de antibióticos e sua eficácia tem sido demonstrada (Huh; Kwon, 2011). Assim, o PLLA pode ser utilizado tanto como um dispositivo de matriz de suporte celular quanto como um liberador de fármaco local (Zhang et al., 2015; Kankilic et al., 2014; Wu et al., 2014).

Sua confecção pode ser feita de diferentes formas, sendo o método de eletrofiação (malhas) e deposição (filmes) muito utilizados (Salgado et al., 2004; Zhou et al., 2009).

Idealmente, essa matriz de suporte celular e liberadora de fármaco, independentemente do seu método de confecção, deve ser biocompatível, proporcionar uma estabilidade mecânica adequada e construir um molde que combine com os tecidos circundantes, sem causar efeitos tóxicos. Para isso, o teste colorimétrico com base no sal tetrazólio (MTT) pode ser usado para avaliar a viabilidade e proliferação celular (Mosmann, 1983).

1.1 JUSTIFICATIVA

Devido a necessidade de uma proteção terapêutica adicional em procedimentos odontológicos que podem interferir no equilíbrio do tecido ósseo, justifica-se a procura de dispositivos para uso local, como o PLLA no formato de malhas ou filmes incorporados com antimicrobianos, para auxiliar na regeneração e reparação óssea, sem causar citotoxicidade em osteoblastos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão da literatura será apresentada na seguinte ordem para exposição dos conceitos deste trabalho, a saber: Tecido ósseo; Engenharia tecidual e biomateriais poliméricos; Características do poli(L-lactídeo) (PLLA); Citotoxicidade em osteoblastos; Antimicrobianos em Odontologia; Características dos antimicrobianos estudados e Associação polímero (PLLA) e antimicrobianos.

2.1 TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é o principal constituinte do esqueleto dos vertebrados. Caracteriza-se por ser um tecido altamente especializado, de natureza conjuntiva, o qual é formado por células e material extracelular calcificado, o que o torna fortemente rígido e resistente. Apesar de seu aspecto aparentemente inerte, os ossos são estruturas altamente dinâmicas, que durante toda a vida do indivíduo sofrem constantes remodelações. Além disso, possuem a capacidade de reparação quando lesionados, como em casos de fraturas e traumas, o que demonstra sua vitalidade (Sodek et al., 2000, Feng; McDonald, 2011; Arana-Chavez; Bradaschia, 2012).

O osso possui importantes funções vitais, como: fornecer suporte e fixação para tecidos moles e músculos, proteger órgãos vitais e atuar como um depósito de cálcio, fosfato além de outros íons utilizados para o metabolismo e bom funcionamento do organismo (Sodek et al., 2000; Arana-Chavez; Bradaschia, 2012).

Existem dois tipos principais de tecido ósseo: o osso cortical, que fornece uma função mecânica e protetora, e o osso trabecular, que fornece força e, mais importante, a maioria da função metabólica, além de ser o local principal da remodelação óssea (Feng; McDonald, 2011).

A remodelação óssea é um processo fisiológico contínuo, complexo e necessário para a manutenção e adaptação do esqueleto saudável que envolve

interações multicelulares, sinalização bioquímica e estímulos mecânicos (Robling et al., 2006; Ryser; Murgas, 2017).

Na remodelação, o osso velho ou danificado é removido (reabsorvido) sendo então substituído por osso novo (Feng; McDonald, 2011). Esse processo é controlado por uma cascata de eventos combinados a uma programação genética com a regulação de genes por fatores locais e sistêmicos (Sodek et al., 2000). As populações de células que participam desse processo são derivadas de diferentes grupos de progenitoras que estão sob controle de mecanismos distintos (Robling et al., 2006).

A formação óssea envolve a proliferação e migração das células osteoprogenitoras e a diferenciação destas em osteoblastos (Sodek et al., 2000). Os osteoblastos, tanto no embrião quanto no adulto, são as células responsáveis pela síntese e secreção da parte orgânica da matriz óssea, onde o componente mais abundante é o colágeno tipo I, além de ter a capacidade de armazenar fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz (Mackie, 2003; Arana-Chavez; Bradaschia, 2012).

As células osteoblásticas dispõem-se ao longo das superfícies ósseas, uma ao lado da outra. Quando essas células estão em intensa atividade sintética, apresentam-se na forma cubóide e quando estão pouco ativas tornam-se achatadas (Salgado et al., 2004; Capulli et al., 2014).

Por sua vez, os osteoclastos são células móveis, multinucleadas, que secretam ácido clorídrico e enzimas proteolíticas e possuem a função de reabsorver o osso que está envelhecido ou danificado (Salgado et al., 2004; Kim et al., 2014; Capulli et al., 2014).

Uma vez que os osteoblastos completaram sua tarefa de produzir uma nova matriz óssea, eles morrem ou ficam embutidos no tecido ósseo onde se diferenciam em osteócitos (Sims; Gooi, 2008). Os osteócitos são conectados através de uma rede complexa e são pensados para desempenhar um papel integral na detecção de estímulos biomecânicos e traduzi-los em sinais químicos para orquestrar o processo de remodelação por osteoclastos e osteoblastos (Ryser; Murgas, 2017).

A homeostase desse tecido depende de uma remodelação óssea equilibrada (Kim et al., 2014). Um desequilíbrio entre a reabsorção e a formação óssea pode ocorrer em certas condições patológicas, o que leva a remodelação anormal e ao desenvolvimento de distúrbios ósseos. Tal é o caso da osteoporose, onde as alterações hormonais causam desequilíbrios nesse processo e podem levar à fratura dos ossos (Feng; McDonald, 2011; Kim et al., 2014).

Uma série de estímulos afetam o *turnover* ósseo, incluindo hormônios, citocinas e estímulos mecânicos. Todos estes fatores afetam a quantidade e a qualidade do tecido produzido (Robling et al., 2006).

Em Odontologia, as doenças periodontais e as periimplantares se caracterizam pela perda óssea ao redor do dente ou implante devido a presença de bactérias patogênicas (Lang et al., 2004).

Quando há um desequilíbrio no fenômeno da remodelação devido, por exemplo, a infecções bacterianas há o favorecimento da reabsorção óssea a qual é mediada pelos osteoclastos (Sims; Gooi, 2008). Assim, para que os osteoblastos entrem em ação, controlando a remodelação óssea junto aos osteoclastos, minimizando ou impedindo a perda óssea, a presença de dispositivos que forneçam uma estrutura onde as células ósseas possam se aderir, proliferar e eventualmente produzir proteínas de matriz extracelular é desejada. Para que esse dispositivo se integre com o tecido, o mesmo deve imitar a estrutura e morfologia do tecido ósseo natural (Stevens et al., 2008).

Visto isso, dispositivos poliméricos associados a antimicrobianos poderão auxiliar no combate de infecções e na restauração e manutenção da função tecidual, estimulando a reparação óssea no local desejado, funcionando como matrizes de suportes celular e administradores de fármacos que vão auxiliar no combate da infecção. Mas o reparo tecidual é um processo interativo e dinâmico que envolve várias alterações bioquímicas e celulares, portanto é necessário que os dispositivos não sejam citotóxicos (Byeon et al., 2013; Chen et al., 2017).

2.2 ENGENHARIA TECIDUAL E BIOMATERIAIS POLIMÉRICOS

A engenharia tecidual aplica os princípios da biologia e da engenharia para o desenvolvimento de substitutos que restaurem, mantenham ou melhorem a função do tecido que pode ter sido danificado, perdido ou envelhecido (Horst et al, 2012; Sharma et al., 2014).

Os biomateriais são compostos que desempenham um papel crucial na engenharia dos tecidos, são utilizados para a fabricação de estruturas que entram em contato com sistemas biológicos para tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo (Griffith, 2000; Sharma et al., 2014).

O pré-requisito essencial para qualificar um material como um biomaterial é a biocompatibilidade, que se caracteriza pela capacidade de um material efetuar uma resposta adequada e compatível com o tecido ou órgão vivo (Nair; Laurencin, 2007).

Além da biocompatibilidade, o biomaterial deve possuir importantes propriedades como: não apresentar toxicidade após sua implantação ou através dos produtos de sua degradação, não provocar resposta inflamatória, possuir vida útil aceitável, ter tempo de degradação desejável e que de preferência coincida com o processo de cicatrização ou regeneração, possuir propriedades mecânicas apropriadas, e ser capaz de ser metabolizado ou excretado do organismo (Nair; Laurencin, 2007).

Devido a essas características, o uso de biomateriais como matrizes de suporte celular tridimensionais, porosos e biodegradáveis emergiu como um método promissor na regeneração de tecidos (Stevens et al., 2008).

Tais suportes, conhecidos pelo termo em inglês como *scaffolds* e traduzidos para o português como matriz de suporte celular, têm funções que vão muito além de prover uma matriz biocompatível com porosidade, rugosidade, estrutura tridimensional, degradabilidade, propriedades mecânicas e de transporte de massa adequadas. Inclui também a potencial estimulação do crescimento, migração, interação e diferenciação celular por meio da incorporação de fatores/produtos que propiciam um microambiente que remeta à matriz extracelular (Lannutti et al., 2007).

Com o intenso crescimento do mercado de biomateriais, o uso de uma variedade de polímeros bioabsorvíveis como matrizes de suporte celular tem sido utilizados na engenharia tecidual visando às aplicações no campo da medicina regenerativa, como dispositivos de reparação de tecidos duros, como o osso (Chen et al., 2008). Na regeneração óssea, devemos utilizar estruturas tridimensionais de grande área de superfície e alta porosidade em que as células com propriedades osteogênicas consigam se semear e incorporar na área de defeito (Idris et al., 2010).

Esses polímeros que funcionam como matrizes de suporte celular podem ser obtidos por meio de organismos vivos ou a partir de reações de polimerização, classificando-se, assim, respectivamente, como naturais e sintéticos (Griffith, 2000; Sharma et al., 2014).

Matrizes de suporte celular sintéticas tem se mostrado promissoras e estão sendo muito utilizados devido a sua maior estabilidade durante o uso. Possuem propriedades bem definidas e reproduzíveis, permitem uma maior capacidade de adaptar propriedades mecânicas, sendo possível manipular a forma e o tamanho dos dispositivos, assim como sua viscoelasticidade e cinética de degradação (Rezwan et al., 2006; Lannutti et al., 2007; Baolin; Ma, 2014).

Devido a essas propriedades, tais polímeros têm sido utilizados, além de na confecção de suportes tridimensionais para proliferação celular, como suturas biodegradáveis, dispositivos absorvíveis de fixação óssea e dispositivos para a liberação de fármacos (Baolin; Ma, 2014; Philippart et al., 2015).

Nesta categoria de biomateriais poliméricos sintéticos, os principais tipos de polímeros constituintes são: poliamidas, polietileno, polipropileno, poliacrilatos, fluorocarbonos, poliéters, poliuretanos, poliésteres, entre outros (Baolin; Ma, 2014).

Os poliésteres são um tipo de polímero que contém o grupo funcional éster na sua cadeia principal (Rezwan et al., 2006). E, especificamente na área de Engenharia Tecidual, os poliésteres sintéticos biodegradáveis são os mais usados (Griffith, 2000).

Os poliésteres podem ser desenvolvidos a partir de uma variedade de monômeros através das vias de abertura do anel e de polimerização de condensação dependendo das unidades monoméricas (Nair; Laurencin, 2007).

Os poliésteres biodegradáveis sofrem degradação hidrolítica por meio da desesterificação. Após degradados, os componentes monoméricos são removidos por vias naturais, havendo no organismo mecanismos altamente especializados para remover completamente esses componentes formados. O tempo de degradação desses compostos pode variar de dias a anos dependendo da formulação e do peso molecular inicial (Griffith, 2000; Nair; Rezwan et al., 2006; Laurencin, 2007; Idris et al., 2010).

Os poliésteres biodegradáveis são provenientes de monômeros, tais como o poli (lático) (PLA), poli (glicólico) (PGA) e poli (ϵ -caprolactona). Esses polímeros sintéticos biodegradáveis e seus derivados são comumente utilizados em aplicações médicas. Sendo os polímeros poli-L-glicólico (PLGA) e o poli(L-lactídeo) (PLLA) muito utilizados na medicina regenerativa (Nair; Laurencin, 2007).

A utilização de polímeros sintéticos e biodegradáveis, como o PLLA, na engenharia de tecidos regenerativos e implantes ósseos é cada vez mais praticada na área biomédica devido às suas boas propriedades mecânicas, boa biocompatibilidade e completa degradação em organismos vivos, sem efeitos colaterais adversos (Neumann et al., 2017).

2.3 CARACTERÍSTICAS DO POLI(L-LACTÍDEO) (PLLA)

O poli(L- lactídeo) (PLLA) é um polímero da classe dos poli(α -hidróxiácidos), uma das famílias de polímeros mais atrativas e promissoras, pois além de biorreabsorvíveis, eles também são biocompatíveis, biodegradáveis e atóxicos ao organismo podendo ser utilizados em diversas aplicações na área médica (Lasprilla et al., 2012).

O PLLA é uma forma opticamente ativa do ácido láctido (PLA) (Griffith, 2000). E caracteriza-se por ser um polímero cristalino (~ 37% de cristalinidade), onde o grau de cristalinidade depende do peso molecular e dos parâmetros de processamento do polímero. Possui uma temperatura de transição vítrea de 60-65°C e uma temperatura de fusão de aproximadamente 175°C, além de ser uma molécula

hidrofóbica, de alto peso molecular, que possui boa resistência mecânica (Middleton; Tipton, 2000; Nair; Laurencin, 2007).

No entanto, devido ao perfil hidrofóbico com um elevado peso molecular e ponto de fusão, a taxa de degradação do PLLA é prolongada (Idris et al., 2010). Tem sido relatado que a taxa de degradação do PLLA é muito baixa, podendo levar de 2 a 5,6 anos para reabsorção total *in vivo*. Contudo, a taxa de degradação depende do grau de cristalinidade do polímero, bem como da porosidade da matriz (Middleton; Tipton, 2000; Nair; Laurencin, 2007). Já a meia vida de PLLA à 37°C em soro fisiológico normal foi relatada de 4-6 meses (Xiao et al., 2012).

Ainda, o PLLA é um poliéster termoplástico, anfipático, linear e sintetizado através de fontes renováveis, tais como amido de milho e cana de açúcar (Lasprilla et al., 2012; Tsuji, 2016).

Desde 1970, a *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos (FDA) aprovou o PLLA como matéria-prima para a fabricação de uma ampla variedade de produtos, permitindo seu contato com fluidos humanos biológicos (Lasprilla et al., 2012; Silva et al., 2017).

O PLLA tem aplicações generalizadas como suturas, dispositivos de administração de fármacos, próteses, matrizes de suporte celular, enxertos vasculares, parafusos de osso, pinos, hastes ou placas. Fortes propriedades mecânicas e degradação em produto final inócuo são as principais razões para tal variedade de aplicações (Shikinami et al., 2005).

As aplicações de biomateriais como matrizes de suporte celular e que atuam na distribuição de fármacos dependem, principalmente de materiais que se degradam nos fluidos corporais, de modo que o dispositivo acaba por desaparecer sem quaisquer efeitos nocivos ao organismo (Griffith, 2000). O PLLA, assim como outros polímeros sintéticos biodegradáveis, apresenta como vantagem a não necessidade de uma nova cirurgia para a remoção do dispositivo já que são biomateriais que são reduzidos e reabsorvidos pelo organismo (Chen et al., 2008; Sharma et al., 2014).

O uso de polímeros como matriz de suporte celular tornou-se de grande interesse na regeneração tecidual guiada, como modalidade terapêutica, pois

possibilita a proliferação e diferenciação de células progenitoras ósseas na área isolada (Moses et al., 2008).

Uma matriz de suporte celular na engenharia de tecido ósseo, precisa de um substrato apropriado para guiar a adesão celular, a proliferação e diferenciação. Estudos demonstram que o PLLA, é um substrato adequado para culturas de osteoblastos (Sadaghi-Avalsharhr et al., 2016; Zeng et al., 2016; Chen et al., 2017). No entanto, devido a natureza hidrofóbica do PLLA, estas estruturas precisam de estratégias de modificação de superfície para guiar as células (Chen et al., 2017). Então, soluções de polímeros de PLLA têm sido amplamente utilizados como dispositivos seguros para guiar a regeneração de tecidos, como defeitos ósseos resultantes de doenças (Hou et al., 2004).

Idealmente, uma matriz de suporte celular deve ser capaz de induzir a regeneração do tecido ósseo, e juntamente com essa função deve tratar a infecção administrando um fármaco antibacteriano de forma controlada. A administração controlada de um agente antibacteriano no local da cirurgia poderá fornecer um tratamento direcionado para a infecção (Yazdimamaghani et al., 2014). Logo, as matrizes de suporte celular na engenharia de tecidos podem possuir propriedades antibacterianas evitando-se o risco de infecção do sítio operado ou infectado. Dessa forma, o uso de PLLA incorporados com antimicrobianos pode ser utilizado como uma matriz de suporte celular e carreador para liberação de fármacos.

Existem diferentes métodos para a confecção dessas matrizes biodegradáveis de suporte celular e administradores de fármacos, incluindo a eletrospiação e deposição (Salgado et al., 2004; Zhou et al., 2009).

Figura 2.1 Estrutura química do PLLA

2.3.1 Eletrofiação (malhas)

A eletrofiação caracteriza-se por uma técnica de fiação, que utiliza forças eletrostáticas para produzir fibras finas (nanofibras ou microfibras) a partir de soluções de polímeros sintéticos ou naturais. Essa tecnologia tem sido utilizada de forma crescente em diversas áreas devido a sua versatilidade e potencial para aplicações em diversos campos, em especial na engenharia de tecidos (Lannutti et al., 2007; Bhardwaj; Kundu, 2010).

Os elementos necessários para que a eletrofiação ocorra incluem: uma seringa com capilar, uma fonte de alta tensão e um coletor (normalmente uma placa metálica). A solução de polímero é obtida através da dissolução do polímero em algum solvente e então esse fluido polimérico é introduzido na seringa com capilar. Quando um potencial elétrico é aplicado entre a fonte de polímero e o coletor, a carga acumula-se e é forçada à superfície de uma gota polimérica emergente na extremidade da agulha metálica. A fonte de alta tensão oferece carga de polaridade na solução de polímero na seringa e a gota é então acelerada para o coletor que possui polaridade oposta e então a fibra é formada (Liang et al., 2007; Lannutti et al., 2007; Sill; Von Hecum, 2008) (Figura 2.2).

No entanto, alguns polímeros podem emitir odores desagradáveis ou mesmo nocivos devido ao uso de solventes, por isso os processos devem ser conduzidos dentro de câmaras com um sistema de ventilação. Parte do solvente pode ficar retido na fibra polimérica final e pode afetar o desempenho biológico de uma matriz de suporte celular (Lannutti et al., 2007).

Em geral, a morfologia das fibras poliméricas é influenciada por vários parâmetros de processamento, tais como viscosidade, tensão aplicada, taxa de alimentação e distância entre a fiação e placa coletora (Frenot; Chronakis, 2003). As características topográficas podem ser facilmente obtidas ajustando-se o diâmetro, o alinhamento e a distância interfibra (He et al., 2010).

As fibras produzidas por esta técnica imitam as características da matriz extracelular em comparação com as técnicas convencionais (Ma, 2008). A gama de fibras produzidas por este processo, oferecem diversas vantagens como uma

relação superfície/volume muito elevada, porosidade ajustável, maleabilidade para se adaptar a uma grande variedade de tamanhos e formas, e a capacidade de controlar a composição das fibras afim de se obter os resultados desejados (Liang et al., 2007; Bhardwaj; Kundu, 2010).

Por apresentar poros menores e maior área de superfície do que as fibras produzidas por processos convencionais, as fibras obtidas por eletrofiação tem sido amplamente aplicadas com sucesso em vários campos, tais como, na engenharia tecidual através de matrizes de suporte celular e na administração controlada de fármacos (carreadores farmacológicos) (Bhardwaj; Kundu, 2010; Liang et al., 2007).

A eletrofiação de polímeros sintéticos, como o PLLA, muitas vezes oferece vantagens em relação aos polímeros naturais, uma vez que permitem uma maior capacidade de adaptar suas propriedades, incluindo adaptação da estabilidade térmica e resistência mecânica e taxa de degradação desejada (Lannutti et al., 2007; Bhardwaj; Kundu, 2010).

O polímero eletrofiado com adição do fármaco, o qual passa a fazer parte de um sistema de liberação farmacológica, trabalha como um carreador funcionando como um importante sistema que aumenta a especificidade no sítio de ação e diminui a dose terapêutica, diminuindo os efeitos indesejáveis da terapia sistêmica (Qi et al., 2013).

Já no uso de matrizes de suporte celular, a literatura tem demonstrado que os suportes confeccionadas através da eletrofiação de polímeros biodegradáveis sintéticos atuam como substitutos promissores para promover a adesão, proliferação, migração e diferenciação das células (Papenburg et al., 2010). Mas um grande desafio encontrado na utilização dessas matrizes de suporte celular para engenharia de tecidos é a distribuição celular não uniforme e a falta de migração celular (Bhardwaj; Kundu, 2010).

Figura 2.2 - Simulação da formação de fibras por Eletrofiação

2.3.2 Deposição (filmes)

O método de deposição visa em se preparar uma solução de polímero, que consiste na dissolução do polímero, a qual pode ter a incorporação de alguma partícula, e verter essa solução em um recipiente adequado. É um método muito utilizado nos estudos com os polímeros dissolvidos em solventes (Lannutti et al., 2007).

Diferentes substâncias e partículas tem sido incorporadas nas soluções poliméricas para o uso desse tipo de confecção de dispositivos como: fatores de crescimento, óxido de zinco (ZnO), fármacos antimicrobianos entre outros (Lee et al., 2013; Uz et al., 2016; Lizundia et al., 2017; Kempin et al., 2017).

Essa técnica tem sido muito utilizada para a preparação de dispositivos de administração farmacológica. Pois é uma técnica que permite a fabricação de dispositivos em vários formatos. Sendo considerada então uma tecnologia promissora, pois a variedade anatômica do dispositivo permite uma adaptação individualizada para aplicação nos locais específicos desejados (Kempin et al., 2017).

Apesar das diferentes técnicas de produção, devemos nos certificar que a metodologia de processamento não afete negativamente as propriedades dos materiais, como a biocompatibilidade e propriedades químicas (Salgado et al, 2004).

Devido as adequadas propriedades funcionais dos polímeros sintéticos (como o PLLA), esse biomaterial é utilizado como uma matriz de suporte celular e liberador de fármacos, mas devido a técnica de produção pode liberar subprodutos tóxicos durante sua degradação, o que poderia desencadear reações inflamatórias no paciente ao longo de sua utilização (Koseva et al., 2015). Por esse motivo, as diferentes metodologias desenvolvidas através da incorporação de novas partículas em soluções de PLLA devem ser testadas em relação à possível citotoxicidade do material.

2.4. CITOTOXICIDADE EM OSTEOLASTOS

A citotoxicidade caracteriza-se por uma propriedade nociva de um material em relação às células. Os testes para avaliar a citotoxicidade consistem em colocarmos a substância direta ou indiretamente em contato com a cultura de células. Esse teste pode ser feito de diferentes maneiras entre os quais utiliza-se a incorporação de corantes vitais ou inibe-se a formação de colônias celulares (Nuñez-Anita et al., 2014).

Experimentos com culturas celulares, como a de osteoblastos têm sido empregados para a avaliação da citotoxicidade de diversos materiais (Sadaghi-Avalsharhr et al., 2016; Chen et al., 2017).

Ao considerar um ensaio que mostra a viabilidade das células, devemos levar em consideração diversas variáveis, incluindo potenciais interferências, linearidade, sensibilidade e reprodutibilidade do ensaio. Esses ensaios devem ser sensíveis para detectar pequenas diferenças na quantidade de células viáveis, mas suficientemente potentes para gerar resultados reprodutíveis sob diferentes condições experimentais (van Tonder et al., 2015).

Outra vantagem de um ensaio de citotoxicidade é que o experimento é relativamente simples e desde a sua primeira tentativa de realização do experimento é possível obter dados confiáveis, além do potencial de automatização. Estas

características garantem que os dados de citotoxicidade *in vitro* podem ser obtidos de uma forma eficaz em termos de tempo e de custo (van Tonder et al., 2015).

Para detecção, *in vitro*, da citotoxicidade de um potencial agente medicamentoso ou de outros materiais que possam ser tóxicos, um teste bastante sensível é o ensaio MTT [brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio], um teste colorimétrico com base no sal tetrazólio que mede a viabilidade e proliferação celular (Mosmann, 1983; Tang et al., 2007). Esse ensaio tem sido considerado como o padrão-ouro dos ensaios de citotoxicidade, uma vez que é altamente sensível (Mosmann, 1983; van Tonder et al., 2015).

O reagente MTT é uma substância de coloração amarela, a qual é colocada diretamente na substância com células que se quer avaliar, e quando incubado com as células viáveis, é reduzido através da clivagem da enzima succinato desidrogenase (SDH), a um produto de cristais de formazan, de coloração púrpura – azul escuro. A produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória, então o processo de redução requer mitocôndrias ativas, pois o anel de tetrazólio do MTT é clivado apenas nessas condições e, portanto, esse teste mensura a sobrevivência e proliferação celular. Logo, a quantidade de cristais formados é diretamente proporcional ao número de células viáveis. E essa quantidade de células viáveis pode ser determinada em espectrofotômetro de múltiplos poços, com elevado grau de precisão (Mosmann, 1983; Tang et al., 2007; Chen et al., 2008) (Figura 2.3).

A remoção do excesso de corante com aspiração suave e lavagem com tampão fosfato-salino (PBS) seguido por solubilização dos cristais de formazano em dimetilsulfóxido (DMSO) melhoram a sensibilidade deste ensaio (van Tonder et al, 2015).

Sabe-se que os antimicrobianos como amoxicilina, azitromicina, metronidazol e clindamicina são aprovados pelas instituições reguladoras para uso sistêmico, porém devido à seleção bacteriana, a liberação local desses antibióticos é de grande interesse. Uma maneira adequada seria a liberação desses antimicrobianos através da incorporação dos mesmos a dispositivos que não apresentem citotoxicidade (Pfaffenroth et al, 2011).

Figura 2.3 Redução do MTT

2.5 ANTIMICROBIANOS EM ODONTOLOGIA

2.5.1 Antimicrobianos para prevenção e controle de infecções

No início do século 20, as doenças infecciosas foram a principal causa de morte em todo o mundo. As diminuições na morbidade e mortalidade por doenças infecciosas no último século foram atribuídas principalmente à introdução de agentes antimicrobianos. No entanto, atualmente, a resistência aos antibióticos tem atingido um nível crítico (Andersson; Hughes, 2010; Huh; Kwon, 2011).

A crescente prevalência de infecções causadas por bactérias multirresistentes é um dos mais graves problemas enfrentados pelos serviços de saúde (Costelloe et al., 2010; Surapaneni et al., 2016). O uso indiscriminado e a prescrição excessiva de antibióticos é um dos principais motivos da resistência, o que levanta a necessidade de uma avaliação crítica da cobertura antibiótica (Havard; Ray, 2011; Merlos et al., 2014; Surapaneni et al., 2016).

O uso inadequado de antibióticos sistêmicos não só impulsiona a resistência aos antibióticos, mas também aumenta o risco de reações anafiláticas potencialmente fatais e expõe as pessoas a efeitos colaterais desnecessários (Costelloe et al., 2010, Cope; Chestnutt, 2014; Surapaneni et al., 2016). Além disso, a prescrição de antibióticos para problemas médicos comuns aumenta as

expectativas dos pacientes em melhorar rapidamente, levando a um ciclo vicioso de aumento da prescrição para atender às expectativas dos pacientes (Cope; Chestnutt, 2014).

Visto isso, os profissionais de saúde devem desempenhar um papel-chave na garantia do uso adequado de antimicrobianos. Aponta-se que os cirurgiões-dentistas contribuem significativamente para a investigação do uso desse tipo de medicamento, através de pesquisas, discussões científicas, interação entre pesquisadores e clínicos, e quando possível reduzindo a prescrição de antimicrobianos na prática clínica (Havard; Ray, 2011; Merlos et al., 2014).

Dentro da prática clínica odontológica, o uso de antibióticos profiláticos ainda é controverso (Ahmad; Saad, 2012; Merlos et al., 2014; Surapaneni et al., 2016). Ao longo dos anos, as recomendações clínicas para a profilaxia antibiótica mudaram e há uma tendência para uma posição definida (Wilson et al., 2007). Estudos mostram que o risco de reações adversas aos antibióticos e o crescente desenvolvimento de bactérias resistentes aos fármacos superam os benefícios da profilaxia (Andersson; Hughes, 2011).

A tendência emergente parece ser a de evitar o uso profilático de antibióticos em conjunto com o tratamento odontológico, a menos que haja uma indicação clara, ou seja, os antibióticos só devem ser administrados de forma profilática nos casos em que o benefício tenha sido demonstrado ou se houver consenso quanto a essa utilização já que o objetivo da profilaxia antibiótica é prevenir infecções pós-operatórias locais e prevenir a propagação da infecção em indivíduos susceptíveis (Andersson; Hughes, 2011).

Existem relativamente poucas situações em que a profilaxia antibiótica está indicada. Devem receber tratamento profilático os pacientes portadores de próteses cardíaca ou articular, imunodeprimidos ou que foram tratados por corticosteróides por longo tempo; pacientes que receberam irradiação; portadores de doenças autoimunes e aqueles que possuem diabetes não controlada (Wilson et al., 2007; Rocha, 2013).

Sabemos que as infecções odontogênicas são polimicrobianas e envolvem microorganismos aeróbios e anaeróbios, mas geralmente os anaeróbios

predominam. A susceptibilidade antimicrobiana das bactérias envolvidas nessas infecções é o principal fator na determinação do resultado provável do tratamento antibiótico (Heimdahl et al., 1980).

Uma vez que os resultados de sensibilidade aos antibióticos geralmente não estão disponíveis durante vários dias após a recepção das amostras clínicas, e a entrega rápida de espécimes ao laboratório raramente é viável em um ambiente de prática odontológica os antibióticos são na maioria das vezes prescritos empiricamente já que o cirurgião-dentista não sabe quais são os microorganismos responsáveis pela infecção, por apenas suspeitar quais microorganismos estão agindo acaba por frequentemente prescrever antibióticos de amplo espectro (Kuriyama et al., 2007).

A sensibilidade antibiótica das bactérias encontradas na cavidade oral está diminuindo gradualmente, e um aumento do número de cepas resistentes tem sido detectado. Esse fenômeno da resistência também tem sido relatado para fármacos como penicilinas, clindamicina e macrolídeos (Grosso et al., 2005).

Considerando-se a seleção bacteriana, uma alternativa viável à administração sistêmica seria o uso de revestimentos de polímeros sintéticos locais em associação com os antimicrobianos. Esses revestimentos de polímeros sintéticos locais que fornecem ação antimicrobiana em superfícies sem comprometer o grau de compatibilidade com o tecido humano são de grande interesse, pois são mais baratos e menos trabalhosos de se preparar mostrando que é uma abordagem promissora para se criar superfícies antimicrobianas (Pfaffenroth et al., 2011).

Quando comparamos a administração de antibióticos sistêmicos e antibióticos locais, a administração local é considerada mais efetiva, devido ação do fármaco diretamente no sítio desejado, diminuindo-se o risco de causar efeitos colaterais indesejáveis e reduz o risco de desenvolvimento de seleção bacteriana (Qi et al., 2013). Contribuindo para modulação da resposta inflamatória, minimizando efeitos da destruição tecidual óssea e conjuntiva (Meira et al., 2007).

Atualmente, existem alguns dispositivos de liberação farmacológica local utilizados em Odontologia, como: o Elyzol®, um gel bioabsorvível composto por benzoato de metronidazol; o Periochip®, onde a clorexidina foi incorporada à uma

matriz gelatinosa biodegradável; Actisite®, um sistema não absorvível de acetato com tetraciclina; Arestin®, esferas de minociclina encapsulada bioabsorvível; e o Atridox®, um gel de hiclato de doxiciclina (Meira et al., 2007). Mas além da administração de fármacos locais, dispositivos que atuem como matrizes de suporte celular são interessantes para a reparação do tecido lesado (Stevens et al., 2008).

Logo, o uso de biomateriais com potencial para estimular a formação óssea e induzir a regeneração de defeitos ósseos são importantes com aplicações em periodontia e cirurgia maxilofacial (Lafzi et al., 2016). Os biomateriais poliméricos funcionam como dispositivos de liberação local que permitem manter a concentração do fármaco constante na faixa terapêutica por um período prolongado e com uma única dose, permitindo assim aumentar a eficácia clínica e diminuir a toxicidade (Qi, et al., 2013).

Carnaval, em 2015, constatou que o PLLA é um polímero que associado ao antimicrobianos Amoxicilina, Azitromicina, Clindamicina e Metronidazol mostrou-se citocompatível contra microorganismos como *S. pyogenes* e *S. gingivalis* e não apresentou citotoxicidade para fibroblastos, sugerindo assim uso promissor em especialidades odontológicas.

2.5.2 Antimicrobianos nas Especialidades Odontológicas

2.5.2.1 Periodontia

A periodontite é uma doença inflamatória induzida por fatores etiológicos, sendo o principal deles a placa bacteriana, e ocorre devido à presença de bactérias patogênicas que residem na área subgengival (Marsh; Devine, 2011; Park et al., 2017). Os resultados da doença periodontal incluem perda de cemento, ligamento periodontal e osso. O tratamento padrão consiste em desbridamento mecânico para remoção da placa bacteriana e do cálculo das superfícies dos dentes. Essa abordagem tem mostrado sucesso para a maioria dos pacientes (Drisko, 2014). No entanto, o desbridamento mecânico é um procedimento que possuem algumas

limitações, como a incapacidade de acessar bolsas profundas, irregularidades de superfície e áreas de furca (Jepsen; Jepsen, 2016).

Espera-se que os organismos patogênicos que não sejam acessíveis à remoção mecânica por meio de instrumentos manuais ou elétricos, como ultrassons, possam ser reduzidos ou eliminados pela terapia medicamentosa antimicrobiana. Logo, seu uso como terapêutica auxiliar serve para erradicar ou reduzir o número de bactérias patogênicas em bolsas profundas, furcas e concavidades radiculares ou mesmo bactérias que residem nos tecidos periodontais (Walker; Karpinia, 2002).

Penicilina, amoxicilina, tetraciclina, metronidazol ou combinações desses antimicrobianos têm sido comumente utilizados na terapia periodontal, principalmente em formas agressivas da doença (Teughelset al., 2014; Jepsen; Jepsen, 2016). A clindamicina também tem sido usada ocasionalmente como segunda opção no caso de alergias à penicilina (Jepsen; Jepsen, 2016). Bem como estudos utilizando azitromicina em doenças periodontais também foram reportados (Park et al., 2017).

Embora as doenças periodontais tenham sido consideradas como infecções polimicrobianas, Loesche e colaboradores (1987), propuseram o metronidazol para ser o fármaco de escolha adjunto à remoção mecânica.

Porém, a terapia sistêmica não garante que o antimicrobiano irá atingir o local específico da infecção por patógenos periodontais, o que justifica o uso de antimicrobianos locais para o auxílio no combate das infecções periodontais dentro das limitações de um tratamento mecânico e auxilia no combate da resistência antimicrobiana (Rams; Slots, 1996).

Na cirurgia periodontal, ao contrário da extração dentária, a infecção pode determinar a falha ou o sucesso do tratamento. Devido a esse motivo, é comum, a prescrição de profilaxia antibiótica pré e pós-operatória na prática diária (Mombelli et al., 2011). Estima-se que a percentagem global de infecções pós-cirurgias periodontais esteja entre <1% e até 4,4% na ausência da profilaxia antimicrobiana (Powell et al., 2005). No entanto, esta baixa incidência não pode ser reduzida pela antibioticoterapia, uma vez que nem os benefícios nem diferenças estatisticamente significativas foram encontrados (Powell et al., 2005).

2.5.2.2 Implantodontia

A prioridade hoje do cirurgião-dentista é a de se preservar a saúde bucal dos pacientes restabelecendo seu contorno, função e estética. A substituição de dentes condenados ou ausentes é essencial para manter a função oclusal, as necessidades estéticas e mastigatórias. A mais recente terapia para substituição desses dentes são os implantes dentários, os quais são feitos de materiais biocompatíveis e colocados através de cirurgias no maxilar do paciente (Surapaneni et al., 2016).

A resposta celular quanto à superfície do implante é muito importante para a osseointegração, que é caracterizada pela união física do implante com o osso receptor, a qual é muito desejada para tratamentos protéticos reabilitadores (Lang et al., 2004; Moraschini et al., 2015).

Para aumentar a osseointegração de implantes em indivíduos normais ou que apresentem alterações como no caso de osteoporose, é importante induzir e melhorar as funções dos osteoblastos de forma mais precisa e eficaz na interface implante-osso (Liu et al., 2016).

Todavia, com a boca sendo um campo potencialmente contaminado devido à quantidade de bactérias existentes em sua flora, em alguns casos há a incidência de complicações que podem levar ao insucesso da terapia dos implantes e consequentes perdas ósseas e perda do mesmo. As falhas técnicas, a contaminação de bactérias ao se inserir o implante, a incidência de bacteremia em torno do implante e a periimplantite são exemplos de insucesso (Lang et al., 2004; Ahmad; Saad, 2012; Suárez-López et al., 2016; Surapaneni et al., 2016).

A periimplantite tem sido considerada a principal complicação relacionada à perda do implante, a qual é caracterizada por bolsas profundas, perda óssea e inflamação da mucosa periimplantar (Lang et al., 2004; Suárez-López et al., 2016).

Sabe-se que a microflora presente nos tecidos periimplantares possui grande papel na evolução da doença periimplantar, portanto, a redução e controle destes permitirão um estado de saúde (Schwarz; Larson, 2007).

Os agentes patogênicos da periimplantite são semelhantes aos encontrados na periodontite avançada sendo composta por espiroquetas e anaeróbios gram-negativos como *A. actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*. Então, muitos dos princípios para o tratamento da periodontite são também aplicáveis ao tratamento de implantes dentários que suportam complicações infecciosas (Filoche et al., 2010; Mombelli et al., 2011).

Devido a essas características, a maioria dos profissionais toma precauções extras em relação à possível infecção por bactérias na cirurgia de implantes. Os antibióticos tem sido usados profilaticamente com o objetivo de se prevenir o aparecimento da infecção na ferida cirúrgica e para minimizar as chances de falhas, impedindo a proliferação e disseminação das bactérias patogênicas (Ahmad; Saad, 2012).

Em geral, a profilaxia antibiótica sistêmica só é indicada em pacientes que estão em risco de endocardite infecciosa, indivíduos com imunodeficiência ou quando a cirurgia é realizada em locais infectados. Todavia vários antibióticos sistêmicos têm sido sugeridos para minimizar as infecções após a colocação do implante dentário (Surapaneni et al., 2016).

Mas o uso de antibióticos na odontologia de implantes ainda é controverso. Em uma revisão feita por Esposito (2003) apontou-se que não havia evidência científica apropriada para recomendar ou desencorajar o uso de antibióticos profiláticos sistêmicos para prevenir complicações e falhas de implantes dentários. Vários estudos indicaram reduções nas taxas de infecção quando se utilizou a profilaxia com antibióticos (Lockhart et al., 2004), enquanto outros concluíram que nenhuma diferença estatisticamente significativa pode ser demonstrada, não havendo nenhum benefício no uso da profilaxia antibiótica em implantes (Schwarz; Larson, 2007; Mazzocchi et al., 2007; Ahmad; Saad, 2012).

Com o crescimento de resistência por parte de algumas bactérias a vários tipos de antimicrobianos administrados sistemicamente, particularmente aos β -lactâmicos, eritromicina, clindamicina, tetraciclina e metronidazol, justifica-se a busca por outras terapias (Pfau; Avila-Campos, 2005).

Outras estratégias que têm sido propostas para melhorar as interfaces implante-osso e evitar possíveis falhas/infecções são: manejo cirúrgico por meio de desbridamento; desinfecção por lasers; implantoplastia; procedimentos ressectivos; bem como abordagens regenerativas como aplicação de revestimentos biomiméticos, como o uso de polímeros que estimulem a formação óssea ou inibiam sua reabsorção ou polímeros de liberação local de fármacos (Chan et al., 2014; Kim et al., 2014).

Estudos anteriores demonstram que pode haver uma redução significativa na carga bacteriana em material de implante revestido com polímeros (Kuroda; DeGrado, 2005). Mas, apesar do rápido desenvolvimento da ciência dos materiais e da biotecnologia, a regeneração óssea satisfatória e a osseointegração continuam a ser grandes desafios para os implantes dentários (Liu et al., 2016.)

Devido às condições expostas justifica-se o uso de dispositivos poliméricos para uso local como alternativa ao uso sistêmico em Odontologia para prevenção e combate de infecções, diminuindo-se assim a seleção bacteriana e a carga bacteriana ao redor do implante.

2.5.2.3 Cirurgia

Os cirurgiões-dentistas são muitas vezes confrontados com a decisão de se prescrever antibióticos profiláticos para cirurgias orais. Embora cada caso deva ser avaliado individualmente, se os antibióticos forem prescritos indevidamente, podem produzir uma maior dificuldade no tratamento da infecção legítima. Além da administração sistêmica indiscriminada poder causar resistência bacteriana (Huh; Kwon, 2011; Surapaneni et al., 2016).

A extração cirúrgica dos terceiros molares é o procedimento mais comumente realizado na prática cirúrgica odontológica (Bui et al., 2003). Devido à natureza e ao ambiente da cirurgia, a inflamação e a infecção associada à contaminação bacteriana são as complicações mais comuns após a cirurgia de terceiro molar (Ren; Malmstrom, 2007).

As taxas de infecção após a cirurgia do terceiro molar são relativamente baixas e variam de 3% a 5%, sendo a maioria complicações pequenas e transitórias (Bui et al., 2003; Siddiqi et al., 2010).

Devido as taxas de complicações pós-operatórias serem baixas, a profilaxia antibiótica em cirurgias de extração dentária tem sido um fator de controvérsia entre os cirurgiões-dentistas uma vez que os estudos atuais não mostram diferenças estatisticamente significativas na infecção entre pacientes cobertos por antibióticos e aqueles em que não receberam a cobertura (Ren; Malmstrom, 2007; Monaco et al., 2009; Merlos et al., 2014; Lang et al., 2017). Porém, a profilaxia antimicrobiana é frequentemente utilizada para se conseguir uma redução na incidência de infecção pós-cirúrgica e osteíte alveolar, mas principalmente para a melhoria da velocidade de cicatrização da ferida pós-cirúrgica, redução da intensidade e duração da dor e inchaço, bem como para diminuir a febre e o trismo (Ren; Malmstrom, 2007; Monaco et al., 2009; Merlos et al., 2014)

Um dos aspectos mais preocupantes em relação à patologia infecciosa nas cirurgias odontológicas é a possibilidade de desencadear endocardite infecciosa que se caracteriza por uma infecção rara que pode ser causada por bactérias ou fungos (Gould et al., 2012). Os microorganismos atingem o sistema circulatório através de rupturas nos capilares dos ossos / gengivas e aderem a superfícies irregulares, isto é, válvulas cardíacas danificadas, próteses articulares ou valvares, etc. Se as bactérias colonizam tais superfícies após a bacteremia, elas podem proliferar, com o conseqüente crescimento de populações bacterianas ou fúngicas, pode eventualmente haver destruição da válvula cardíaca (Wilson et al., 2007).

Segundo a American Heart Association (AHA) a lista de pacientes elegíveis para receber profilaxia antimicrobiana foi reduzida para aqueles com alto risco de endocardite, como: portadores de próteses valvares cardíacas; portadores de doença cardíaca congênita; pacientes com história prévia de endocardite infecciosa; valvopatia adquirida em paciente transplantado cardíaco. Assim, a profilaxia antimicrobiana é recomendada para pacientes de alto risco em qualquer procedimento de cirurgia dentária que possa causar bacteremia (Wilson, 2007).

Visto isso, para evitar ou controlar ou minimizar infecções em procedimento de extração dentária, o uso de dispositivos poliméricos incorporados com

antimicrobianos que auxiliem na liberação controlada de fármacos no local da ferida cirúrgica seria uma alternativa à administração sistêmica, evitando-se assim a seleção bacteriana e auxiliando na reparação do tecido ósseo.

2.6 CARACTERÍSTICAS DOS ANTIMICROBIANOS ESTUDADOS

Os antimicrobianos correspondem a uma classe de fármacos que podem ser naturais, semi-sintéticos ou totalmente sintéticos. São substâncias químicas capazes de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos ou destruí-los (Andrade, 2014).

2.6.1 Amoxicilina

A amoxicilina é um antibiótico beta-lactâmico, semi sintético, bactericida, do grupo das penicilinas que interfere na síntese de peptidoglicano da parede celular bacteriana. É considerada a primeira opção de terapêutica medicamentosa em Odontologia devido à melhor absorção e menor risco de efeitos secundários, além de ser de largo espectro, atuando tanto em bactérias gram-positivas quanto gram-negativas (Kuriyama et al., 2007; Andrade, 2014).

A amoxicilina, assim como todas as penicilinas, possui baixa incidência de efeitos tóxicos diretos. E como principais efeitos adversos pode apresentar reações de hipersensibilidade, erupções cutâneas e em casos muito raros choque anafilático (Kuriyama et al., 2007; Andrade, 2014).

As taxas crescentes de resistência à esse antimicrobiano diminuiram a sua utilidade, o que implica em uma falência clínica em alguns casos em que há a presença de bactérias resistentes às infecções dentárias. A resistência bacteriana a esta classe de agentes é obtida predominantemente através da produção de beta-lactamases (Heimdahl et al., 1980; Kuriyama et al., 2007).

Figura 2.4 Molécula de Amoxicilina

2.6.2 Azitromicina

A azitromicina é um antibiótico inovador do grupo dos macrolídeos, que difere do grupo por possuir um átomo de nitrogênio no anel lactônico de 15 átomos, isso permite que a azitromicina alcance maiores concentrações nos tecidos infectados. Os macrolídeos funcionam inibindo a síntese protéica bacteriana. Dependendo da sua ação funcionam como bactericidas ou bacteriostáticos (Duran; Amsden, 2000; Andrade, 2014).

Além disso, possuem o espectro de ação semelhante ao das penicilinas pois atingem cocos gram-positivos e cocos e bacilos gram-negativos, diferindo apenas na potência contra alguns microrganismos. Apresenta meia vida biológica prolongada em nível tecidual e é considerada uma alternativa segura e efetiva para pacientes sensíveis à penicilinas. Porém pode apresentar como efeitos adversos distúrbios gastrointestinais (Andrade, 2014).

Com base no seu espectro de ação, a falta de efeitos colaterais, a possibilidade de um regime de dose única, a azitromicina tem sido muito utilizada (Duran; Amsden, 2000).

É um antibiótico que tem sido prescrito para o tratamento das infecções odontogênicas e vem apresentando bons resultados terapêuticos em termos de eficácia e tolerabilidade, sendo também indicada para pacientes alérgicos às penicilinas (Park et al., 2017).

Figura 2.5 Molécula de Azitromicina

2.6.3 Clindamicina

É um antibiótico do grupo das lincosaminas, sendo o único antimicrobiano do grupo das lincosaminas que possui indicação em Odontologia. A lincomicina foi isolada em 1962, a partir do *Streptomyces lincolmsis*. Posteriormente, modificações químicas produziram a clindamicina com potência bacteriana aumentada e melhor absorção oral. Além de ser bem absorvida por via oral, é uma molécula que atravessa facilmente as barreiras teciduais. Seu mecanismo de ação é semelhante ao dos macrolídeos, inibindo a síntese protéica bacteriana (Andrade, 2014).

Possui amplo espectro de ação semelhante ao das penicilinas, com a diferença que atingem o *Stafilococcus aureus* e outras bactérias produtoras de penicilinas. Também possui resistência à degradação da beta-lactamase. Devido a essas características, é um antibiótico utilizado como substituto para pacientes alérgicos às penicilinas (Andrade, 2014; Jepsen; Jepsen, 2016).

É uma molécula primariamente bacteriostática, porém, em altas concentrações pode ser bactericida. Seu efeito adverso mais comum é a diarreia (Rocha, 2013; Andrade, 2014).

Sua molécula apresenta alto peso molecular e é facilmente degradada dependendo da temperatura e do pH do meio aquoso (Calderó et al., 2010).

É um antibiótico frequentemente utilizado em diferentes formas de aplicação local para o tratamento de infecções do tecido ósseo (Naal et al., 2008; Uskoković et al., 2013; Jepsen; Jepsen, 2016)

Figura 2.6 Molécula de Clindamicina

2.6.4 Metronidazol

O Metronidazol é um composto sintético, considerado um quimioterápico, pois não tem origem através de microorganismos. É considerado bactericida. Seu espectro de ação mostra que é um ativo contra praticamente todos os bacilos anaeróbios gram-negativos. E tem mostrado excelente resultados nas infecções periodontais. É muito bem absorvida por via oral, atravessando as barreiras teciduais rapidamente e em grandes concentrações, sendo distribuído na saliva e no fluido gengival (Andrade, 2014).

Em odontologia, é um antimicrobiano muito usado nos tratamentos periodontais, e muitas vezes é utilizado em associação com a amoxicilina (Teughels et al., 2014; Jepsen; Jepsen, 2016).

Figura 2.7 Molécula de Metronidazol

2.7 ASSOCIAÇÃO POLÍMERO (PLLA) E ANTIMICROBIANOS

O desenvolvimento de uma nova classe de materiais que fornece liberação local de fármaco é um dos desafios atuais no campo biomédico (Lyutakov et al., 2015). Essa liberação localizada de um agente antibacteriano no sítio cirúrgico, pode fornecer um tratamento direcionado para a infecção. (Yazdimamaghani et al., 2014).

Como um potencial sistema de administração de fármacos, o uso de biomateriais poliméricos, como o PLLA, em associação com antimicrobianos tem sido estudado (Kankilic et al., 2014; Wu et al., 2014; Zhang et al., 2015).

Esses dispositivos de PLLA incorporados com antimicrobianos funcionam como carreadores farmacológicos e possuem algumas finalidades e vantagens. As principais vantagens dos sistemas de administração de fármacos incluem uma liberação controlada de fármaco perto da área alvo que resulta na possibilidade de atingir a concentração necessária do fármaco no sítio desejado e no momento adequado, permitem uma diminuição significativa do tempo de exposição, reduzindo o risco de toxicidade causado por concentrações de pico, reduz o risco de resistência bacteriana devido a níveis constantes de fármaco, prolonga a eficácia e diminui possíveis efeitos colaterais (Yang et al., 2008; Zupancic et al., 2016). Além disso, esse sistema de administração melhora a adesão do paciente devido à não necessidade de um regime diário de comprimidos.

Visto isso, o uso de um sistema de liberação local em odontologia, que permita manter a concentração do fármaco no sítio desejado demonstrando melhor efetividade em relação ao uso de antimicrobianos sistêmicos, aumentando a eficácia

clínica, diminuindo efeitos tóxicos e indesejáveis, combatendo a seleção bacteriana, que possa ser utilizado como auxílio terapêutico de doenças e traumas, que não precise de um segundo procedimento cirúrgico para sua remoção, que estimule a formação óssea e regenere defeitos ósseos, guiando a adesão e proliferação celular é desejável (Liu et al., 2004; Nair; Laurencin, 2007; Qi et al., 2013; Lafzi et al., 2016;).

Porém, sabemos que as características químicas do fármaco interferem na solução polimérica, e consequentemente nas condições do polímero obtido. Por isso, há a necessidade de testar todos os dispositivos incorporados com os antimicrobianos escolhidos analisando sua biocompatibilidade e citotoxicidade *in vitro* para posterior testes *in vivo*.

3 PROPOSIÇÃO

Desenvolver e analisar a estrutura de dispositivos que associam o polímero poli(L-lactídeo) com a incorporação de quatro antimicrobianos: Amoxicilina ou Azitromicina ou Clindamicina ou Metronidazol para uso local *in vitro* e sua citotoxicidade em osteoblastos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

O estudo foi realizado *in vitro* com 270 matrizes poliméricas de poli(L-lactídeo) (PLLA) no formato de discos de 6 mm de diâmetro em associação com o antimicrobiano de escolha na concentração de 20% (Amoxicilina ou Azitromicina ou Clindamicina ou Metronidazol) ou apenas o polímero sem associação do antimicrobiano para efeito de comparação.

Os dispositivos foram preparados de duas maneiras diferentes:

A- *Filmes confeccionados por deposição*

B- *Malhas confeccionadas por eletrofiação*

Os grupos foram estudados de acordo com o quadro 4.1.

Quadro 4.1 - Nomeação dos dispositivos confeccionados

DISPOSITIVOS POLIMÉRICOS	
FILMES (Deposição)	MALHAS (Eletrofiação)
AM = Amoxicilina + PLLA	AM = Amoxicilina + PLLA
AZ = Azitromicina + PLLA	AZ = Azitromicina + PLLA
CL = Clindamicina + PLLA	CL = Clindamicina + PLLA
ME = Metronidazol + PLLA	ME = Metronidazol + PLLA
PO = Polímero (PLLA)	PO = Polímero (PLLA)

A citotoxicidade dos dispositivos poliméricos foi avaliada através do teste de citotoxicidade direta (MTT) em Osteoblastos, sendo o teste realizado em triplicata com n=3 para cada tipo de amostra em cada tempo experimental (24, 48 ou 72h), sendo utilizados 270 dispositivos poliméricos.

A análise estrutural foi feita de diferentes formas:

Foram realizadas fotografias digitais para visualização macroscópica e caracterização das amostras de acordo com o formato utilizado, coloração e aspectos macro dos dispositivos poliméricos.

Enquanto para análise dos aspectos estruturais microscópios das amostras e análise de adesão dos osteoblastos aos dispositivos poliméricos foram feitas imagens em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).

4.2. MÉTODOS

A metodologia seguiu a seguinte ordem para compreensão: confecção dos dispositivos poliméricos; cultura de osteoblastos; citotoxicidade direta; análise estatística; análise estrutural.

4.2.1 Confecção dos dispositivos poliméricos

Os dispositivos poliméricos foram confeccionados através de dois métodos: deposição (filmes) e eletrofição (malha). A confecção desses dispositivos seguiu as metodologias descritas abaixo:

A- Filmes confeccionados por deposição

Uma solução de PLLA 5% diluído em clorofórmio foi preparada. Após completa diluição do polímero no solvente foi adicionado o fármaco de escolha (amoxicilina ou azitromicina ou clindamicina ou metronidazol) sendo definida a concentração padrão como 20% de fármaco em relação à massa de PLLA. Estas soluções foram mantidas sob agitação mecânica até a obtenção de soluções homogêneas.

As soluções homogêneas foram vertidas em placas de petri de vidro e, posteriormente mantidas a temperatura ambiente em capela de fluxo laminar até a completa evaporação do solvente. Passadas 24 horas, os materiais de aparência seca foram colocados em dessecador a vácuo para eliminação de qualquer vestígio de solvente. Após completa eliminação de solvente os dispositivos poliméricos (filmes) com ou sem antimicrobianos foram cortados em discos padrão de 6mm para os testes celulares.

B- Malhas confeccionadas por eletrofiação

Foi preparada uma solução de PLLA 5% em peso, diluída em clorofórmio e dimetilformamida (9:1). A esta solução foi adicionado o fármaco de escolha a 20% de concentração (relativo à massa de PLLA), e mantido sobre agitação mecânica para obtenção de uma solução homogênea que foi submetida à eletrofiação. Para eletrofiação foi utilizada agulha de 0,584 mm de diâmetro e seringa com volume efetivo de 5 mL. Foi adotada uma voltagem de 25 kV e velocidade de alimentação de 4mL/h com distância de trabalho de 18 cm. A malha eletrofiada foi colocada em dessecador à vácuo para eliminar qualquer vestígio de solvente. A malha obtida foi cortada de forma a se obter um bloco com diâmetro de 6 mm.

4.2.2 Cultura de osteoblastos

Utilizamos linhagem imortalizada de osteoblastos de camundongos (MC3T3-E1) cultivadas no Laboratório de Biologia Oral da FOUSP devidamente aprovado na Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – solicitação do pedido de isenção (anexo A).

Os osteoblastos congelados foram mantidos em freezer à temperatura de - 80°C. Para o descongelamento do vial contendo as células utilizamos o meio de cultura MEM- α (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA) suplementado com 10%

de soro fetal bovino (Invitrogen, Burlington, ON, Canadá) e 1% do antibiótico estreptomicina (Sigma®). Após o descongelamento os osteoblastos foram transferidos para garrafas pequenas (25cm²) e foram adicionados 5mL de meio de cultura MEM- α , suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução antimicrobiana estreptomicina o qual foi devidamente trocado a cada 2-3 dias. Todos os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar para manutenção da esterilidade dos materiais e das substâncias utilizadas para o cultivo celular.

As células foram mantidas em estufa a 37°C, em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de dióxido de carbono. A progressão da cultura foi avaliada por microscópio invertido ZeissAxiovert 40 CFL. Após atingirem a subconfluência, as células foram removidas da garrafa de plástico para cultivo celular de 25cm² com auxílio de tripsina a 0,25% para que as células se soltem da garrafa e foram colocadas em tubo cônico de 50mL onde adicionamos mais 7,5mL de meio de cultura MEM- α e a solução foi submetida à centrifugação por 3 minutos. Observando-se o pellet encontrado ao fundo do tubo cônico o líquido contendo tripsina foi sugado e o pellet anteriormente mantido foi ressuspensionado em 10mL de meio de cultura MEM- α . Posteriormente as células viáveis foram submetidas à contagem por ensaio com azul de metileno, com auxílio de um hemocítômetro, em microscópio invertido ZeissAxiovert 40 CFL. Posteriormente, as células foram plaqueadas na densidade de ~ 110 células/mm² em placas de 96 poços A/2 (Corning®), onde já havíamos adicionado os dispositivos poliméricos incorporados com antimicrobianos, e foi adicionado mais 100 μ L de meio de cultura MEM- α em cada poço. As placas foram armazenadas em estufa à 37°C enquanto aguardamos as análises de citotoxicidade de 24, 48 e 72 horas.

4.2.3 Citotoxicidade Direta em Osteoblastos

Foi realizado o teste de citotoxicidade direta (MTT) para análise da viabilidade celular nos poços onde foram colocados os dispositivos poliméricos confeccionados como malhas e filmes. Para controle, utilizamos poços onde só foram adicionadas as células (controle de vida - controle positivo) e poços onde foram adicionadas células

e fenol a 1% (controle de morte - controle negativo). Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços A/2 (Corning®). As células foram depositadas sobre os materiais em estudo e mantidas em condições favoráveis para o seu desenvolvimento. As análises foram feitas com 24, 48 e 72 horas após o plaqueamento e todas as amostras foram devidamente armazenados em estufa, a 37°C, com atmosfera úmida contendo 95% de O₂ e 5% de CO₂.

Transcorridos os tempos experimentais, as placas foram preparadas para a reação de citotoxicidade: O meio de cultura foi removido de todos os poços com as amostras e dos poços de controle de vida e controle de morte e cada poço foi lavado com 100 µL de solução tampão PBS estéril (0,1M). Na sequência, após a remoção do PSB estéril foram adicionados 100 µL de MTT em cada poço em que haviam os dispositivos poliméricos e nos poços de controle de vida, já nos poços para controle de morte adicionamos fenol a 1%. A placa após colocação de MTT e fenol foi armazenada em estufa a 37°C por 3 horas. Após incubação, o MTT foi removido e foi adicionado em todos os poços 100 µL de dimetilsulfóxido estéril (DMSO) em temperatura ambiente, mantendo sob vibração por 5 minutos, a fim de promover a dissolução dos cristais de coloração azul/violeta resultantes da clivagem dos anéis de tetrazólio do MTT. Esta clivagem é promovida pela enzima succinato-desidrogenase (SDH), produzida por mitocôndrias ativas (Mosmann et al., 1983). Desta maneira, a solução do MTT, antes, com coloração amarela, na presença da atividade mitocondrial, adquirirá coloração violeta. As soluções obtidas foram transferidas para novos poços, onde os dispositivos não estavam presentes para que não houvesse interferência na leitura da viabilidade. Para realizar o controle do branco, como referência para a leitura no espectrofotômetro, três poços foram reservados e preenchidos com DMSO.

A densidade óptica do complexo colorido formado foi lida por espectrofotômetro de placa de ELISA (ELX 800 – Universal Microplate Reader – Bio-Tek Instruments, ICC, USA), com o comprimento de onda de 540 nm. A partir da graduação colorimétrica representada pelas absorbâncias, após extrair o valor de referência do branco, as aferições foram registradas, possibilitando comparar a viabilidade celular em cada amostra com os controles. Os experimentos foram realizados em triplicata com n=3 para cada tipo de amostra para cada tempo experimental de 24,48 e 72h, sendo utilizados 270 dispositivos poliméricos.

4.2.4 Análise Estatística

A análise estatística do presente estudo foi realizada com o auxílio do programa GraphPad Prism 6. Primeiramente, todos os dados foram submetidos a análise de normalidade pelo teste de Lilliefors. Em vista da necessidade do uso de um teste de comparação de médias não paramétrico o teste de Kruskal-Wallis com nível de significância de 5% foi realizado ($p < 0,05$).

4.2.5 Análise estrutural

4.2.5.1 Fotografia

Através da câmera Canon Rebel XSi com lente macro Canon de 100mm foram registradas fotografias digitais de todos os dispositivos poliméricos confeccionados e já devidamente cortados com punch estéril de 10mm de diâmetro para padronização, afim de mostrar os aspecto e diferença de coloração das amostras.

4.2.5.2 Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

4.2.5.2.1 Análise estrutural dos dispositivos e Adesão celular

A análise da Microscopia Eletrônica de Varredura permite caracterizar o material de acordo com seus aspectos morfológicos, relacionando o processo de preparação com a estrutura-morfologia e conseqüentemente a biofuncionalidade. Para a análise estrutural, os dispositivos malhas e filmes foram submetidos à análise em MEV.

Os dispositivos foram analisados através de amostras que não foram colocadas em contato com osteoblastos e amostras com a presença de células de osteoblastos (plaqueadas em ~ 110 células/mm²). As amostras foram preparadas para leitura em Microscópio da seguinte maneira: foram lavadas duas vezes por 5 minutos em tampão cacodilato 0,05M e posteriormente fixadas em glutaraldeído a 2% em tampão cacodilato de sódio 0,1M – pH 7,2 por 20 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente lavamos mais uma vez por 5 minutos em tampão cacodilato 0,05M e procedemos para a desidratação com etanol em concentrações crescentes. Posteriormente, adicionamos hexametildisilazano (HMDS) por 10 minutos e as amostras foram colocadas em uma capela com sistema exaustor, para promover a desumidificação das amostras. Posteriormente as amostras foram montadas em suportes de alumínio (stubs) e mantidas em estufa a 37°C até o recobrimento por ouro para leitura em microscópio onde observamos a morfologia e adesão celular. O recobrimento com ouro ocorreu em aparelho Bal-tec SDC 050 (OerlikonBalzers, Liechtenstein) por 70 segundos no Laboratório de Biologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo - FOUSP. Posteriormente as amostras foram analisadas e fotografadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (Neoscope) operando a 10kV ou em Microscópio Eletrônico de Varredura (FEG) operando a 5kv na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo - IQUSP. Utilizamos imagens com aumento de 500x e 1000x.

4.2.5.2.2 Criofratura

Para averiguar a fratura da estrutura do polímero incorporado ao fármaco de escolha foram realizadas as criofraturas. Os dispositivos foram cortados com punch estéril utilizando-se como padrão o diâmetro de 10mm e consequentemente submetidas ao congelamento em nitrogênio a -196°C e posteriormente as amostras foram fraturadas com o auxílio de duas pinças Kelly padrão de 10cm. As amostras após a fratura foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) obtendo-se imagens de alta resolução da superfície da amostra. As imagens foram obtidas com o Microscópio Eletrônico de Varredura (FEG) na Central Analítica do

Instituto de Química da Universidade de São Paulo – IQUSP, operando a 3kv, com aumento de 1000x.

4.2.5.2.3 Diâmetro das fibras poliméricas (Malhas)

Através do programa ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA, version 1.51m9) realizou-se a medida dos diâmetros das fibras poliméricas, as quais foram realizadas através de fotos obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).

4.3 FLUXOGRAMA

5 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados seguindo a ordem: Citotoxicidade em osteoblastos e análise estrutural (fotografia, MEV, criofratura e diâmetro das fibras poliméricas)

5.1 CITOTOXICIDADE EM OSTEOLASTOS

5.1.1 Reação MTT em Filmes 24h

Em 24 horas de experimento, analisando-se filmes, pudemos observar que houve maior viabilidade celular nos poços contendo os dispositivos incorporados com fármacos (AM, AZ, CL, ME) e nos poços de PO em relação ao controle positivo (CV), enquanto a viabilidade do controle negativo (CM) tendeu a zero (Gráfico 5.1 e Tabela 5.1).

Em relação ao PO, as amostras de AM e AZ apresentaram viabilidade celular ligeiramente superior enquanto as amostras de CL e ME apresentaram valores inferiores (Gráfico 5.1 e Tabela 5.1) .

Houve diferença estatística nas amostras de AM, AZ, ME e PO em relação ao CM (Gráfico 5.1).

Assim, não houve citotoxicidade dos dispositivos confeccionados com antimicrobianos na forma de filmes nas primeiras 24h do experimento.

Gráfico 5.1 Reação MTT em Filmes com 24h experimentais

Tabela 5.1 Média e desvio padrão das amostras de Filmes 24h

FILME 24h	AM	AZ	CL	ME	PO	CV	CM
Média	0,05389	0,06189	0,03444	0,04478	0,05367	0,02778	0,000778
DesvPad	0,05719	0,05084	0,03856	0,04407	0,06043	0,02751	0,001641

5.1.2 Reação MTT em Filmes 48h

Não houve citotoxicidade em osteoblastos transcendidas às 48h de experimento uma vez que houve proliferação celular em todos os poços, sendo que os poços com os dispositivos AM, AZ, CL, ME e PO apresentaram viabilidade celular superior ao controle de vida (CV) (Gráfico 5.2 e a Tabela 5.2).

As amostras de PO apresentaram viabilidade celular superior ao dispositivo de AM, mas abaixo das amostras de AZ, CL e ME (Gráfico 5.2 e a Tabela 5.2).

A diferença estatística pode ser observada entre o CM com os poços de AM, AZ, CL, ME e PO (Gráfico 5.2).

Gráfico 5.2 - Reação MTT em Filmes com 48h experimentais

Tabela 5.2 Média e desvio padrão das amostras de Filmes 48h

FILME 48h	AM	AZ	CL	ME	PO	CV	CM
Média	0,04489	0,05733	0,06733	0,06956	0,05378	0,02433	0,001333
DesvPad	0,03725	0,03141	0,05524	0,04706	0,02033	0,02749	0,001803

5.1.3 Reação MTT em Filmes 72h

Em 72h de experimento, observamos que as amostras de filmes de AZ, CL, ME e PO apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao CM (Gráfico 5.3).

Diferentemente dos outros dois tempos experimentais para filmes (Gráfico 5.1, Tabela 5.1, Gráfico 5.2 e Tabela 5.2) podemos notar que nesse momento do experimento o CV foi ligeiramente superior à viabilidade da AM (Gráfico 5.3 e Tabela 5.3).

Ainda assim, não houve citotoxicidade em osteoblastos demonstrando sua proliferação nas condições expostas em 72h de experimento.

Gráfico 5.3 Reação MTT em Filmes com 72h experimentais

Tabela 5.3 Média e desvio padrão das amostras de Filmes 72h

FILME 72h	AM	AZ	CL	ME	PO	CV	CM
Média	0,04078	0,08233	0,06633	0,05822	0,06589	0,04289	0,001111
DesvPad	0,02662	0,04834	0,04991	0,04071	0,03553	0,03848	0,0019

5.1.4 Reação MTT em Malhas 24h

Seguindo-se o mesmo raciocínio, para malhas em 24h de experimento foi possível notar que nos poços contendo os dispositivos AM, AZ, CL, ME e PO os osteoblastos tiveram uma proliferação superior em relação ao CV (Gráfico 5.4 e Tabela 5.4). AM, AZ, CL, ME e PO apresentaram diferença estatística com o CM que assim como nos experimentos anteriores (filmes) tendeu a zero (Gráfico 5.4).

Em relação ao PO, comparando-se com as amostras incorporadas com antimicrobianos, apenas as amostras de AM apresentaram viabilidade celular levemente inferior ao polímero puro (Gráfico 5.4 e Tabela 5.4).

Devido à viabilidade celular positiva, é possível inferir que não houve citotoxicidade dos dispositivos em 24h de experimento para malhas.

Gráfico 5.4 Reação MTT em Malhas com 24h experimentais

Tabela 5.4 Média e desvio padrão das amostras de Malhas 24h

MALHA 24h	AM	AZ	CL	ME	PO	CV	CM
Média	0,06356	0,09689	0,08211	0,09356	0,06689	0,03467	0,001667
DesvPad	0,0473	0,05217	0,05235	0,07158	0,05278	0,02949	0,002121

5.1.5 Reação MTT em Malhas 48h

Nesse momento do estudo, todas as malhas confeccionadas (AM, AZ, CL, ME e PO) apresentaram-se com a viabilidade celular acima do CV e CM (Gráfico 5.5 e Tabela 5.5).

As amostras de AZ, CL, ME e PO apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao CM (Gráfico 5.5).

Apenas as amostras de AZ e CL obtiveram viabilidade celular acima do PO (Gráfico 5.5 e Tabela 5.5).

Mesmo assim, todos os poços com os dispositivos confeccionados apresentaram viabilidade celular demonstrando que não houve citotoxicidade em células de osteoblastos em 24h de experimento.

Gráfico 5.5 Reação MTT em Malhas com 48h experimentais

Tabela 5.5. Média e desvio padrão das amostras de Malhas 48h

MALHA 48h	AM	AZ	CL	ME	PO	CV	CM
Média	0,032	0,09956	0,07856	0,05722	0,06289	0,026	0,000667
DesvPad	0,03527	0,04747	0,04154	0,03563	0,02699	0,01531	0,001414

5.1.6 Reação MTT em Malhas 72h

Por fim, podemos observar que as amostras de AM apresentaram estagnação do número de células viáveis em relação ao experimento anterior (malhas 48h) (Tabela 5.5 e Tabela 5.6). Já as outras amostras incorporadas com fármacos (AZ, CL e ME) e as amostras de PO apresentaram viabilidade celular superior ao

experimento de 48h, demonstrando que as células continuaram a se proliferar (Gráfico 5.5 e Gráfico 5.6/ Tabela 5.5 e Tabela 5.6).

Os poços de AZ, CL, ME e PO apresentaram viabilidade celular superior ao CV e diferença estatística com o CM (Gráfico 5.6 e Tabela 5.6).

Mesmo com a estagnação da amostra de AM é possível notar que não houve citotoxicidade nas amostras de 72h para malhas.

Gráfico 5.6 Reação MTT em Malhas com 72h experimentais

Tabela 5.6. Média e desvio padrão das amostras de Malhas 72h

MALHA 72h	AM	AZ	CL	ME	PO	CV	CM
Média	0,032	0,111	0,1011	0,085	0,08233	0,05711	0,001333
DesvPad	0,03843	0,04788	0,05498	0,04839	0,05714	0,04368	0,002693

Diante do exposto, é possível afirmar que os dispositivos poliméricos incorporados com os antimicrobianos estudados não apresentaram citotoxicidade em osteoblastos em nenhum momento do estudo, o que pode ser observado nos Gráficos 5.7 e 5.8.

5.1.7 Reação MTT em todos os períodos em Filmes e Malhas

Gráfico 5.7 Reação MTT em Filmes nos tempos de 24, 48 e 72h

Gráfico 5.8 Reação MTT em Malhas nos tempos de 24, 48 e 72h

5.2 ANÁLISE ESTRUTURAL

5.2.1 Fotografia

Os filmes apresentaram diferenças na coloração sendo o de AM o mais esbranquiçado e denso (Figura 5.1 - 1a) enquanto os de AZ (Figura 5.1 – 2a) e PLLA (Figura 5.1 – 5a) apresentaram-se totalmente translúcidos, os de CL (Figura 5.1 – 3a) semi translúcidos e os de ME (Figura 5.1 – 4a) apresentaram algumas granulações ao aspecto visual.

Enquanto as estruturas eletrofiadas (malhas) apresentaram-se todas com aparência semelhante, de cor esbranquiçada ao teste visual enquanto na manipulação tátil todas apresentaram aspecto de algodão (Figura 5.1 – 1b; 2b; 3b; 4b; 5b).

Figura 5.1 Fotografia de Filmes e Malhas (sequência “a” representa os filmes enquanto a “b” as malhas. Sendo: 1=AM; 2= AZ; 3=CL; 4=ME; 5 = PLLA)

5.2.2 Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

5.2.2.1 Amoxicilina

Observando-se os dispositivos incorporados com Amoxicilina pudemos perceber que os filmes AM apresentaram aspecto irregular com a presença de porosidades (poros menores que 10 μm) (Figura 5.2A). Enquanto nos dispositivos que foram colocados em contato com osteoblastos foram encontradas células isoladas com alterações morfológicas, apresentando-se comprimidas e com tamanho menor que 20 μm (Figura 5.2B). Na criofratura de filmes de AM foi possível notar que o dispositivo não apresentou uma interface homogênea, com a presença de depressões (Figura 5.2C).

Quanto às malhas de AM, pudemos observar que as fibras formadas possuem aspecto fino (Figura 5.3A). Essas malhas, ao serem colocadas em contato com as células apresentaram aderência dos osteoblastos, os quais foram encontrados em grupos interligados por seus prolongamentos e se dispuseram entre as fibras das malhas de AM (Figura 5.3B).

Figura 5.2 Amoxicilina filme (A = AM; B =AM + osteoblastos; C = criofratura AM)

Figura 5.3 Amoxicilina malha (A = AM; B = AM + osteoblasto)

5.2.2.2 Azitromicina

Após a observação dos filmes de AZ, podemos ressaltar que esses apresentaram a superfície parcialmente lisa com a presença de granulações menores que 10 µm (Figura 5.4A). A análise em aumento de 500x revelou a presença de osteoblastos, onde as células foram encontradas em grupos de 4-5 osteoblastos conectados por meio de seus prolongamentos (Figura 5.4B). Quanto à criofratura (Figura 5.4C), o filme apresentou uma constituição mais homogênea.

As malhas de AZ apresentaram fibras espaçadas e dispostas em várias direções (Figura 5.5A). A presença de osteoblastos não foi observada em malhas de AZ.

Figura 5.4 Azitromicina filme (A= AZ; B= AZ + osteoblastos; C= criofratura AZ)

Figura 5.5 Azitromicina malha (A= AZ)

5.2.2.3 Clindamicina

Analisando-se os filmes de CL pudemos observar que suas superfícies apresentaram-se ásperas (Figura 5.6A). Houve adesão e proliferação de células osteoblásticas que se apresentaram em grupos de 2-3 células interligadas por seus prolongamentos ou foram encontradas células isoladas (Figura 5.6B). Em relação à criofratura, em um aumento de 1000x pudemos observar a formação de irregularidades na interface do dispositivo (Figura 5.6C).

Quanto às malhas de CL, foi possível notar que as fibras poliméricas apresentaram-se dispostas em várias direções, com fibras apresentando diâmetro menor que 10 μm (Figura 5.7A). Não houve adesão de osteoblastos em malhas de CL.

Figura 5.6. Clindamicina filme (A= CL; B= CL +osteoblastos; C= criofratura CL)

Figura 5.7 Clindamicina malha (A= CL)

5.2.2.4 Metronidazol

Os filmes de ME apresentaram superfície áspera (Figura 5.8A). Essa superfície em contato com osteoblastos mostrou aderência e proliferação dos mesmos que foram encontrados em grupos de 5-6 células conectadas por seus prolongamentos (Figura 5.8B). Na criofratura (Figura 5.8C) foi possível observar que a estrutura apresentou irregularidades na sua interface.

Nas malhas de ME, notamos que as fibras poliméricas não se apresentam tão espaçadas (Figura 5.9A) sendo que poucos osteoblastos foram encontrados aderidos às fibras (grupos de 2 osteoblastos) com alterações morfológicas (Figura 5.9B).

Figura 5.8 Metronidazol filme (A=ME; B= ME + osteoblastos; C= criofratura ME)

Figura 5.9 Metronidazol malha (A= ME; B= ME + osteoblastos)

5.2.2.5 PLLA

Os filmes de PLLA possuem a superfície mais lisa dentre os dispositivos confeccionados (Figura 5.10A). Foi possível visualizar a presença de osteoblastos que se apresentaram em grupos de 2-3 células (Figura 5.10B). Quanto à criofratura, os filmes de PLLA apresentaram uma interface lisa sem apresentar segregação de fases (Figura 5.10C).

Em relação às malhas de PLLA, pudemos notar que as fibras desse dispositivo apresentaram-se dispostas em várias direções (Figura 5.11A). Foram observados

osteoblastos nessas amostras, onde as células se aderiram à superfície formando um aglomerado (Figura 5.11B).

Figura 5.10 PLLA filme (A= PLLA; B= PLLA + osteoblastos; C= criofratura PLLA)

Figura 5.11 PLLA malha (A= PLLA; B= PLLA + osteoblastos)

Diante do exposto nas figuras anteriores, podemos ressaltar que apenas filmes apresentaram uma superfície condizente com a criofratura, uma vez que as malhas possuem alta flexibilidade e maleabilidade o que não permitiu que a estrutura se enrijecesse para posterior fratura.

Não foram encontrados osteoblastos apenas nos dispositivos de AZ malha e CL malha.

5.2.3 Diâmetro das fibras poliméricas (malhas)

As imagens obtidas no MEV foram essenciais para que o diâmetro médio das fibras pudesse ser mensurado. As fibras foram medidas em micrômetros (μm) e através da Tabela 5.7 podemos observar que as fibras de AM apresentaram o menor diâmetro, enquanto as fibras de ME apresentaram diâmetros maiores, tendo aproximadamente o diâmetro quase duas vezes maior que as fibras de AM.

Tabela 5.7. Diâmetro das fibras poliméricas (μm)

Fibra (μm)	AM	AZ	CL	ME	PO
1	1,94	2,77	2,44	3,68	2,89
2	1,21	2,31	3,05	3,48	1,92
3	1,12	2,07	3,68	2,23	2,37
4	1,3	2,44	2,73	3,44	3,01
5	1,86	2,35	3,17	3,29	1,95
6	1,05	1,98	3,28	2,35	2,78
7	1,77	2,86	2,53	2,46	2,31
8	1,54	2,31	3,4	3,58	2,66
9	1,33	1,97	3,03	3,12	2,43
10	1,14	2,43	3,21	3,66	2,54
11	1,98	2,91	2,87	3,54	1,89
12	1,46	2,12	3,04	2,77	1,98
13	1,76	1,86	2,99	2,63	2,37
13	1,65	2,24	2,97	3,01	2,53
14	2,02	2,32	3,58	3,5	2,66
15	1,23	2,69	3,44	3,43	1,87
Média	1,52	2,35	3,08	3,13	2,38
DesvPad	0,33	0,32	0,34	0,49	0,37

6 DISCUSSÃO

As técnicas utilizadas na engenharia tecidual são aplicadas para as diversas especialidades odontológicas e requerem o uso de materiais com grande afinidade ao tecido ósseo. Desta forma, mesmo que evidenciado pela literatura a biocompatibilidade e boa adsorção do PLLA, este estudo procurou demonstrar se a inclusão dos antimicrobianos no corpo polimérico interferiria na sua aplicação (Zeng et al., 2016; Chen et al., 2017).

O PLLA foi escolhido por sua funcionalidade como um substrato adequado para a cultura de osteoblastos (Sadaghi-Avalsharhr et al., 2016; Zeng et al., 2016). E sugerimos seu uso como um liberador farmacológico local, o que permitiria manter a concentração do fármaco no lugar específico, diminuindo efeitos adversos e minimizando a resistência bacteriana (Nair; Laurencin, 2007; Davachi et al., 2016).

Na literatura atual, autores descrevem o uso de PLLA na área de Odontologia, porém não foram encontrados estudos que se refiram a citotoxicidade em osteoblastos com o uso do PLLA para aplicações odontológicas. Sendo encontrados referências nas diversas áreas existentes que usam os termos PLLA ou poli(L-lactideo); e citotoxicidade ou MTT; e osteoblastos.

Dentre as evidências científicas encontradas, pudemos notar que os estudos obtiveram como resultado a não citotoxicidade em células de osteoblastos com o uso de PLLA independentemente se o estudo foi feito apenas com o PLLA (Wan et al., 2005; Feng et al., 2010) ou se também envolveu a adição de partículas ou substâncias ao polímero em questão (Marques et al., 2005; Wu et al., 2005; Sui et al., 2007; Chen et al., 2008; Chen et al., 2010; Li et al., 2010; Bernstein et al., 2012; Byeon et al., 2013; Guo et al., 2013; Shan et al., 2013; Cecen et al., 2015; Zeng et al., 2016; Sadighi-Avalsharhr et al., 2016) ou se o PLLA foi adicionado ou comparado com outros tipos de polímeros (Peng et al., 2009; Idris et al., 2010; Liu et al., 2010; Acharya et al., 2012; Sadiasa et al., 2014; Li et al., 2015; Qiao et al., 2016).

Alguns estudos também relataram a adesão de osteoblastos às superfícies de PLLA puro ou de PLLA incorporado com substâncias, demonstrando a funcionalidade desse tipo de polímero como matriz de suporte celular na cultura de osteoblastos por viabilizar a proliferação e aderência de células (Wan et al., 2005; Sui et al., 2007; Chen et al., 2008; Peng et al., 2009; Chen et al., 2010; Feng et al., 2010; Liu et al., 2010; Idris et al., 2010; Guo et al., 2013; Shamn et al., 2013; Sadiasa et al., 2014; Zeng et al., 2016; Sadaghi-Avalshahr et al., 2016).

Dentre os estudos que compararam o PLLA com adição de substâncias ou partículas ao PLLA puro, alguns autores sugeriram que devido a natureza hidrofóbica do PLLA a adição de certas partículas melhora a capacidade indutora do dispositivo ou podem melhorar suas propriedades mecânicas (Sui et al., 2007; Chen et al., 2008; Peng et al., 2009; Liu et al., 2010; Li et al., 2010; Bernstein et al., 2012; Byeon et al., 2013; Chen et al., 2017). Porém, sabemos que a incorporação de partículas, como fármacos, podem alterar as características desses dispositivos (Gao et al., 2006). Portanto, optamos por não adicionar outras partículas que poderiam modificar ainda mais o suporte e influenciar negativamente caso a interação do PLLA com os antimicrobianos não fosse adequada para a cultura de osteoblastos.

Ainda, não encontramos na literatura artigos de evidência científica que relacionem o uso de PLLA com os quatro antimicrobianos mais utilizados em Odontologia (Amoxicilina ou Azitromicina ou Clindamicina ou Metronidazol) na cultura de osteoblastos.

No entanto, quando procurados os antimicrobianos de escolha com seu uso em células de osteoblastos, encontramos algumas evidências com outros substratos:

Lee et al., 2013 utilizaram outro polímero, o PLGA, incorporado com Amoxicilina, e testaram na superfície de nanotubos de TiO_2 . Obtiveram resultados que indicaram que a superfície de nanotubos com solução de amoxicilina/PLGA poderia proporcionar um efeito bactericida elevado contra *S. aureus*, bem como uma boa proliferação de células de osteoblastos, devido ao dispositivo não apresentar toxicidade.

Enquanto Ferraz et al., 2007 testaram microesferas de amoxicilina para uso local em periodontia. O estudo mostrou que culturas de células de osteoblastos com as microesferas de hidroxiapatita, onde a amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico e eritromicina foram adsorvidas, apresentaram boas percentagens de células viáveis, não havendo citotoxicidade.

Uskoković et al., 2013 usaram compostos de clindamicina e do polímero poli(D,L-lactideo-co-glicólico) e não encontraram citotoxicidade em osteoblastos na incubação dos antibióticos com as células testadas.

Naal et al., (2008 constataram que a clindamicina em baixas concentrações (como antibiótico local) não tem efeitos deletérios sobre a proliferação e metabolismo de osteoblastos testados *in vitro*.

Todavia, Carnaval (2015) realizou um experimento com o uso de PLLA incorporado com os antimicrobianos Amoxicilina, Azitromicina, Clindamicina e Metronidazol testando-os na cultura de fibroblastos. Seus resultados mostraram que o perfil de liberação farmacológica foi influenciado pelas características de cada amostra confeccionada. Além disso, através da análise de citotoxicidade em fibroblastos constatou que esses dispositivos são compatíveis com a linhagem celular de fibroblastos.

Considerando-se todas essas evidências, desenvolvemos e analisamos a estrutura de filmes e malhas testando sua citotoxicidade em osteoblastos através do teste de citotoxicidade direta MTT (Mosmann, 1983; van Tonder et al., 2015). Após análise da citotoxicidade em 24, 48 e 72h esse estudo demonstrou não haver citotoxicidade em osteoblastos de dispositivos poliméricos de PLLA incorporados com os antimicrobianos escolhidos, sugerindo que esse dispositivo é apropriado para uso em defeitos ósseos.

Contudo, a diferença nas estruturas desses polímeros pode ter influenciado no número de células viáveis. Através das fotografias macroscópicas foi possível observar as características morfológicas desse biomaterial confeccionado. Porém, apenas com a análise estrutural em microscópio foi possível ter precisão quanto à superfície dessas estruturas e se houve adesão celular (Idris et al., 2010; Zeng et al., 2016).

Deste modo, por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), foi possível visualizar que a superfície formada de PLLA com a incorporação de antimicrobianos pode interferir na adesão de células de osteoblastos. Notamos que a adesão em filmes foi mais favorável em estruturas que apresetaram menos poros, mostrando que ocorreu melhor adesão em filmes lisos (PLLA e AZ) e ásperos (CL e ME). Enquanto para malhas, foi observada a presença de osteoblastos apenas em malhas de AM, ME e PLLA.

Entretanto, sabemos que vários fatores podem influenciar na espessura e morfologia das fibras das malhas (Frenot; Chronakis, 2003). Apesar das malhas terem sido confeccionadas seguindo-se o mesmo padrão de tensão aplicada, taxa de alimentação e distância entre a seringa e a placa coletora, as malhas de AM apresentaram um diâmetro mais fino que as demais amostras analisadas.

Sugere-se assim que devido ao menor diâmetro e espessamento das fibras de malhas de AM, as células de osteoblastos conseguiram penetrar entre as fibras desse dispositivo, o que não pode ser observado nas outras amostras. Em contrapartida, a citotoxicidade nesse dispositivo apresentou uma viabilidade celular abaixo do controle positivo (CV) em 72h de experimento e decrescente em relação à 24 e 48h indicando que devido à adesão entre as fibras os osteoblastos possivelmente ficaram aprisionados entre as tramas das malhas e não conseguiram se soltar para leitura correta da viabilidade, uma vez que os dispositivos não estavam presentes nos poços de leitura para analisar a citotoxicidade.

Consideramos, então, que os antimicrobianos estudados influenciaram na estrutura e no aspecto dos dispositivos criados e consequentemente na aderência e proliferação de células de osteoblastos.

Apesar dos filmes de azitromicina apresentarem viabilidade celular superior aos outros dispositivos, sugerimos que a escolha do dispositivo deve ser pautada na seleção da aplicabilidade clínica desejada, uma vez que todos os dispositivos não apresentaram citotoxicidade e estudos demonstram diferentes efetividades no uso desses medicamentos na área de Odontologia.

Portanto, sugere-se que todos os dispositivos confeccionados são inovadores na distribuição local de fármacos já consagrados para uso sistêmico, sendo bons

carreadores farmacológicos, devendo ser escolhidos de acordo com a aplicação clínica desejada. Porém, alguns dispositivos apresentaram melhor capacidade de viabilizar e auxiliar a proliferação e adesão de osteoblastos, enquanto outros possam precisar da incorporação de fatores que estimulem a adesão celular em PLLA, já que esse polímero é uma estrutura adequada aprovada pela *Food And Drug Administration (EUA)* para uso em fluidos e também se mostrou uma matriz de suporte celular adequada por não apresentar efeitos citotóxicos (Wan et al., 2005; Feng et al., 2010; Zeng et al., 2016).

7 CONCLUSÃO

Os dispositivos poliméricos incorporados com os antimicrobianos Amoxicilina, Azitromicina, Clindamicina e Metronidazol, confeccionados através de eletrofiação (malhas) e deposição (filmes) podem ser utilizados para auxiliar na reparação e regeneração do tecido ósseo uma vez que não apresentaram citotoxicidade em osteoblastos.

REFERÊNCIAS¹

- Acharya G, Hopkins RA, Lee CH. Advanced polymeric matrix for valvular complications. *J Biomed Mater Res A*. 2012 May;100(5):1151-9.
- Ahmad N, Saad N. Effects of antibiotics on dental implants: a review. *J Clin Med Res*. 2012 Feb;4(1):1-6.
- Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol*. 2010 Apr;8(4):260-71.
- Andersson DI, Hughes D. Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. *FEMS Microbiol Rev*. 2011 Sep;35(5):901-11.
- Andrade ED. Terapêutica medicamentosa em Odontologia. 4ªed. São Paulo: Editora Artes Médicas;2014.
- Arana-Chavez VE, Bradaschia V. Biologia celular e tecidual para odontologia moléculas, células e tecidos. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012.
- BaoLin G, MA PX. Synthetic biodegradable functional polymers for tissue engineering: a brief review. *Science China Chemistry*. 2014;57(4):490-500.
- Bernstein A, Tecklenburg K, Südkamp P, Mayr HO. Adhesion and proliferation of human osteoblast-like cells on different biodegradable implant materials used for graft fixation in ACL-reconstruction. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2012 Nov;132(11):1637-45.
- Bhardwaj N, Kundu SC. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol Adv*. 2010 May-Jun;28(3):325-47.
- Bui CH, Seldin EB, Dodson TB. Types, frequencies, and risk factors for complications after third molar extraction. *J Oral Maxillofac Surg*. 2003 Dec;61(12):1379-89
- Byeon JH, Kim SG, Son JS, Jin SC, Piao ZG, Lee SY, Jang ES, Kim JS, Jeong MA, Ahn H, Park JP. Enhanced attachment of human osteoblasts on NH3-treated poly(L-lactic acid) membranes for guided bone regeneration. *J Nanosci Nanotechnol*. 2013 Mar;13(3):1691-5.
- Calderó G, Llinàs M, García-Celma MJ, Solans C. Studies on controlled release of hydrophilic drugs from W/O high internal phase ratio emulsions. *J Pharm Sci*. 2010 Feb;99(2):701-11.
- Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Arch Biochem Biophys*. 2014 Nov 1;561:3-12.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Carnaval TG. Análise in vitro de um dispositivo polimérico como alternativa para uso de antimicrobiano sistêmico em Odontologia. [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2015.

Cecen B, Kozaci D, Yuksel M, Erdemli D, Bagriyanik A, Havitcioglu H. Biocompatibility of MG-63 cells on collagen, poly-L-lactic acid, hydroxyapatite scaffolds with different parameters. *J Appl Biomater Funct Mater*. 2015 Mar 18;13(1):10-6.

Chan HL, Lin GH, Suarez F, MacEachern M, Wang HL. Surgical management of peri-implantitis: a systematic review and meta-analysis of treatment outcomes. *J Periodontol*. 2014 Aug;85(8):1027-41.

Chen BQ, Kankala RK, Chen AZ, Yang DZ, Cheng XX, Jiang NN, Zhu K, Wang SB. Investigation of silk fibroin nanoparticle-decorated poly(L-lactic acid) composite scaffolds for osteoblast growth and differentiation. *Int J Nanomedicine*. 2017 Mar 8;12:1877-1890.

Chen Y, Mak AF, Wang M, Li JS, Wong MS. In vitro behavior of osteoblast-like cells on PLLA films with a biomimetic apatite or apatite/collagen composite coating. *J Mater Sci Mater Med*. 2008 Jun;19(6):2261-8.

Chen X, Li Y, Gu N. A novel basalt fiber-reinforced polylactic acid composite for hard tissue repair. *Biomed Mater*. 2010 Aug;5(4):044104.

Cope AL, Chestnutt IG. Inappropriate prescribing of antibiotics in primary dental care: reasons and resolutions. *Prim Dent J*. 2014 Nov;3(4):33-7.

Costelloe C, Metcalfe C, Lovering A, Mant D, Hay AD. Effect of antibiotic prescribing in primary care on antimicrobial resistance in individual patients: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2010 May 18;340:c2096.

Davachi SM, Kaffashi B, Zamanian A, Torabinejad B, Ziaeirad Z. Investigating composite systems based on poly L-lactide and poly L-lactide/triclosan nanoparticles for tissue engineering and medical applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016 Jan 1;58:294-309.

Drisko CL. Periodontal debridement: still the treatment of choice. *J Evid Based Dent Pract*. 2014 Jun;14 Suppl:33-41.e1.

Duran JM, Amsden GW. Azithromycin: indications for the future? *Expert Opin Pharmacother*. 2000 Mar;1(3):489-505. Review.

Esposito M, Coulthard P, Oliver R, Thomsen P, Worthington HV. Antibiotics to prevent complications following dental implant treatment. *Cochrane Database Syst Rev*. 2003;(3):CD004152. Review. Update in: *Cochrane Database Syst Rev*. 2008;(3):CD004152.

Feng SW, Lo YJ, Chang WJ, Lin CT, Lee SY, Abiko Y, Huang HM. Static magnetic field exposure promotes differentiation of osteoblastic cells grown on the surface of a poly-L-lactide substrate. *Med Biol Eng Comput*. 2010 Aug;48(8):793-8.

Feng X, McDonald JM. Disorders of bone remodeling. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:121-45.

Ferraz MP, Mateus AY, Sousa JC, Monteiro FJ. Nanohydroxyapatite microspheres as delivery system for antibiotics: release kinetics, antimicrobial activity, and interaction with osteoblasts. *J Biomed Mater Res A*. 2007 Jun 15;81(4):994-1004.

Filoché S, Wong L, Sissons CH. Oral biofilms: emerging concepts in microbial ecology. *J Dent Res*. 2010 Jan;89(1):8-18.

Frenot A, Chronakis IS. Polymer nanofibers assembled by electrospinning. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 2003; 8: 64–75

Gao Y, Weng W, Cheng K, Du P, Shen G, Han G, Guan B, Yan W. Preparation, characterization and cytocompatibility of porous ACP/PLLA composites. *J Biomed Mater Res A*. 2006 Oct;79(1):193-200.

Gould FK, Denning DW, Elliott TS, Foweraker J, Perry JD, Prendergast BD, Sandoe JA, Spry MJ, Watkin RW, Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. Guidelines for the diagnosis and antibiotic treatment of endocarditis in adults: a report of the Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. *J Antimicrob Chemother*. 2012 Feb;67(2):269-89.

Griffith LG. Polymeric biomaterials. *Acta Mater* 2000;48:263–7.

Groppa FC, Castro FM, Pacheco AB, Motta RH, Filho TR, Ramacciato JC, Florio FM, Meechan JG. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* and oral streptococci strains from high-risk endocarditis patients. *Gen Dent*. 2005 Nov-Dec;53(6):410-3.

Guo Q, Li X, Ding Q, Li D, Zhao Q, Xie P, Tang X, Luo F, Qian Z. Preparation and characterization of poly(pluronic-co-L-lactide) nanofibers for tissue engineering. *Int J Biol Macromol*. 2013 Jul;58:79-86.

Havard DB, Ray JM. How can we as dentists minimize our contribution to the problem of antibiotic resistance? *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2011 Nov;23(4):551-5, vi-vii.

He L, Liao S, Quan D, Ma K, Chan C, Ramakrishna S, Lu J. Synergistic effects of electrospun PLLA fiber dimension and pattern on neonatal mouse cerebellum C17.2 stem cells. *Acta Biomater*. 2010 Aug;6(8):2960-9.

Heimdahl A, von Konow L, Nord CE. Isolation of beta-lactamase-producing *Bacteroides* strains associated with clinical failures with penicillin treatment of human orofacial infections. *Arch Oral Biol*. 1980;25(10):689-92.

Horst OV, Chavez MG, Jheon AH, Desai T, Klein OD. Stem cell and biomaterials research in dental tissue engineering and regeneration. *Dent Clin North Am*. 2012 Jul;56(3):495-520.

Hou LT, Yan JJ, Tsai AY, Lao CS, Lin SJ, Liu CM. Polymer-assisted regeneration therapy with Atrisorb barriers in human periodontal intrabony defects. *J Clin Periodontol*. 2004 Jan;31(1):68-74.

Huh AJ, Kwon YJ. "Nanoantibiotics": a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *J Control Release*. 2011 Dec 10;156(2):128-45.

Idris SB, Arvidson K, Plikk P, Ibrahim S, Finne-Wistrand A, Albertsson AC, Bolstad AI, Mustafa K. Polyester copolymer scaffolds enhance expression of bone markers in osteoblast-like cells. *J Biomed Mater Res A*. 2010 Aug;94(2):631-9.

Jepsen K, Jepsen S. Antibiotics/antimicrobials: systemic and local administration in the therapy of mild to moderately advanced periodontitis. *Periodontol* 2000. 2016 Jun;71(1):82-112.

Kankilic B, Bilgic E, Korkusuz P, Korkusuz F. Vancomycin containing PLLA/ β -TCP controls experimental osteomyelitis *in vivo*. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. 2014;9:114.

Kempin W, Franz C, Koster LC, Schneider F, Bogdahn M, Weitschies W, Seidlitz A. Assessment of different polymers and drug loads for fused deposition modeling of drug loaded implants. *Eur J Pharm Biopharm*. 2017 Jun;115:84-93.

Kim JH, Kim K, Youn BU, Lee J, Kim I, Shin HI, Akiyama H, Choi Y, Kim N. Kruppel-like factor 4 attenuates osteoblast formation, function, and cross talk with osteoclasts. *J Cell Biol*. 2014 Mar 17;204(6):1063-74.

Kim JY, Cheon YH, Kwak SC, Baek JM, Yoon KH, Lee MS, Oh J. Emodin regulates bone remodeling by inhibiting osteoclastogenesis and stimulating osteoblast formation. *J Bone Miner Res*. 2014 Jul;29(7):1541-53.

Kim SE, Kim CS, Yun YP, Yang DH, Park K, Kim SE, Jeong CM, Huh JB. Improving osteoblast functions and bone formation upon BMP-2 immobilization on titanium modified with heparin. *Carbohydr Polym*. 2014 Dec 19;114:123-32.

Koseva NS, Rydz J, Stoyanova EV, Mitova VA. Hybrid protein-synthetic polymer nanoparticles for drug delivery. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2015;98:93-119.

Kuriyama T, Williams DW, Yanagisawa M, Iwahara K, Shimizu C, Nakagawa K, Yamamoto E, Karasawa T. Antimicrobial susceptibility of 800 anaerobic isolates from patients with dentoalveolar infection to 13 oral antibiotics. *Oral Microbiol Immunol*. 2007 Aug;22(4):285-8.

Kuroda K, DeGrado WF. Amphiphilic polymethacrylate derivatives as antimicrobial agents. *J Am Chem Soc*. 2005 Mar 30;127(12):4128-9.

- Lafzi A, Vahabi S, Ghods S, Torshabi M. In vitro effect of mineralized and demineralized bone allografts on proliferation and differentiation of MG-63 osteoblast-like cells. *Cell Tissue Bank*. 2016 Mar;17(1):91-104.
- Lang MS, Gonzalez ML, Dodson TB. Do Antibiotics Decrease the Risk of Inflammatory Complications After Third Molar Removal in Community Practices? *J Oral Maxillofac Surg*. 2017 Feb;75(2):249-255.
- Lang NP, Pjetursson BE, Tan K, Brägger U, Egger M, Zwahlen M. A systematic review of the survival and complication rates of fixed partial dentures (FPDs) after an observation period of at least 5 years. II. Combined tooth--implant-supported FPDs. *Clin Oral Implants Res*. 2004 Dec;15(6):643-53. Review.
- Lannutti J, Reneker D, Ma T, Tomasko D, Farson D. Electrospinning for tissue engineering scaffolds. *Mater Sci Eng C*, 2007 : 504–509
- Lasprilla AJ, Martinez GA, Lunelli BH, Jardini AL, Filho RM. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices - a review. *Biotechnol Adv*. 2012 Jan-Feb;30(1):321-8. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.06.019. Epub 2011 Jul 6. Review.
- Lee JH, Moon SK, Kim KM, Kim KN. Modification of TiO(2) nanotube surfaces by electro-spray deposition of amoxicillin combined with PLGA for bactericidal effects at surgical implantation sites. *Acta Odontol Scand*. 2013 Jan;71(1):168-74.
- Li H, Qiao T, Song P, Guo H, Song X, Zhang B, Chen X. Star-shaped PCL/PLLA blended fiber membrane via electrospinning. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2015;26(7):420-32.
- Li J, Chen Y, Mak AF, Tuan RS, Li L, Li Y. A one-step method to fabricate PLLA scaffolds with deposition of bioactive hydroxyapatite and collagen using ice-based microporogens. *Acta Biomater*. 2010 Jun;6(6):2013-9.
- Liang D, Hsiao BS, Chu B. Functional Electrospun Nanofibrous Scaffolds for Biomedical Applications. *Advanced drug delivery reviews*. 2007;59(14):1392-1412.
- Liu HC, Lee IC, Wang JH, Yang SH, Young TH. Preparation of PLLA membranes with different morphologies for culture of MG-63 Cells. *Biomaterials*. 2004 Aug;25(18):4047-56.
- Liu X, Zhang Y, Li S, Wang Y, Sun T, Li Z, Cai L, Wang X, Zhou L, Lai R. Study of a new bone-targeting titanium implant-bone interface. *Int J Nanomedicine*. 2016 Nov 25;11:6307-6324.
- Liu ZM, Lee SY, Sarun S, Moeller S, Schnabelrauch M, Groth T. Biocompatibility of poly(L-lactide) films modified with poly(ethylene imine) and polyelectrolyte multilayers. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2010;21(6-7):893-912.

Lizundia E, Mateos P, Vilas JL. Tuneable hydrolytic degradation of poly(l-lactide) scaffolds triggered by ZnO nanoparticles. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017 Jun 1;75:714-720.

Lockhart PB, Brennan MT, Kent ML, Norton HJ, Weinrib DA. Impact of amoxicillin prophylaxis on the incidence, nature, and duration of bacteremia in children after intubation and dental procedures. *Circulation*. 2004 Jun 15;109(23):2878-84.

Loesche WJ, Schmidt E, Smith BA, Caffessee R, Stoll J. Metronidazole therapy for periodontitis. *J Periodontal Res*. 1987 May;22(3):224-6.

Lyutakov O, Goncharova I, Rimpelova S, Kolarova K, Svanda J, Svorcik V. Silver release and antimicrobial properties of PMMA films doped with silver ions, nanoparticles and complexes. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2015 Apr;49:534-40.

Ma PX. Biomimetic Materials for Tissue Engineering. *Advanced drug delivery reviews*. 2008;60(2):184-198.

Mackie EJ. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003 Sep;35(9):1301-5. Review.

Marques AP, Cruz HR, Coutinho OP, Reis RL. Effect of starch-based biomaterials on the in vitro proliferation and viability of osteoblast-like cells. *J Mater Sci Mater Med*. 2005 Sep;16(9):833-42.

Marsh PD, Devine DA. How is the development of dental biofilms influenced by the host? *J Clin Periodontol*. 2011 Mar;38 Suppl 11:28-35.

Mazzocchi A, Passi L, Moretti R. Retrospective analysis of 736 implants inserted without antibiotic therapy. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007 Nov;65(11):2321-3.

Meira ALT, Todescan SMC, Azoubel E, Bittecourt S e Azoubel MCF. Use of local antimicrobial in periodontics: A critical approach. *Periodontia* 2007; 17(1), 83-89.

Merlos A, Vinuesa T, Jané-Salas E, López-López J, Viñas M. Antimicrobial prophylaxis in dentistry. *J Glob Antimicrob Resist*. 2014 Dec;2(4):232-238.

Middleton JC, Tipton AJ. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials*. 2000 Dec;21(23):2335-46.

Mombelli A, Décaillot F. The characteristics of biofilms in peri-implant disease. *J Clin Periodontol*. 2011 Mar;38 Suppl 11:203-13.

Mombelli A, Cionca N, Almaghlouth A. Does adjunctive antimicrobial therapy reduce the perceived need for periodontal surgery? *Periodontol* 2000. 2011 Feb;55(1):205-16.

Monaco G, Tavernese L, Agostini R, Marchetti C. Evaluation of antibiotic prophylaxis in reducing postoperative infection after mandibular third molar extraction in young patients. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009 Jul;67(7):1467-72.

Moraschini V, Poubel LA, Ferreira VF, Barboza Edos S. Evaluation of survival and success rates of dental implants reported in longitudinal studies with a follow-up period of at least 10 years: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2015 Mar;44(3):377-88.

Moses O, Vitrial D, Aboodi G, Sculean A, Tal H, Kozlovsky A, Artzi Z, Weinreb M, Nemcovsky CE. Biodegradation of three different collagen membranes in the rat calvarium: a comparative study. *J Periodontol*. 2008 May;79(5):905-11.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.

Naal FD, Salzmann GM, von Knoch F, Tuebel J, Diehl P, Gradinger R, Schauwecker J. The effects of clindamycin on human osteoblasts in vitro. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2008 Mar;128(3):317-23.

Nair LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog. Polym. Sci.*, 2007; 32: 762–98.

Neumann IA, Flores-Sahagun THS, Ribeiro AM. Biodegradable poly (L-lactic acid) (PLLA) and PLLA-3-arm blend membranes: The use of PLLA-3-arm as a plasticizer. *Polymer Testing* 2017, July, 60: 84–93

Núñez-Anita RE, Acosta-Torres LS, Vilar-Pineda J, Martínez-Espinosa JC, de la Fuente-Hernández J, Castaño VM. Toxicology of antimicrobial nanoparticles for prosthetic devices. *Int J Nanomedicine*. 2014 Aug 20;9:3999-4006.

Papenburg BJ, Bolhuis-Versteeg LA, Grijpma DW, Feijen J, Wessling M, Stamatialis D. A facile method to fabricate poly(L-lactide) nano-fibrous morphologies by phase inversion. *Acta Biomater*. 2010 Jul;6(7):2477-83.

Park HS, Lee YS, Choi EY, Choi JI, Choi IS, Kim SJ. Subantibiotic dose of azithromycin attenuates alveolar bone destruction and improves trabecular microarchitectures in a rat model of experimental periodontitis: A study using micro-computed tomography. *Int Immunopharmacol*. 2017 Jun;47:212-217.

Peng H, Xiao Y, Mao X, Chen L, Crawford R, Whittaker AK. Amphiphilic triblock copolymers of methoxy-poly(ethylene glycol)-b-poly(L-lactide)-b-poly(L-lysine) for enhancement of osteoblast attachment and growth. *Biomacromolecules*. 2009 Jan 12;10(1):95-104.

Philippart A, Boccaccini AR, Fleck C, Schubert DW, Roether JA. Toughening and functionalization of bioactive ceramic and glass bone scaffolds by biopolymer coatings and infiltration: a review of the last 5 years. *Expert Rev Med Devices*. 2015 Jan;12(1):93-111.

Pfaffenroth C, Winkel A, Dempwolf W, Gamble LJ, Castner DG, Stiesch M, Menzel H. Self-assembled antimicrobial and biocompatible copolymer films on titanium. *Macromol Biosci*. 2011 Nov 10;11(11):1515-25.

Pfau EA, Avila-Campos MJ. *Prevotella intermedia* and *Porphyromonas gingivalis* isolated from osseointegrated dental implants: colonization and antimicrobial susceptibility. *Brazilian Journal of Microbiology* 2005;36:281-285.

Powell CA, Mealey BL, Deas DE, McDonnell HT, Moritz AJ. Post-surgical infections: prevalence associated with various periodontal surgical procedures. *J Periodontol*. 2005 Mar;76(3):329-33.

Qiao T, Jiang S, Song P, Song X, Liu Q, Wang L, Chen X. Effect of blending HA-g-PLLA on xanthohumol-loaded PLGA fiber membrane. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2016 Oct 1;146:221-7.

Qi R, Guo R, Zheng F, Liu H, Yu J, Shi X. Controlled release and antibacterial activity of antibiotic-loaded electrospun halloysite/poly(lactic-co-glycolic acid) composite nanofibers. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013 Oct 1;110:148-55.

Rams TE, Slots J. Local delivery of antimicrobial agents in the periodontal pocket. *Periodontol* 2000. 1996 Feb;10:139-59. Review.

Ren YF, Malmstrom HS. Effectiveness of antibiotic prophylaxis in third molar surgery: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007 Oct;65(10):1909-21.

Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006 Jun;27(18):3413-31.

Rocha RG. *Clínica Integrada em Odontologia*. São Paulo: Artes Médicas, 2013.

Robling AG, Castillo AB, Turner CH. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu Rev Biomed Eng*. 2006;8:455-98. Review.

Ryser MD, Murgas KA. Bone remodeling as a spatial evolutionary game. *J Theor Biol*. 2017 Apr 7;418:16-26.

Sadeghi-Avalshahr AR, Khorsand-Ghayeni M, Nokhasteh S, Molavi AM, Sadeghi-Avalshahr M. Physical and mechanical characterization of PLLA interference screws produced by two stage injection molding method. *Prog Biomater*. 2016 Dec;5(3-4):183-91.

Sadiasa A, Nguyen TH, Lee BT. In vitro and in vivo evaluation of porous PCL-PLLA 3D polymer scaffolds fabricated via salt leaching method for bone tissue engineering applications. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2014;25(2):150-67.

Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci* 2004;4: 743-65

Schwartz AB, Larson EL. Antibiotic prophylaxis and postoperative complications after tooth extraction and implant placement: a review of the literature. *J Dent*.2007 Dec;35(12):881-8. Epub 2007 Sep 29. Review.

Shan D, Shi Y, Duan S, Wei Y, Cai Q, Yang X. Electrospun magnetic poly(L-lactide) (PLLA) nanofibers by incorporating PLLA-stabilized Fe₃O₄ nanoparticles. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013 Aug 1;33(6):3498-505.

Sharma S, Srivastava D, Grover S, Sharma V. Biomaterials in Tooth Tissue Engineering: A Review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*. 2014;8(1):309-315.

Shikinami Y, Matsusue Y, Nakamura T. The complete process of bioresorption and bone replacement using devices made of forged composites of raw hydroxyapatite particles/poly l-lactide (F-u-HA/PLLA). *Biomaterials*. 2005 Sep;26(27):5542-51.

Siddiqi A, Morkel JA, Zafar S. Antibiotic prophylaxis in third molar surgery: A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial using split-mouth technique. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2010 Feb;39(2):107-14.

Sims NA, Gooi JH. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol*. 2008 Oct;19(5):444-51.

Sill TJ, von Recum HA. Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*. 2008 May;29(13):1989-2006.

Silva E, Vasconcellos LM, Rodrigues BV, Dos Santos DM, Campana-Filho SP, Marciano FR, Webster TJ, Lobo AO. PDLLA honeycomb-like scaffolds with a high loading of superhydrophilic graphene/multi-walled carbon nanotubes promote osteoblast in vitro functions and guided in vivo bone regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017 Apr 1;73:31-39.

Sodek J, McKee MD. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol* 2000. 2000 Oct;24:99-126. Review.

Stevens B, Yang Y, Mohandas A, Stucker B, Nguyen KT. A review of materials, fabrication methods, and strategies used to enhance bone regeneration in engineered bone tissues. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008 May;85(2):573-82. Review.

Suárez-López Del Amo F, Yu SH, Wang HL. Non-Surgical Therapy for Peri-Implant Diseases: a Systematic Review. *J Oral Maxillofac Res*. 2016 Sep 9;7(3):e13. eCollection 2016 Jul-Sep. Review.

Sui G, Yang X, Mei F, Hu X, Chen G, Deng X, Ryu S. Poly-L-lactic acid/hydroxyapatite hybrid membrane for bone tissue regeneration. *J Biomed Mater Res A*. 2007 Aug;82(2):445-54.

Surapaneni H, Yalamanchili PS, Basha MH, Potluri S, Elisetti N, Kiran Kumar MV. Antibiotics in dental implants: A review of literature. *J Pharm Bioallied Sci*. 2016 Oct;8(Suppl 1):S28-S31. Review.

Tang LL, Liu H, Wang YL, Xian CY, Su AH Evaluation of the biocompatibility of acellular porcine dermis. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2007 Jun 15;57(2):215-8.

Teughels W, Dhondt R, Dekeyser C, Quirynen M. Treatment of aggressive periodontitis. *Periodontol 2000*. 2014 Jun;65(1):107-33.

Tsuji H. Poly(lactic acid) stereocomplexes: A decade of progress. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016 Dec 15;107:97-135.

Uskoković V, Hoover C, Vukomanović M, Uskoković DP, Desai TA. Osteogenic and antimicrobial nanoparticulate calcium phosphate and poly-(D,L-lactide-co-glycolide) powders for the treatment of osteomyelitis. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013 Aug 1;33(6):3362-73.

Uz M, Sharma AD, Adhikari P, Sakaguchi DS, Mallapragada SK. Development of multifunctional films for peripheral nerve regeneration. *Acta Biomater*. 2016 Sep 29. pii: S1742-7061(16)30512-8.

van Tonder A, Joubert AM, Cromarty AD. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Res Notes*. 2015 Feb 20;8:47.

Wan Y, Wang Y, Liu Z, Qu X, Han B, Bei J, Wang S. Adhesion and proliferation of OCT-1 osteoblast-like cells on micro- and nano-scale topography structured poly(L-lactide). *Biomaterials*. 2005 Jul;26(21):4453-9.

Walker C, Karpinia K. Rationale for use of antibiotics in periodontics. *J Periodontol*. 2002 Oct;73(10):1188-96. Review.

Wilson W, Taubert KA, Gewitz M, Lockhart PB, Baddour LM, Levison M, et al. Prevention of infective endocarditis guidelines from the American Heart Association: a guideline from the American Heart Association Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young, and the Council on Clinical Cardiology, Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia, and the Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group. *Circulation* 2007 Oct 9;116(15):1736-54. Epub 2007 Apr 19. Erratum in: *Circulation*. 2007 Oct 9;116(15):e376-7.

Wu G, Wu W, Zheng Q, Li J, Zhou J, Hu Z. Experimental study of PLLA/INH slow release implant fabricated by three dimensional printing technique and drug release characteristics in vitro. *Biomed Eng Online*. 2014 Jul 19;13:97.

Wu Q, Tang Y, Chen H, Wu J, Yin G. [Research of osteoblast-induced rat mesenchymal stem cells cocultured with beta-TCP/PLLA composite of different ratio]. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. 2005 Apr;22(2):242-6.

Xiao L, Wang B, Yang G, Gauthier M. *Poly(Lactic Acid)-Based Biomaterials: Synthesis, Modification and Applications*. Open Access Publisher 2012

Yazdimamaghani M, Vashae D, Assefa S, Walker KJ, Madihally SV, Köhler GA, Tayebi L. Hybrid macroporous gelatin/bioactive-glass/nanosilver scaffolds with controlled degradation behavior and antimicrobial activity for bone tissue engineering. *J Biomed Nanotechnol*. 2014 Jun;10(6):911-31.

Zhang X, Guo R, Xu J, Lan Y, Jiao Y, Zhou C, Zhao Y. Poly(L-lactide)/halloysite nanotube electrospun mats as dual-drug delivery systems and their therapeutic efficacy in infected full-thickness burns. *J Biomater Appl*. 2015 Nov;30(5):512-25.

Zeng RC, Cui LY, Jiang K, Liu R, Zhao BD, Zheng YF. In Vitro Corrosion and Cytocompatibility of a Microarc Oxidation Coating and Poly(L-lactic acid) Composite Coating on Mg-1Li-1Ca Alloy for Orthopedic Implants. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016 Apr 20;8(15):10014-28.

Zhou J, Cao C, Ma X. A novel three-dimensional tubular scaffold prepared from silk fibroin by electrospinning. *Int J Biol Macromol*. 2009 Dec 1;45(5):504-10.

ANEXO A – Protocolo CEUA/FOUSP

Fundada em 1900
"Em constante busca da excelência"

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

Comissão de Ética no Uso de Animais
Tel. (11) 3091 7842
ceuafo@usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo CEUA/FOUSP N° 010/2016 referente ao projeto intitulado: **"Citotoxicidade em osteoblastos de dispositivos poliméricos para uso local impregnados com antimicrobianos: análise *in vitro*"** sob a responsabilidade de execução dos autores **Prof. Dr. Carlos Alberto Adde** e da aluna **Thaís Claudino Lage**, foi analisado na presente data e considerado isento de análise da CEUA por utilizar material de origem animal: linhagens celulares imortalizadas (linhagem MC3T3-E1 de camundongos) cultivadas no Laboratório de Biologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 14 de setembro de 2016.

Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez
Presidente da CEUA/FOUSP