

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

DENUSA MOREIRA VERÍSSIMO

**“AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE E BIOATIVIDADE DE MEMBRANAS
COLÁGENO POLIANIÔNICO MINERALIZADAS E RETICULADAS EM MODELOS
ANIMAIS”**

FORTALEZA

2012

DENUSA MOREIRA VERÍSSIMO

**AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE E BIOATIVIDADE DE MEMBRANAS
COLÁGENO POLIANIÔNICO MINERALIZADAS E RETICULADAS EM MODELOS
ANIMAIS.**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito
Co-orientadora: Profa. Renata Ferreira de Carvalho Leitão

FORTALEZA

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

V619a

Verissimo, Denusa Moreira

Avaliação da biocompatibilidade e bioatividade de membranas colágeno polianiônico mineralizadas e reticuladas em modelos animais/ Denusa Moreira Verissimo. - 2012.
168 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2012.

Orientação: Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito

Co-orientação: Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão

1. Regeneração Tecidual Guiada 2. Durapatita 3 Membranas 4. Colágeno 5 Glutaraldeído I.
Título.

CDD 615.50724

DENUSA MOREIRA VERÍSSIMO

AVALIAÇÃO DA BIOCMPATIBILIDADE E BIOATIVIDADE DE MEMBRANAS COLÁGENO POLIANIÔNICO MINERALIZADAS E RETICULADAS EM MODELOS ANIMAIS.

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Farmacologia

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito (orientadora)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Alexandre Malta Rossi
Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas - CBPF

Prof. Marcelo Ganzarolli de Oliveira
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Prof. Francisco Wagner Vasconcelos Freire Filho
Universidade de Fortaleza - UNIFOR

Prof. Francisco Airton Castro da Rocha
Universidade Federal do Ceará- UFC

Aos meus pais Maria Jurandy e Nilo pelos ensinamentos de perseverança.

Ao meu marido Jorge, pela paciência e compreensão.

Às minhas filhas Letícia e Juliana, por serem os amores da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu muito obrigado, por me oferecer tantos momentos felizes.

À minha família, que me apoiou na realização de mais essa conquista pessoal, em especial minhas irmãs Denize Veríssimo e Débora Veríssimo e minhas tias Maria Joany Moreira e Maria Juracy Moreira, pelas palavras de incentivo.

À professora Gerly Anne de Castro Brito, a quem muito admiro, agradeço todas as orientações dadas ao presente trabalho.

À professora e amiga Renata Ferreira de Carvalho Leitão, pelo estímulo dado para que eu concluísse esse curso de pós-graduação, além de toda a ajuda oferecida nos momentos mais difíceis.

À todos os professores do curso de pós-graduação em Farmacologia, pelas horas de aulas dadas.

Aos estudantes de iniciação científica, Camila Dória, Cintia de Melo Braga, Charles de Oliveira, Iuri Rodrigues Rocha, pela grandiosa ajuda durante os experimentos com os animais.

À Maria Silvandira França Pinheiro, técnica do Laboratório de Inflamação e Câncer /LAFICA, pela sua paciência e disponibilidade de ajudar.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Ceará, Maria do Socorro França Monte, José Ivan Rodrigues de Sousa e Conceição da Silva Martins, pelas horas que passamos juntos cortando e corando lâminas.

À Clínica de Radiologia Odontológica Perboyre Castelo, e em especial ao Sr. Perboyre Castelo Filho, que disponibilizou os aparelhos de radiografia digital e tomografia computadorizada para a realização deste trabalho.

Aos funcionários da Clínica de Radiologia Odontológica Perboyre Castelo, Antônio Soares Gomes e Michelly Pedrosa Monteiro, pela ajuda oferecida na realização das tomografias.

Ao professor Roberto Cesar Pereira Lima Júnior e sua esposa Dayse Wong, pela colaboração na realização deste trabalho.

"Nada na vida está realmente em nossas mãos...
mas tudo está diante das nossas possibilidades."

Walter Grando

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar membranas de colágeno polianiónico (CPA) reticuladas e impregnadas com hidroxiapatita, manufaturadas pelo Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará. Dividiu-se o trabalho em 2 etapas, onde inicialmente avaliou-se a biocompatibilidade e a biodegradação de 6 diferentes membranas de CPA, divididas nos seguintes grupos: três com 0, 25 e 75 ciclos de impregnação com hidroxiapatita (CPA, CPA 25, CPA 75) e mais três cujas membranas foram reticuladas com glutaraldeído (GA) (CPA GA, CPA 25GA, CPA 75GA) inseridas em tecido subcutâneo de ratos. Análises histopatológicas do infiltrado inflamatório, atividade de mieloperoxidase (MPO), dosagem de citocinas, espessura de cápsula fibrosa, imunohistoquímica para metaloproteinase e biodegradação das membranas foram avaliadas após 1, 7, 15, 30, 60 e 120 dias. Posteriormente, avaliou-se o efeito das 3 melhores membranas na regeneração óssea guiada usando defeito ósseo crítico em calvária de ratos (DOC), onde as membranas foram posicionadas sobre o defeito. Formação óssea foi avaliada com base na radiografia digital (RD), tomografia computadorizada (TC) e análise histológica, 24 horas, 4, 8 e 12 semanas após o procedimento cirúrgico. MPO e dosagem de citocinas foram realizadas após 24 horas. No subcutâneo, as membranas reticuladas com GA mostraram espessa cápsula fibrosa e menor reação inflamatória permanecendo intactas após 120 dias. No modelo de regeneração óssea em calvária de ratos, após 12 semanas, os grupos CPA GA e CPA 25GA apresentaram redução significativa da área radiolúcida quando comparadas ao grupo basal. A análise histológica mostrou que nos grupos CPA GA e CPA 25GA as membranas ainda estavam intactas, envolvidas por uma espessa cápsula fibrosa e as membranas do grupo CPA 75GA apresentaram início de reabsorção. Não foi encontrada diferença estatística entre os grupos quanto a atividade MPO e citocina IL-1 β . Concluímos que as membranas reticuladas mostraram-se mais biocompatíveis e se mantiveram livre de biodegradação no período de observação. Essas membranas induziram o fechamento dos defeitos ósseos e não induziram reação inflamatória. A impregnação de hidroxiapatita não acelerou a cicatrização do defeito cirúrgico. Nossos resultados sugerem que as membranas de CPA reticuladas poderão ser úteis nos processos em que a formação de um novo osso depende de uma duração mais prolongada da barreira mecânica.

Palavras-Chave: Regeneração Tecidual Guiada. Hidroxiapatita. Membranas. Colágeno. Glutaraldeído.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate polyanionic collagen (PAC) membranes reticulated and impregnated with hydroxyapatite, manufactured by the Physics Department, Federal University of Ceará. This study was divided into two stages, initially it was evaluated the biocompatibility and biodegradation of six different membranes of PAC, divided into the following groups: three with 0, 25 and 75 cycles of impregnation with apatite (PAC, PAC 25, PAC 75) and three more whose membranes were crosslinked with glutaraldehyde (GA) (GA PAC, PAC 25GA, PAC 75GA) inserted into the subcutaneous tissue of rats. Histopathological analyzes of inflammatory infiltration, myeloperoxidase activity (MPO), cytokine, thickness of fibrous capsule, immunohistochemistry for metalloproteinase and degradation of the membranes were evaluated after 1, 7, 15, 30, 60 and 120 days. Subsequently, it was evaluated the effect of the three best membranes in guided bone regeneration using bone critical defects in rat calvaria (DOC), where the membranes were placed over the defect. Bone formation was evaluated based on digital radiography (DR), computed tomography (CT) and histological analysis, 24 hours, 4, 8 and 12 weeks after surgery. MPO and cytokine were performed after 24 hours. In the subcutaneous tissue, the membranes crosslinked with GA showed thick fibrous capsule, less inflammatory reaction and remained intact after 120 days. In the bone regeneration model in rat calvaria, after 12 weeks, PAC GA and PAC 25GA groups showed significant reduction in radiolucent area compared to the baseline group. Histological analysis showed that in PAC GA and PAC 25GA groups, membranes were still intact, surrounded by a thick fibrous capsule and in PAC 75GA group, membranes showed early resorption. There was no statistical difference between groups in MPO activity and IL-1 β . We conclude that the crosslinked membranes were more biocompatible and remained free from degradation during the observation period. These membranes induced closure of bone defects and did not induce inflammatory reaction. The impregnation of hydroxyapatite did not accelerate the healing of surgical defect. Our results suggest that the crosslinked membranes CPA may be useful in cases where new bone formation is dependent on a longer duration of mechanical barrier.

Keywords: Guided Tissue Regeneration. Membranes. Collagen. Glutaral.

LISTA DE FIGURAS

1	Anatomia do periodonto	22
2	Terapia ressectiva periodontal	25
3	Fontes celulares para repovoamento da ferida periodontal	25
4	Diagrama esquemático de técnicas usadas em cirurgia periodontal	29
5	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de membranas mineralizadas de colágeno (CPA 25GA e CPA 75).	44
6	Membrana de colágeno impregnada com 75 ciclos de hidroxiapatita e reticulada com glutaraldeído	45
7	Sete incisões para colocação das membranas realizadas na região dorsal dos ratos.	48
8	Remoção das membranas e tecido circunjacente, nos períodos de 1, 7, 15, 30, 60 e 120 dias	48
9	Análise por imunohistoquímica para metaloproteinase pelo sistema de análise morfométrica	52
10	Seqüência do procedimento cirúrgico realizado para criação do defeito ósseo-crítico em calvária de ratos.	55
11	Visualização das calotas cranianas captadas pelo aparelho de tomografia computadorizada Scanner PreXion 3D.	58
12	Efeito das membranas de colágeno implantadas em tecido subcutâneo na contagem de leucócitos	62
13	Espessura de cápsula fibrosa formada na extremidade e parede lateral das membranas.	64
14	Percentual de reabsorção da área da membrana em relação ao 1º dia de cada grupo	65

15	Aspecto microscópico das membranas (CPA) implantadas no tecido subcutâneo dos ratos, após trinta dias	66
16	Aspecto microscópico das membranas (CPA) implantadas no tecido subcutâneo dos ratos, após sessenta dias.	67
17	Aspecto microscópico das membranas (CPA) implantadas no tecido subcutâneo dos ratos, após 120 dias	68
18	Atividade de mieloperoxidase (MPO) no tecido subcutâneo adjacente às membranas.	69
19	Efeito da dosagem de citocinas no tecido subcutâneo adjacente às membranas	71
20	Imunohistoquímica para metaloproteinase (MMP1/8) nos tecidos subcutâneos adjacentes às membranas em ratos.	73/74
21	Radiografia Digital 4 (A), 8 (B), e 12 (C) semanas após o procedimento cirúrgico	76
22	Percentual de neo-formação óssea 4, 8 e 12 semanas após o procedimento cirúrgico.	77
23	Tomografia Computadorizada 4 (A) e 12 (B) semanas após o procedimento cirúrgico.	79
24	Comparação entre as imagens visualizadas pela radiografia digital e tomografia computadorizada após o período de 12 semanas do procedimento cirúrgico.	80
25	Densidade, obtida pela tomografia computadorizada, 12 semanas após o procedimento cirúrgico.	81
26	Aspecto microscópico das membranas implantadas sob o tecido subcutâneo da calvária de ratos 4 semanas após a confecção de defeito crítico de 5.25mm.	84
27	Aspecto microscópico das membranas implantadas sob o tecido subcutâneo da calvária de ratos 8 semanas após a confecção de defeito crítico de 5,25mm.	85

28	Aspecto microscópico das membranas implantadas sob o tecido subcutâneo da calvária de ratos 12 semanas após a confecção de defeito crítico de 5,25mm.	86
29	Atividade de mieloperoxidase (MPO) no tecido subcutâneo adjacente ao defeito da calvária.	88
30	Dosagem de citocinas (IL-1 β , TNF- α ,) no tecido subcutâneo adjacente ao defeito da calvária.	89

LISTA DE TABELAS

- 1 Imunohistoquímica para metaloproteinase nos tecidos subcutâneos adjacentes às membranas em ratos. 72
- 2 Tabela apresentando os aspectos histológicos encontrados conforme os escores avaliados quatro semanas após o procedimento cirúrgico. 83
- 3 Tabela apresentando os aspectos histológicos encontrados conforme os escores avaliados oito semanas após o procedimento cirúrgico. 83
- 4 Tabela apresentando os aspectos histológicos encontrados conforme os escores avaliados 12 semanas após o procedimento cirúrgico. 83

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
μm	Micrometro
μm^2	Micrometro quadrado
AC	Colágeno aniônico
ANOVA	Análise de Variância
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Hidroxiapatita sintética
Ca^{2+}	Íons cálcio
CaCl_2	Cloreto de cálcio
CaSO_4	Sulfato de cálcio
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
cm	Centímetro
CPA	Colágeno Polianiônico
CPA 25GA	Colágeno polianiônico com glutaraldeído e 25 ciclos de hidroxiapatita
CPA 75GA	Colágeno polianiônico com glutaraldeído e 75 ciclos de hidroxiapatita
CPA GA	Colágeno polianiônico com glutaraldeído
DAB	Diaminobenzidina
DOC	Defeito Ósseo Crítico
d-PTFE	Politetrafluoretileno expandido de alta densidade
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FAO	Fosfatase Alcalina Óssea
FAT	Fosfatase Alcalina Total
g	Gramas
GA	Glutaraldeído

GM-CSF	Fator estimulador de colônias granulócito-macrófago
h	Horas
H&E	Hematoxilina e eosina
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
IL-10	Interleucina 10
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IP	Intra-peritoneal
K ⁺	Íons potássio
KCl	Cloreto de potássio
kVp	Quilovolts potência
kGy	Quilogray
LOCEM	Laboratório de Telecomunicações e Engenharia e Ciência dos Materiais
mA	Miliamperes
mg/cm ²	Miligramas por centímetro quadrado
mg/g	Miligramas por grama
min	Minuto
ml	Mililitro
MMP	Metaloproteinase
mol/L	Mol por litro
MPO	Mieloperoxidase
Na ⁺	Íons sódio
Na ₂ HPO ₄	Monoidrogenofosfato de sódio
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato Monossódico
NC	Colágeno natural

nCHAC	Hidroxiapatita nano-carbonada/colágeno
nm	Nanômetros
NR	Não reabsorvíveis
°C	Graus Celcius
OPD	O-fenilendiamina
PAF	Fator ativador de plaquetas
PBS	Tampão fosfato
pg/ml	Picogramas/mililitro
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGI ₂	Prostaciclina
pH	Potencial de hidrogênio
PMN	Polimorfonucleares
PTFE	Politetrafluoretileno
PTFE-e	Politetrafluoretileno expandido
R	Reabsorvíveis
ROG	Regeneração óssea guiada
rpm	Rotações por minuto
RTG	Regeneração Tecidual Guiada
SAMM	Sistema de Análise Morfométrica
s	Segundos
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UFC	Universidade Federal do Ceará
ug/ml	Microgramas por mililitro
μ l	Microlitros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Biomateriais	18
1.2	Fisiologia e metabolismo ósseo	19
1.3	Regeneração tecidual guiada e regeneração óssea guiada em tecidos dentários	21
1.4	Membranas não reabsorvíveis e reabsorvíveis	30
1.5	Membranas reabsorvíveis de colágeno	32
1.6	Modelo de defeito ósseo crítico em calota craniana	37
1.7	Justificativa	39
1.8	Objetivos	41
2	MATERIAIS E MÉTODOS COMUNS ÀS DUAS ETAPAS DO PRESENTE TRABALHO	42
2.1	Preparação das membranas de colágeno polianiônico	42
2.2	Processo de mineralização das membranas de colágeno polianiônico	43
2.3	Reticulação das membranas de colágeno mineralizadas com glutaraldeído (GA)	43
2.4	Esterilização das membranas de colágeno polianiônico	45
3	MATERIAIS E MÉTODOS INERENTES A 1° ETAPA DO PRESENTE TRABALHO	46
3.1	Membranas de colágeno polianiônico	46
3.2	Animais	46
3.3	Parâmetros avaliados	49
3.3.1	Análise histológica	49

3.3.1.1	Intensidade do infiltrado Inflamatório	49
3.3.1.2	Mensuração da cápsula fibrosa	49
3.3.1.3	Biodegradação das membranas	49
3.3.2	Atividade de mieloperoxidase (MPO) no tecido subcutâneo adjacente às membranas	50
3.3.3	Dosagem de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-10) no tecido subcutâneo adjacente às membranas	50
3.3.4	Imunohistoquímica para metaloproteinase (MMP)	51
4	MATERIAIS E MÉTODOS INERENTES A 2° ETAPA DO PRESENTE TRABALHO	53
4.1	Membrana de colágeno polianiônico	53
4.2	Animais	53
4.3	Parâmetros Avaliados	56
4.3.1	Avaliação da formação óssea	56
4.3.1.1	Radiografia digital	56
4.3.1.2	Tomografia computadorizada	56
4.3.1.3	Densidade radiográfica	57
4.3.2	Análise histológica	59
4.3.3	Dosagem de mieloperoxidase (MPO) no tecido subcutâneo adjacente ao defeito da calvária	59
4.3.4	Dosagem de citocinas (TNF- α , IL-1 β) no tecido subcutâneo adjacente ao defeito da calvária	60
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	60
6	RESULTADOS INERENTES A 1° ETAPA DO PRESENTE TRABALHO	61
6.1	Análise histológica	61
6.1.1	Intensidade do infiltrado inflamatório	61

6.1.2	Mensuração da cápsula fibrosa	63
6.1.3	Biodegradação das membranas	63
6.2	Atividade de mieloperoxidase (MPO) no tecido subcutâneo adjacente às membranas	69
6.3	Dosagem de citocinas (TNF-α, IL-1β, IL-10) no tecido subcutâneo adjacente às membranas	70
6.4	Imunohistoquímica para metaloproteinase (MMP1/8)	72
7	RESULTADOS INERENTES A 2° ETAPA DO PRESENTE TRABALHO	75
7.1	Avaliação da formação óssea	75
7.1.1	Radiografia digital	75
7.1.2	Tomografia computadorizada	78
7.1.3	Densidade radiográfica	81
7.2	Análise histológica	82
7.3	Atividade de mieloperoxidase (MPO) no tecido subcutâneo adjacente ao defeito da calvária	87
7.4	Dosagem de citocinas (TNF-α, IL-1β) no tecido subcutâneo adjacente ao defeito da calvária	87
8	DISCUSSÃO	90
9	CONCLUSÃO	105
	REFERÊNCIAS	106
	ANEXOS	121

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biomateriais

A Engenharia Tecidual e Medicina Regenerativa têm apresentado um papel importante no desenvolvimento de materiais que promovem a reparação e regeneração das estruturas teciduais perdidas, com maior presivibilidade, de maneira rápida e menos invasiva em relação às técnicas usadas previamente na Odontologia (Periodontia e Implantodontia).

A Sociedade Européia de Biomateriais define biomateriais como “Qualquer substância, excluindo fármacos, ou combinação de substâncias sintética ou natural, que pode ser usada em qualquer período, como tratamento total ou parcial, aumento ou reposição de qualquer tecido ou órgão ou função do corpo” (TOREZAN; FONSECA, 2010; CARVALHO; BASSI; PEREIRA, 2004).

Os biomateriais ideais, utilizados na engenharia de tecidos, são aqueles com habilidade de interagir com células *in vitro* ou tecidos vivos para induzir regeneração ou remodelamento, para substituir, reparar, manter ou melhorar uma função biológica. São desenvolvidos de polímeros naturais ou sintéticos ou em combinação com componentes inorgânicos (DEUEL *et al.*, 1997) e são idealmente concebidos com o princípio de que as células estão constantemente sendo estimuladas por sinais de natureza mecânica, elétrica, estrutural e química. Como consequência, esses dispositivos devem inibir/reduzir ou estimular a interação célula/material dependendo dos propósitos específicos (KOUVROUKOGLOU *et al.*, 2000), que são controlados pela topografia do material, umedecimento, superfície, mobilidade, cristalinidade, composição química e propriedades físicas e físico-químicas (HUNT; MCLAUGHIN; FLANAGAN, 1997; KOTWAL; SCHMIDT, 2001; WIESMANN *et al.*, 2001).

Os materiais para enxertia participam de processos de modelagem, remodelagem e reparação de tecido ósseo a ser formado e estimulado. São três os processos envolvidos na obtenção do osso neo-formado e qualquer tipo de enxerto ósseo deve possuir uma das três características para exercer a função regenerativa. O processo de **osteogênese** é responsável pela formação e desenvolvimento do osso. As células osseogênicas levam a formação de osso em tecido mole ou à ativação mais rápida de crescimento ósseo em osso pré-existente. O processo de **osseoindução** estimula o processo de osteogênese. Os enxertos considerados

osseoindutores podem realçar o processo regenerativo do osso, formando e expandindo tecido ósseo para regiões além do sítio receptor. Já o processo de **osseocondução** leva a formação de uma matriz ou arcabouço para depósito de novo osso. Os enxertos osseocondutores necessitam de matéria óssea pré-existente e células mesenquimais indiferenciadas para a neo-formação óssea. A presença de células tronco pluripotentes do estroma ósseo (células mesenquimais) as quais se diferenciam em células ósseas, tem grande importância no resultado de novo osso a ser reabilitado (GARG, 2004; KRICHELDORF, 2009).

1.2 Fisiologia e metabolismo ósseo

O osso é um composto altamente ordenado de matriz orgânica e mineral inorgânico. A matriz óssea, chamada osteóide antes da mineralização, é principalmente um conjunto de fibras colágenas embebida em substância fundamental. Esta última é um gel de água viscoso e complexos de glicoproteína/proteína. A substância fundamental também contém numerosos fatores orgânicos (citocinas, fatores de crescimento) que ajudam a controlar a ativação celular, maturação da matriz e mineralização. Durante a mineralização pequenos cristais de hidroxiapatita (HA) são densamente acondicionados em uma série ordenada, de acordo com a orientação de fibras colágenas (ROBERTS *et al.*, 1987). Dependendo das condições ambientais, o osso se forma como um biomaterial nitidamente ordenado, tanto em nível molecular quanto macroscópico (WENER; TRAUB, 1992). No osso trabecular esponjoso normal, a matriz de osso mineralizado geralmente representa menos de 25% do total do volume dos tecidos. A maioria do volume do osso é constituído por uma mistura altamente variável de tecido gorduroso, fibroso e hematopoiético que contém um variável plexo de artérias, veias e sinusoides (MUSHER *et al.*, 2010).

O osso é uma forma especializada de tecido conjuntivo que consiste basicamente de uma matriz orgânica (90% composta de colágeno tipo I), e uma matriz inorgânica composta de hidroxiapatita (SEAL; OTERO; PANITCH, 2001). O componente mineral do osso, que é principalmente a hidroxiapatita, representa 60% do peso básico. Do ponto de vista macroscópico, o osso pode ser dividido em dois tipos: osso mineralizado (compacto) e osso medular (trabecular). O osso

mineralizado é constituído de lamelas, enquanto o osso medular contém adipócitos, estruturas vasculares e células mesenquimais indiferenciadas (LINDHE; KARRING; ARAÚJO, 2005).

Os osteoblastos (células formadoras de osso) produzem matriz óssea (osteóide) que consiste em fibras colágenas, glicoproteínas e proteoglicanas. A matriz óssea sofre mineralização pelo depósito de minerais tais como cálcio e fósforo, que subsequentemente são transformados em hidroxiapatita. Todos os sítios ativos de formação óssea abrigam osteoblastos. A superfície externa do osso é revestida por uma camada de tais osteoblastos, que, por sua vez, estão organizados em um perióstio que contém fibras colágenas, densamente compactadas. Na superfície interna do osso, isto é no espaço medular, existe o endóstio, que apresenta características semelhantes ao perióstio (LINDHE; TRORKILD; ARAÚJO, 2005).

Dependendo da idade, da função e do histórico fisiológico, os ossos são compostos de 4 tipos de tecidos microscópicos: trançado, lamelar, fibroso e composto. O osso trançado é altamente celular, formado rapidamente em resposta ao crescimento ou a uma lesão. Comparado ao osso maduro, ele tem um conteúdo mineral relativamente baixo, orientação mais aleatória das fibras e força mínima. Já que o osso trançado é mais maleável que o osso lamelar maduro, ele tolera mais o micromovimento associado à cicatrização da interface quando o implante dental é posicionado. O osso lamelar é o principal tecido de suporte de cargas funcionais do esqueleto maduro. O osso fibroso é característico das inserções do ligamento e tendão, ao longo das superfícies formadoras de osso. Os estriamentos são orientados ao longo do padrão lamelar subjacente. Estes estriamentos são inserções das fibras de Sharpey, compostas por fibras colágenas provenientes do tecido conjuntivo adjacente, que se inserem diretamente no osso. O osso fibroso é bem conhecido em Odontologia, porque é formado adjacente ao ligamento periodontal dos dentes. O osso composto é um osso lamelar depositado sobre uma matriz de osso trançado. Durante o crescimento rápido e a cicatrização do ferimento, um retículo de osso trançado altamente poroso cresce e captura os vasos sanguíneos ao longo da superfície endóssea ou perióstia. O retículo trançado preenche então o espaço paravascular com lamelas de alta qualidade, que resulta em osso composto com força adequada para suportar as cargas (ROBERTS; GARETTO, 2000).

Para cumprir o seu papel funcional duplo de suporte e metabolismo, o osso responde a um complexo conjunto de mediadores mecânicos, bioelétricos e locais (citocinas e fatores de crescimento). O processo osteogênico, que depende da vascularização, é facilmente interrompido pelo micromovimento, em uma interface osso/implante que está cicatrizando (ROBERTS; GARETTO, 2000).

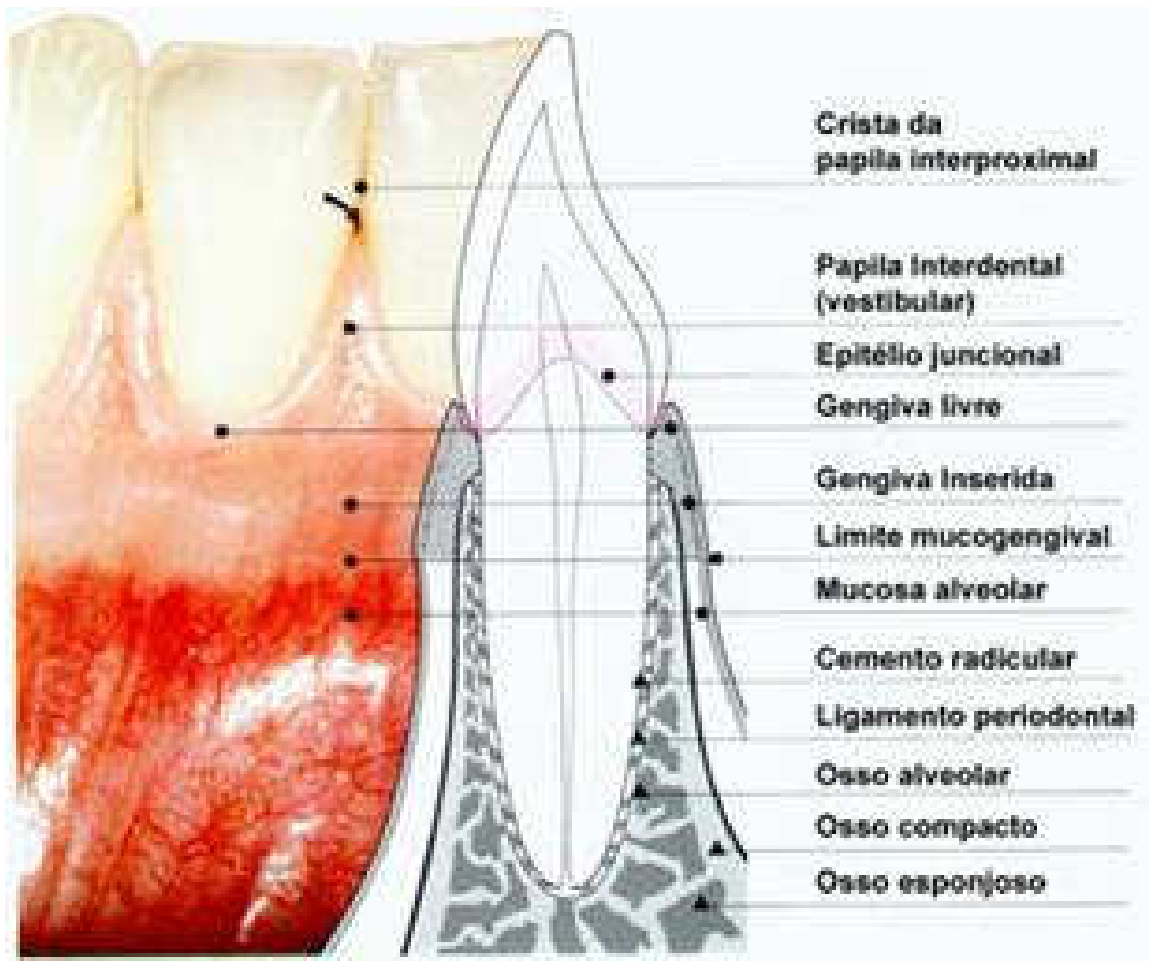
A modelagem é uma atividade específica da superfície (aposição e reabsorção), que produz uma alteração em cadeia no tamanho e formato do osso. A remodelagem é definida como uma modificação ou reestruturação interna do osso previamente existente. A ativação das células ósseas precursoras resulta em uma seqüência de: reabsorção ativa, quiescência ou reversão, e formação. Durante o período de mineralização primária, os osteoblastos depositam cerca de 70% do mineral encontrado no osso vivo maduro. A mineralização secundária é um fenômeno de crescimento de cristais não celulares, que ocorre no período de alguns meses (ROBERTS; GARETTO, 2000).

1.3 Regeneração tecidual guiada e regeneração óssea guiada em tecidos dentários.

Em odontologia, o conceito da regeneração tecidual guiada (RTG) é baseado na premissa de que o ligamento periodontal contém as células progenitoras necessárias para a formação dos tecidos de sustentação dos dentes (cimento, ligamento periodontal e osso alveolar). O fundamento da RTG é impedir a migração apical do epitélio juncional pela colocação de uma membrana entre o tecido conjuntivo gengival (retalho) e a superfície radicular (MAGINI, 2011). Para que possamos entender este conceito é fundamental o conhecimento sobre a anatomia do periodonto.

O periodonto (peri= em torno de, odonto= dente) compreende os seguintes tecidos: gengiva, ligamento periodontal, cimento radicular e osso alveolar. O osso alveolar propriamente dito faz parte do processo alveolar e forma a delgada lâmina óssea que reveste o alvéolo dentário (LINDHE, KARRING, ARAÚJO, 2005) (Figura 1).

Figura 1: Anatomia do periodonto.



O periodonto, aparelho de sustentação dos dentes, é composto de gengiva, ligamento periodontal, osso alveolar e cimento radicular. Fonte: clinicacampogrande.com.

A principal função do periodonto é inserir o dente no tecido ósseo dos maxilares e manter a integridade da superfície da mucosa mastigatória da cavidade oral. O periodonto, também chamado de aparelho de inserção ou tecidos de suporte dos dentes, forma uma unidade de desenvolvimento, biológica e funcional, que sofre determinadas alterações com a idade e, além disso, está sujeita a alterações morfológicas relacionadas a modificações funcionais e no meio bucal (LINDHE; KARRING; ARAÚJO, 2005). O processo alveolar, elevação óssea em torno dos dentes, desenvolve-se em associação com o desenvolvimento e erupção dos

dentes. Em conjunto com o cimento radicular e o ligamento periodontal, o osso alveolar constitui o aparelho de inserção dos dentes, cuja função principal é distribuir as forças geradas, pela mastigação e por outros contatos dentários (LINDHE; KARRING; ARAÚJO, 2005).

A doença periodontal não tratada leva a perda dos dentes por meio da destruição de suas estruturas de proteção (gengiva) e suporte (osso alveolar, ligamento periodontal e cimento radicular). Os objetivos da terapia periodontal incluem não apenas evitar o avanço da doença, mas também a regeneração das estruturas perdidas. Todavia, a reconstrução dos defeitos periodontais é um desafio clínico, uma vez que compreende três tecidos distintos e peculiares: cimento radicular, ligamento periodontal e osso alveolar. Destaca-se que o cimento é um tecido avascular (MAGINI, 2010).

As abordagens cirúrgicas convencionais (curetagem periodontal, gengivectomia/gengivoplastia e a osteotomia/osteoplastia) continuam a ser métodos confiáveis para acessar as superfícies radiculares, reduzir a profundidade de bolsas e melhorar a arquitetura dos tecidos periodontais. Entretanto essas técnicas apresentam limitações por apenas recobrir os tecidos de sustentação perdidos durante as fases iniciais da doença. Recentemente, procedimentos cirúrgicos tidos como regenerativos ou reconstitutivos que objetivam uma regeneração maior e mais previsível dos tecidos periodontais e sua reinserção próxima aos valores iniciais têm sido desenvolvidos, analisados e aplicados à prática clínica (MARTINS *et al.*, 2001; ACADEMY REPORT, 2005).

A história relata que durante as décadas de 50, 60, 70 e na primeira metade dos anos 80 do século XX, as terapias ressectivas, como a gengivectomia/gengivoplastia e a osteotomia/osteoplastia, constituíam a indicação eletiva para a maioria dos defeitos periodontais. Esse fato era devido à crença na obtenção necessária de sulcos gengivais rasos. As técnicas ressectivas reconstituem as dimensões médias das distâncias biológicas (sulco gengival, epitélio juncional e inserção conjuntiva), pela remoção tecidual, em um nível mais apical (Figura 2). O descrédito dado à terapia reconstitutiva (“preenchimento” dos defeitos

infra-ósseos e lesões de furca) era decorrente da sua questionável previsibilidade. Nesse contexto, é pertinente definir regeneração e reparo periodontal:

a) regeneração: reconstituição dos tecidos perdidos pelas periodontites (cimento, ligamento periodontal e osso alveolar novos); restabelecimento da arquitetura e da função;

b) reparo: cicatrização da ferida periodontal, sem a restauração da arquitetura e/ou da função (epitélio juncional longo, inserção conjuntiva longa) (MELCHER, 1976).

Postula-se que o tipo de célula capaz de repovoar a superfície radicular, após a terapia periodontal, determina o reparo (epitélio juncional longo e/ou inserção conjuntiva longa) ou a regeneração periodontal (MELCHER, 1970). Essa ferida cirúrgica possui quatro fontes celulares possíveis de repovoamento: células do epitélio juncional, do tecido conjuntivo gengival, do tecido ósseo e do ligamento periodontal. A corrida celular pelo repovoamento da superfície radicular desnuda, geralmente, é vencida pelas células epiteliais. Conseqüentemente, o epitélio juncional longo é o reparo mais rotineiro após a terapia periodontal. A inibição da migração apical do epitélio juncional é imperiosa para que haja o repovoamento da raiz por células que possibilitam a regeneração (STAHL, 1977) (Figura 3).

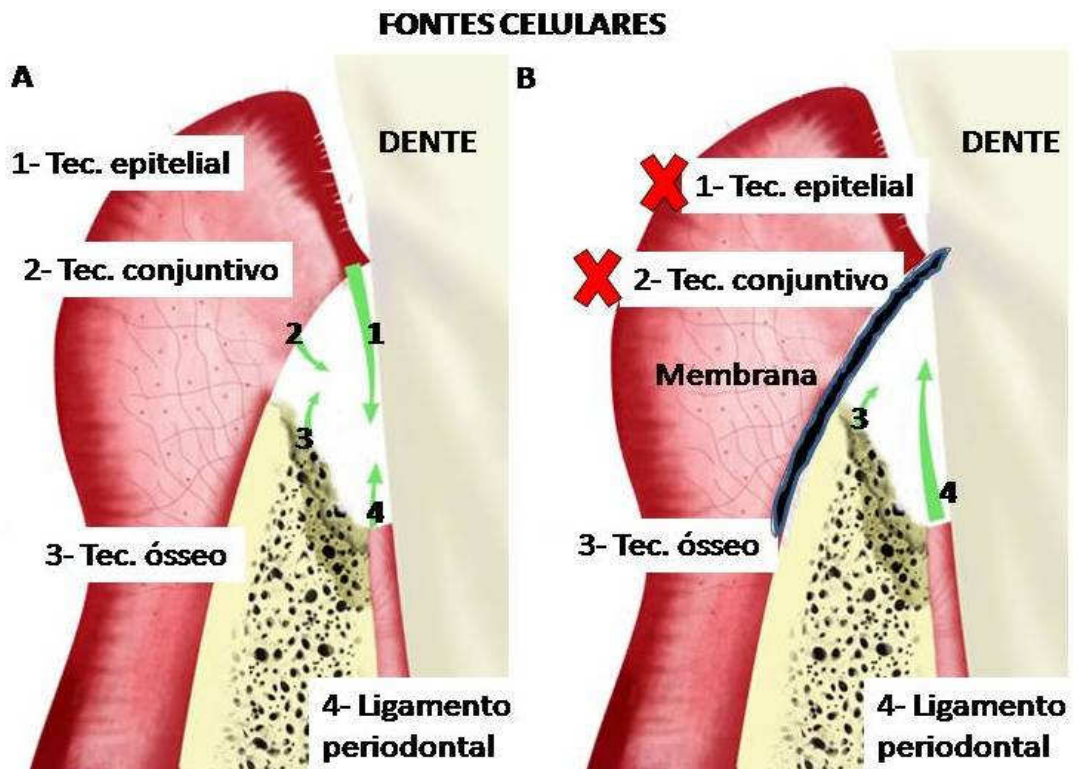
Figura 2: Terapia ressectiva periodontal.



A- Radiografia periapical da região da hemi-arcada superior esquerda evidenciando perda dos tecidos de sustentação dos dentes; B- Sondagem periodontal evidenciando bolsa periodontal profunda; C- Procedimento cirúrgico de levantamento de retalho apical tradicional, com o objetivo de realizar procedimentos de raspagem e alisamento radicular, para remoção de biofilme e cálculo aderidos sobre a superfície dentária.

Fonte: Fotografias cedidas pelo professor Ricardo Martins, do Departamento de Clínica Odontológica, do curso de Odontologia da Universidade Federal do Ceará.

Figura 3: Fontes celulares para repovoamento da ferida periodontal.



A- Após os procedimentos básicos de raspagem e alisamento radicular para remoção do biofilme dental aderido sobre a superfície radicular, existem 4 fontes celulares possíveis de repovoamento da ferida periodontal: 1- células provenientes do tecido epitelial, 2- células provenientes do tecido conjuntivo, 3- células provenientes do tecido ósseo e 4- células provenientes do ligamento periodontal; B- Fundamento da RTG: exclusão tecidual (1- células provenientes do tecido epitelial e 2- do tecido conjuntivo) através do posicionamento de membrana. Fonte: Magini, 2010.

A técnica de regeneração tecidual guiada (RTG) introduzida por Nyman *et al.* (1982) e Gottlow *et al.* (1986) é uma técnica que usa barreira de membranas, que permite a repopulação das células derivadas do ligamento periodontal na superfície radicular. A RTG está baseada no fato de que apenas as células do ligamento periodontal e do tecido ósseo tem o potencial de regeneração dos tecidos de sustentação dos dentes (KARRING; WARRER, 1992). Na RTG, as membranas funcionam como barreiras mecânicas, excluindo o epitélio e o tecido conjuntivo da superfície radicular, permitindo a regeneração das células do ligamento periodontal (NYMAN *et al.*, 1982; LINDE *et al.*, 1993; ACADEMY REPORT, 2005). A aplicação de uma barreira em forma de membrana em defeitos ósseos atuaria através da osteopromoção, isto é, além de manter a concentração dos fatores estimulantes da osteogênese, protegeria fisicamente a área do defeito contra a invasão por tecidos moles circundantes altamente proliferantes, prevenindo a inibição celular heterotópica e delimitaria a osteogênese no contorno ósseo desejado (LINDE *et al.*, 1993; ZELLIN; LINDE, 1997) (Figura 4). A quantidade de neoformação óssea depende do volume de espaço criado pelas barreiras físicas (MACEDO *et al.*, 2003). A regeneração tecidual guiada baseada na cobertura radicular pode ser utilizada com sucesso para reparar defeitos de recessão gengival (AL-HAMDAN *et al.*, 2003). Estudos em animais indicam que a cobertura radicular utilizando membranas reabsorvíveis resulta em maior quantidade de tecido conjuntivo, osso e cimento, quando comparado com a cirurgia de retalho apical tradicional (LEE *et al.*, 2002).

Posteriormente, estudos foram realizados, utilizando-se membranas para a regeneração apenas de tecido ósseo, procedimento denominado Regeneração Óssea Guiada (ROG) (DAHLIN *et al.*, 1988; DAHLIN *et al.*, 1989; BUNYARATAVEJ; WANG, 2001; IMBRONITO; ARANA-CHAVEZ; TODESCAN, 2007). O primeiro estudo em animais, com o objetivo de avaliar a possibilidade da aplicação do princípio da regeneração tecidual guiada na regeneração óssea foi conduzido por Dahlin *et al.* (1988). Defeitos ósseos do tipo "lado a lado" com 5mm de diâmetro, no ângulo da mandíbula de ratos, recobertos, tanto no lado lingual como no vestibular, com uma membrana de politetrafluoretileno expandido (PTFE-e) tiveram completo preenchimento ósseo no lado teste após 6 semanas. No lado controle, nenhum preenchimento ósseo foi observado durante o experimento (DAHLIN *et al.*, 1988). Com base na técnica de Dahlin *et al.* (1988), Buser *et al.* (1993) propuseram o termo

de regeneração óssea guiada (ROG), que tem o objetivo de promover o aumento ósseo com o uso de barreiras de membranas. Essa técnica tem sido aplicada em odontologia incluído implantes dentários com insuficiente volume ósseo no sítio receptor.

A morfologia do defeito ósseo a ser tratado é um dos fatores importantes a serem considerados na ROG, já que existe uma íntima correlação espacial entre angiogênese e a regeneração óssea. A formação de capilares precede a formação óssea, já que o tecido conjuntivo frouxo perivascular, que acompanha os capilares em proliferação, constitui a fonte de células osteoprogenitoras (SCHMID *et al.*, 1997).

Segundo Hardwick, Hayer e Flynn (1995), o princípio da exclusão é apenas um dentre os vários fatores envolvidos no processo da regeneração óssea. Para que a ROG seja alcançada, além da exclusão de determinados tecidos, deve haver também ausência de inflamação decorrente de infecção bacteriana, estabilidade, criação e manutenção de um espaço preenchido por coágulo sangüíneo (DAHLIN *et al.*, 1988; SCHENK *et al.*, 1994).

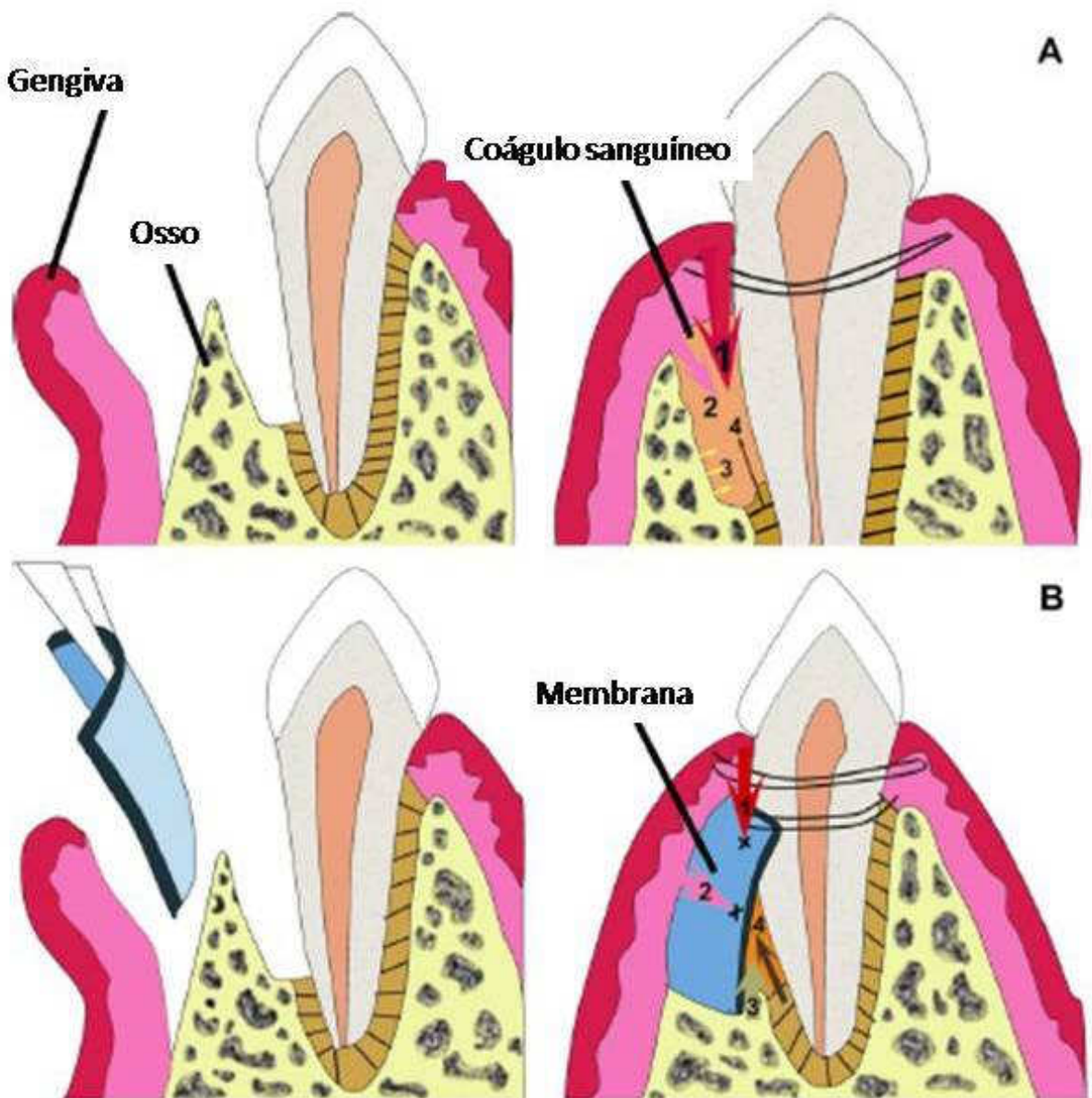
As membranas utilizadas para procedimentos regenerativos devem apresentar as seguintes características: biocompatibilidade, exclusão celular, manutenção de espaço, integração aos tecidos e manuseio clínico satisfatório (SCANTLEBURY, 1993). Tatakis, Promsudthi e Wikesjo (1999) incluíram uma nova característica: atividade biológica que, segundo os autores, teria importância no desenvolvimento de novas membranas. Biocompatibilidade é a propriedade do material que indica que a presença do material não afeta negativamente o organismo e também que o organismo não afeta negativamente o material. Tal definição deve considerar o tipo de biomaterial empregado, já que é evidente que um material reabsorvível é afetado pelo organismo (HARDWICK; HAYES; FLYNN, 1995). A manutenção de espaço adequado para a regeneração requer que a membrana tenha características mecânicas ou estruturais que permitam que suporte forças exercidas pela tensão dos retalhos ou decorrentes da mastigação, prevenindo o colapso da mesma sobre o defeito, reduzindo o espaço da ferida (HARDWICK; HAYES; FLYNN, 1995).

A membrana também deve permitir ou facilitar a integração dos tecidos, o que resulta na estabilização da ferida e inibição da migração de células epiteliais. Também, a integração do tecido conjuntivo adjacente permite a estabilidade

necessária para a reparação óssea e também do tecido mole. A formação óssea depende de dois requisitos indispensáveis: amplo suporte sanguíneo e suporte mecânico (HARDWICK; HAYES; FLYNN, 1995).

Os osteoblastos sintetizam matriz óssea apenas nas proximidades dos vasos sanguíneos (SCHMID *et al.*, 1997). Redução na tensão de oxigênio parece mudar a expressão genética das células para tecido fibroso e fibrocartilagem. Por outro lado, a elaboração de tecido ósseo bastante organizado requer uma superfície mecanicamente estável. A facilidade de manuseio também é uma característica importante, já que uma membrana deve ser facilmente recortada e moldar-se ao contorno do tecido ósseo e não apresentar características de memória que as faça voltar à forma original (TATAKIS; PROMSUDTHI; WIKESJO, 1999).

Figura 4: Diagrama esquemático de técnicas usadas em cirurgia periodontal.



A) Debridamento com retalho aberto, procedimento envolve o descolamento apical da gengiva sobre o dente e tecido ósseo, aumentando o acesso para raspagem e alisamento radicular. Entretanto, o espaço será preenchido com as primeiras células a alcançarem a área, como as células epiteliais e fibroblastos, originando um tecido fibro-epitelial sobre a superfície radicular, desde que o crescimento de osso e tecido periodontal são inibidos. B) Regeneração tecidual guiada: procedimento cirúrgico que utiliza barreiras de membranas posicionadas sob a gengiva e sobre o osso remanescente, para prevenir o crescimento de tecido epitelial e conjuntivo, na ferida cirúrgica, mantendo o espaço para o crescimento dos tecidos periodontais verdadeiros. Fonte: Chen *et al.*, 2010.

1.4 Membranas não reabsorvíveis e reabsorvíveis

As membranas utilizadas na RTG e ROG podem ser não reabsorvíveis (NR) ou reabsorvíveis (R). As membranas NR mantêm a integridade estrutural e suas características pelo tempo que permanecerem no lugar, mas necessitam de uma reabertura cirúrgica para a sua remoção. A elevação do retalho, para a remoção da membrana não absorvível, pode causar injúria aos neo-tecidos. Salienta-se que esses tecidos imaturos devem ser totalmente recobertos pelo retalho da reabertura, porque, na impossibilidade desse recobrimento total, haverá menor “regeneração” periodontal (MCALLISTER; HAGHIGHAT, 2007). Uma das conseqüências da remoção de membranas não reabsorvíveis é a diminuição significativa do tecido ósseo neo-formado em volume e em altura (RASMUSSEN *et al.*, 1997). Contrariamente, superioridade da membrana não reabsorvível, com maior quantidade de tecido ósseo regenerado foi observada (HÜRZELER *et al.*, 1997).

Com relação às membranas não reabsorvíveis, tem-se principalmente a membrana de politetrafluoretileno expandido (e-PTFE), podendo ser reforçada por titânio (SIMON *et al.*, 1999; SIMON *et al.*, 2007). A introdução da membrana não absorvível de politetrafluoretileno (PTFE) ou politetrafluoretileno expandido (PTFE-e), no início dos anos 80, representou um avanço significativo na terapia reconstrutiva. PTFE é um polímero de fluorcarbono inerte e biocompatível. PTFE-e é uma matriz complexa, organizada e tridimensional de nódulos interconectados por fibrilas, que podem ser fabricados com diferentes porosidades e estruturas (TATAKIS; PROMSUDTHI; WIKESJO, 1999). As membranas de PTFE-e para ROG apresentam duas configurações diferentes. Na porção central da membrana, a estrutura do PTFE-e apresenta porosidades entre 5 e 10 µm, sendo oclusiva à penetração de células do tecido conjuntivo. A porção mais periférica apresenta uma micro-estrutura mais aberta, permitindo o crescimento de células do tecido conjuntivo, garantindo a estabilização da membrana (SIMION *et al.*, 1999). Simion *et al.* (1999), ao testarem 3 tipos de membranas de PTFE-e, com microestruturas diferentes, observaram que melhores resultados foram obtidos com a membrana que apresentava a porção periférica com microestrutura aberta (poros entre 20 a 25 µm) e a porção central totalmente oclusiva. Apesar da resposta biológica mais satisfatória, a remoção da membrana após 6 meses foi extremamente difícil. O

material é biocompatível e não reativo. Nas versões iniciais, o politetrafluoretileno expandido (e-PTFE) era altamente poroso, o que tornava difícil a remoção do material (necessidade de reentrada) e vulnerável a invasão bacteriana (o fechamento primário dos tecidos moles é pré-requisito para o sucesso terapêutico). A segunda geração (d-PTFE) manteve as qualidades da versão inicial e adicionou alta densidade e porosidade submícron ($<0,2 \mu\text{m}$) para suplantar as deficiências iniciais (dificuldade de remoção e possibilidade de infecção na ocorrência de deiscência dos tecidos moles). Essa densidade elevada evita a necessidade de anestesia local e retalho para dissecação da membrana (BARBER *et al.*, 2007).

As membranas também podem ser constituídas por materiais reabsorvíveis. São aqueles compostos por polímeros sólidos que podem ser degradados e absorvidos *in vivo*, isto é, são eliminados através de vias naturais por simples filtração dos produtos da degradação ou após sua metabolização. Assim, reabsorção é um conceito que indica a total eliminação do material inicial e dos seus sub-produtos (compostos de baixo peso molecular), sem efeitos colaterais residuais (VERT; GARREAU, 1992). Alguns exemplos de membranas reabsorvíveis são as membranas de colágeno (PITARU; TAL; SOLDINGER, 1989), membranas de ácido polilático e/ou poliglicólico (GÓMEZ *et al.*, 2006; GIELKENS *et al.*, 2008), membrana de monômero de fibrina e elastina, membranas de Vicryl (Polyglactin 910) (FLEISHER; DE WAAL; BLOOM, 1988) e quitosana (SHIN *et al.*, 2005).

As membranas absorvíveis não carecem de reabertura para a sua remoção. Contudo, a exposição ao meio bucal aumenta a taxa de degradação dessas membranas, que são classificadas em duas categorias: naturais ou sintéticas.

As membranas naturais são confeccionadas com tipos diversos de colágeno de origem xenógena (origem animal). As sintéticas são feitas de poliésteres alifáticos, primariamente copolímeros ácidos (lático e glicólico): poliglactina 910, ácido polilático, co-polímero de ácido polilático e ácido poliglicólico, entre outros. Os polímeros sintéticos apresentam algumas vantagens sobre materiais naturais como o colágeno. Materiais sintéticos podem ser preparados em condições controladas e as propriedades físicas, químicas e mecânicas podem ser alteradas com simples mudanças químicas (HUTMACHER; HURZELER; SCHIEPHAKE, 1996). As membranas de colágeno sofrem degradação enzimática; e as sintéticas, por

hidrólise. Embora as membranas de colágeno promovam melhor resposta do tecido (durante a degradação), elas apresentam deficiência notória para a manutenção do espaço subjacente à barreira. A degradação dos copolímeros sintéticos gera uma resposta inflamatória dos tecidos conjuntivos, que pode resultar em perda de “regeneração”. Adita-se a existência da variabilidade e carência de controle sobre a taxa de degradação, influenciada por inúmeros fatores, tais como pH local e composição do material (GALGUT, 1990; KON *et al.*, 1991; GALGUT *et al.*, 1991; CORTELLINI; PINI-PRATO; TONETTI, 1996; GIELKENS *et al.*, 2008).

1.5 Membranas reabsorvíveis de colágeno

A principal vantagem relacionada ao uso de membranas de colágeno na RTG estão relacionadas a baixa antigenicidade, biocompatibilidade superior a outros polímeros naturais e controlada bioreabsorção promovida por agentes de ligação cruzada (RAO; JOSEPH, 1988; LEE; SINGLA; LEE, 2001). Ao mesmo tempo, o colágeno estimula a migração de células do ligamento periodontal para o sítio de cicatrização (MINABE *et al.*, 1989; KASAJ *et al.*, 2008). As desvantagens são sua rápida reabsorção, pobre visibilidade quando molhada, tendência ao colapso em defeitos infra-ósseos e possíveis reações alérgicas locais (MENDIETA; WILLIAMS, 1994). Membranas confeccionadas a partir de colágeno não mineralizadas são normalmente não resistentes e difíceis de manipular (LIAO *et al.*, 2005).

O colágeno é uma proteína fibrosa formada por 3 cadeias polipeptídicas em tripla hélice chamada de cadeia α , sendo esta a principal macromolécula extracelular do tecido conjuntivo periodontal. Existem cerca de 19 tipos de colágeno, dos quais os mais conhecidos e abundantes são os colágenos tipos I e II (SEAL; OTERO; PANITCH, 2001). Cerca de 90% do colágeno humano é do tipo I, encontrado em ossos e pele, sendo o colágeno do tipo II o principal constituinte da cartilagem. Os vários tipos de colágeno mostraram ser quimiotáticos para fibroblastos humanos, absorvíveis fisiologicamente pelos tecidos, servem de suporte para crescimento celular na engenharia de tecidos, apresentam disponibilidade e abundância na natureza e fácil manuseio, podendo ser modelados em diversas formas (LEE; SINGLA; LEE, 2001). O colágeno tipo I é geralmente usado na sua forma nativa ou reconstituída, para o reparo de tecidos moles e na regeneração

óssea (PACHENCE, 1996). A presença de grupos extra-carboxílicos aumenta suas propriedades dielétricas (GÓES *et al.*, 2002).

O padrão de reabsorção das membranas é controlado pelo grau de ligação cruzada (reticulação), persistindo como barreira intacta por períodos de tempo maiores que as membranas sem ligação cruzada (MARTINS *et al.*, 2001). As membranas com ligação cruzada permitem uma degradação mais lenta, fornecendo mais tempo para que as células seletivas repopulem as áreas cirúrgicas (BUNYARATAVEJ; WANG, 2001). Várias técnicas de ligação cruzada para o colágeno têm sido aplicadas para prolongar a reabsorção da membrana e aumentar a biodurabilidade, tais como radiação ultra-violeta, tratamento com glutaraldeído, hexametilenodiisocianato ou difenil-fosforil-azida (BUNYARATAVEJ; WANG, 2001, MINABE *et al.*, 1989; KODAMA *et al.*, 1989). Estas membranas podem ser utilizadas em aplicações odontológica para o reparo de defeitos periodontais, como membranas para recobrimento de defeito cirúrgico ósseo e como substitutos ósseos. Foram encontradas aplicações adicionais para a cicatrização da pele, como carreadores de antibióticos, como carreadores para fatores de crescimento ósseos entre outras aplicações (LIAO *et al.*, 2005).

As propriedades mecânicas, físicas, químicas e biológicas dos arcabouços de colágeno podem ser influenciadas pela modificação na estrutura da matriz pelo tratamento químico com glutaraldeído (GA), que é um agente de referência para a reação de reticulação. A reabsorção do colágeno no ser vivo, pode ser controlada por essa reação de reticulação. Alguns autores têm avaliado a utilização de colágeno reticulado com glutaraldeído no crescimento de fibroblastos com alta eficiência biológica (CHEN *et al.*, 2005). A reação do GA ocorre entre os grupos amino da cadeia lateral das moléculas de colágeno, criando uma armação no material que aumenta a estabilidade mecânica e biológica. Alguns problemas relacionados à reação do GA, como a polimerização dos monômeros do GA em solução resultando em reticulação heterogênea e citotoxicidade, tem sido resolvidas pela contínua reação do GA em baixas concentrações. Esse método pode produzir um material com o mesmo padrão de degradabilidade usando menor quantidade de GA, evitando o efeito citotóxico. O progressivo tratamento em baixas concentrações de GA induz reações mais homogêneas na matriz de colágeno (GOISSIS *et al.*,

2009). As membranas de colágeno com elevado grau de ligação cruzada permanecem intactas por longos períodos de tempo. Isso permite a cicatrização de extensos defeitos e pode preservar sua integridade se exposta espontaneamente ao meio (BRUNEL *et al.*, 1996; FRIEDMANN *et al.*, 2001; FRIEDMANN *et al.*, 2002; MOSES *et al.*, 2005; ROTHAMEL *et al.*, 2005). Entretanto essas membranas apresentam reduzida integração e vascularização com os tecidos circunvizinhos e em estudos clínicos mostram uma grande incidência de exposição espontânea em sua aplicação na cavidade oral (ROTHAMEL *et al.*, 2005).

Sabe-se que o colágeno apresenta diferentes efeitos na cicatrização tecidual dependendo do tipo, estrutura, grau de ligação cruzada e tratamento químico realizado. Dentre os materiais sintetizados de colágeno, as membranas apresentam como vantagem a alteração de suas propriedades por modificações químicas do colágeno, fato que pode melhorar as características do colágeno em termos de estimulação da osteogênese, bem como das propriedades elétricas (PELPIS; GOISSIS; DAS-GUPTA, 1996). Uma importante modificação na estrutura dessas membranas é a remoção do grupo carboxamida dos resíduos de asparagina e glutamina pela hidrólise alcalina e conseqüente formação de grupos carboxila presentes na cadeia α do tropo-colágeno, gerando novos sítios de ligação do cálcio (GOISSIS *et al.*, 1999; BET; GOISSIS; LACERDA, 2001; GOISSIS; MAGINADOR; MARTINS, 2003). Estas modificações não alteram a estrutura de tripla hélice da molécula de colágeno, mas modificam o padrão das microfibrilas e suas propriedades dielétricas. O ponto isoelétrico é reduzido para 4,6–5,0 comparado com o colágeno nativo, onde o ponto isoelétrico varia de 6,7-7,1. Essas membranas são negativamente carregadas em pH fisiológico (CIRELL, 1997; GOISSIS *et al.*, 1999; BET; GOISSIS; LACERDA, 2001; ROCHA; GOISSIS; ROSSI, 2002; ROSA *et al.*, 2003). A hidrólise da cadeia lateral de resíduos de glutamina e asparagina ocorreram inicialmente próximo às zonas de *OVERLAP* e *GAP*, evidenciado pela redução das distâncias inter-bandas observadas nesta região (GOISSIS; MAGINADOR; MARTINS, 2003). Estudos têm mostrado que o colágeno polianiônico desenvolvido como suporte para a reconstrução óssea é capaz de induzir a deposição de sais fosfato de cálcio *in vitro*. Essas mudanças dielétricas na matriz de colágeno podem induzir um processo de mineralização de colágeno *in vitro* similar ao estágio de mineralização óssea (MOREIRA *et al.*, 2004). Quando osteoblastos

bovinos foram cultivados em membranas de colágeno aniônico, essas mostraram suficiente biocompatibilidade para o reparo ósseo e a evidência de conexão entre a produção de fosfatase alcalina e o processo de mineralização (MOREIRA *et al.*, 2004). Quando osteoblastos bovinos foram cultivados na matriz de colágeno polianiónico, as membranas promoveram a produção de fosfatase alcalina, seguida pela mineralização dos substratos e diferenciação de osteoblastos *in vitro* (SAADEH, KROSLA, MEHRARA, 2001). O tratamento alcalino aumenta a piezoeletricidade para o colágeno em relação ao colágeno nativo (GÓES *et al.*, 2002). Análise microscópica mostrou uma menor quantidade de crescimento ósseo em áreas que receberam a membrana nativa comparada com defeitos ósseos preenchidos com membranas aniônicas tratadas com solução alcalina por 48 e 96 horas (CUNHA *et al.*, 2008). Independentemente da extensão da hidrólise da cadeia lateral, a estrutura em tripla hélice dos materiais foi preservada com grupos carboxílicos até 87+-17. O umedecimento e a embebição aumentaram linearmente com o aumento do conteúdo dos grupos carboxílicos variando de 46+-12 a 87+-17 e nenhum sinal de citotoxicidade foi detectado. Entretanto, em comparação com o colágeno nativo, a adesão das células K562 às membranas carregadas negativamente foi significativamente aumentado (BET *et al.*, 2003).

Membranas produzidas de colágeno não mineralizado têm sido usadas em RTG para o reparo de defeitos periodontais, entretanto essas membranas são normalmente pouco resistentes e difíceis de manipular (LIAO *et al.*, 2005). Seria desejável desenvolver uma membrana de colágeno que apresentassem força mecânica para suportar o colapso dentro do defeito cirúrgico. Um possível caminho para alcançar esse objetivo seria o desenvolvimento de arcabouços de colágeno com hidroxiapatita para mimetizar as características do osso, aumentar a rigidez da membrana e aumentar o efeito de manutenção do espaço (SCHLIEPHAKE *et al.*, 2004). Os compósitos de colágeno/hidroxiapatita têm atraído significativo interesse, pois possuem excelente bioatividade, osteocondutividade e melhora de suas propriedades mecânicas (DU *et al.*, 1999; DU *et al.*, 2000; CHANG *et al.*, 2001; KIKUCHI *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2006). O compósito de hidroxiapatita nano-carbonada/colágeno (nCHAC) facilita a regeneração óssea induzindo células indiferenciadas do sítio do enxerto a se transformarem em osteoblastos e formar novo osso (estimulando a transformação celular). O compósito também fornece uma

fonte de cálcio para rápida mineralização. Tem sido relatado que polímeros orgânicos contendo grupos carboxila formam apatita na sua superfície, no fluido corporal simulado, se os grupos carboxila tiverem sido previamente combinados com íons cálcio, porque o grupo carboxila induz a nucleação de apatita e libera íons cálcio para acelerar esta nucleação (KAWASHITA *et al.*, 2003; GÓES *et al.*, 2007). Tanahashi *et al.* (1994) desenvolveram um processo biomimético e encontraram que uma camada de hidroxiapatita com a espessura desejada poderia ser formada não apenas em cerâmicas e metais, mas também em membranas de polímeros. Neste processo, apatita é depositada sobre substratos orgânicos, em condições ambientais, em uma solução que simula o fluido corporal tendo concentrações iônicas iguais aquelas do fluido extra-celular humano ou soluções correlatas.

Hidroxiapatita sintética ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) um tipo de fosfato de cálcio, mostra grande afinidade pelo osso constitucional e é amplamente usada como um material substituto para o preenchimento de defeitos ósseos. Um dos requisitos para que a hidroxiapatita tenha união com os polímeros orgânicos é uma boa adesão aos substratos. Na tentativa de aumentar a interação entre a hidroxiapatita inorgânica e os polímeros orgânicos, foram introduzidos grupos polares hidrofílicos como o fosfato, grupos hidroxila e carboxila nos substratos hidrofóbicos (TANAHASHI; MATSUDA, 1997). O grupo carboxila não apenas promove o sítio para a nucleação heterogênea de apatita, mas também contribui para uma alta adesão da camada de apatita com o filme (MIYAZAKI *et al.*, 2003). A quantidade de apatita aderida na membrana de colágeno aniônico (AC) foi muito maior que no colágeno natural (NC) após o mesmo número de ciclos. Membranas de colágeno aniônico contendo grupos carboxílicos formam apatita na sua superfície em um processo de imersão alternado quando seus grupos carboxílicos são totalmente combinados com íons cálcio. Esse resultado fornece uma condição fundamental para a obtenção de um composto colágeno apatita com estrutura análoga ao osso natural (GÓES *et al.*, 2007). Membranas de colágeno polianiônico preparadas por hidrólise de cadeias laterais de asparagina e glutamina foram mineralizadas *in vivo*, sem resposta inflamatória, biodegradação ou reabsorção, com fosfato de cálcio depositado em estreita semelhança com a periodicidade D da montagem das fibrilas de colágeno. *In vitro* os resultados com o mesmo material produziram fibras de colágeno similares em morfologia e características químicas, sugerindo que a amida-hidrólise pode ter

introduzido dentro da matriz, sinais de mineralização controlada para a fibra de colágeno. Microscopia Eletrônica de Transmissão indicou que a amida-hidrólise ocorreu próxima as zonas de *OVERLAP* e *GAP*, como sugerido pela redução da distância interbandas dessa região (GOISSIS; MAGINADOR; MARTINS, 2003). A falta de resposta inflamatória associada ao padrão de mineralização similar ao observado *in vitro* e *in vivo* sugere não só o comportamento biomimético da matriz de colágeno polianiónico, preparado pela hidrólise das cadeias de amida da glutamina e asparagina, mas também um potencial de uso como arcabouço para reconstrução do tecido ósseo (GOISSIS; MAGINADOR; MARTINS, 2003).

1.6 Modelo de defeito ósseo crítico em calota craniana

Quando utilizamos o modelo de defeito ósseo crítico em calvária, devemos observar algumas características pertinentes a esse tipo de estrutura óssea.

O modelo de defeito ósseo crítico em calvária de ratos tem sido usado em diversos estudos para avaliação de regeneração óssea guiada porque é relativamente fácil de controlar e tem baixo risco de complicações (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986; BOSCH *et al.*, 1998; VERNA *et al.*, 2002). Como as pesquisas sobre enxertos ósseos continuam, há a necessidade de ter um modelo animal confiável que possa ser utilizado para avaliação de enxertos antes do uso em humanos. O defeito ósseo crítico em calvária de ratos (DOC) tem sido recomendado antes de testar os biomateriais em espécies filogenéticas mais elevadas (HOLLINGER; KLEINSCHMIDT, 1990). O modelo de DOC em calvária é relevante em pesquisa de metabolismo ósseo, especialmente do osso alveolar, porque apresenta a mesma origem embriológica que a mandíbula. Sem intervenção, o defeito será preenchido com tecido conectivo fibroso ao invés de tecido ósseo, pela maior velocidade de crescimento dos tecidos moles em relação aos tecidos duros.

A capacidade de regeneração limitada da calvária pode ser atribuída ao pobre suprimento sanguíneo e a relativa deficiência de osso medular. Em contraste com muitos ossos longos que possuem uma artéria primária nutriente, não existe essa artéria primária na calvária. A artéria meningeal média fornece o principal suprimento sanguíneo. Os ossos do crânio recebem suprimento sanguíneo acessório de arteríolas provenientes da artéria dural da tábua interna e também de pequenas

arteríolas provenientes da tábua externa. Adicionalmente, sangue arterial entra para a calvária através da inserção dos músculos temporais. Entretanto, pelo fato de ser uma grande área do esqueleto humano que não possui inserção muscular, o suprimento sanguíneo da calvária de humanos é mais pobre do que em outros animais. A capacidade regenerativa da calvária de animais experimentais pode ser considerada melhor que a de humanos (SIROLA, 1960). Morfologicamente e embriologicamente, a calvária tem origem membranosa, se assemelhando aos ossos membranosos da face. Anatomicamente, a calvária consiste de duas placas corticais com regiões de osso medular similar a mandíbula. Fisiologicamente a calvária se assemelha a uma mandíbula atrófica (FRAME, 1980).

Defeito ósseo crítico representa uma condição na qual a osteogênese falhou, no qual o processo normal de reparo fisiológico alcançou o ponto terminal. A patogênese do defeito ósseo crítico envolve 2 mecanismos. Primeiro, o aumento no defeito ósseo para um tamanho no qual possa evitar o perióstio de agir como suporte para a cicatrização. Esse perióstio sem suporte pode invaginar para dentro do segmento formando uma barreira fibrosa, evitando a união dos fragmentos. Segundo, o hematoma ocasionado no tempo da injúria pode não ser capaz de organizar uma ponte no defeito largo. O fator necessário para a migração de vasos sanguíneos e outros elementos osteogênicos estão ausentes, fazendo o reparo completo impossível (SCHMITZ; HOLLINGER, 1985). Em calvária de ratos, defeitos de 5 mm são considerados defeitos ósseos críticos (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986).

1.7 Justificativa

A doença periodontal leva a uma destruição progressiva dos tecidos de suporte dos dentes, ou seja, osso alveolar, ligamento periodontal e cemento radicular, sendo uma das principais causas de perda dentária em adultos. Os dentes não são apenas essenciais para a mastigação mas sua falta também é considerada uma desvantagem social devido a problemas de fala e estética, que ocasionam um grande impacto sobre bem-estar emocional. Além de afetar a sustentação dos dentes, evidência atual sugere também que periodontite crônica tem um risco associado de complicações sistêmicas. Esta condição é mais predominante entre adultos de meia idade e sua incidência aumenta à medida que uma população envelhece. Geralmente, a periodontite é mais prevalente nos países em desenvolvimento, embora essa doença possa não ser necessariamente mais extensa ou grave em populações suburbanas em comparação com populações em cidades centrais (PIHLSTROM; MICHALOWICZ; JOHNSON, 2005).

Um resultado ideal no tratamento da doença periodontal é retornar os tecidos ao seu estado original antes da perda tecidual. Especificamente na Odontologia, um problema comum é o crescimento do epitélio juncional da gengiva, que possui velocidade de proliferação maior que os tecidos constituintes do periodonto de sustentação (osso alveolar, ligamento periodontal e cemento radicular), prejudicando a regeneração desses tecidos. No sentido de contornar essa dificuldade foi proposta a utilização de membranas ou barreiras biológicas para impedir o epitélio de proliferar e ocupar o espaço onde se deseja a regeneração periodontal, caracterizando a técnica denominada de regeneração Tecidual guiada (RTG). Seguindo este conceito, a regeneração periodontal é definida como a reprodução ou reconstituição dos tecidos perdidos ou afetados de modo que a forma e a função dessas estruturas sejam restauradas (RIPAMONTI; PETIT, 2009; BOSSHARDT; SCULEAN, 2009). O tratamento de defeitos ósseos tem sido um grande obstáculo para as áreas de ortopedia e odontologia (cirurgia maxilo-facial e implantodontia), motivando inúmeros estudos na busca por técnicas ou substitutos ósseos adequados. Quando se deseja apenas que osso seja formado, falamos de regeneração óssea guiada (ROG).

A fabricação de materiais híbridos consistindo de apatita e colágeno ou polímeros orgânicos, que mimetizam a estrutura óssea, abre uma nova perspectiva

para materiais que estimulam o reparo ósseo, possuindo as características de adesão à estrutura óssea e propriedades mecânicas similares ao osso natural. Os arcabouços biodegradáveis são biomateriais que podem servir como suportes temporários estimulando a regeneração do tecido ósseo, se degradando gradualmente enquanto é substituído por um novo tecido. Tanto as cerâmicas bioativas quanto polímeros podem ser desenvolvidos para serem usados como arcabouços. Com os biopolímeros, no entanto, é possível controlar a biodegradabilidade e suas propriedades mecânicas, através de reação de reticulação, de acordo com a aplicação desejada.

1.8 Objetivos

O objetivo geral do nosso estudo foi testar membranas reabsorvíveis de colágeno mineralizadas e reticuladas intermolecularmente com baixas concentrações de glutaraldeído, manufaturadas pelo Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará. Com essa finalidade dividimos nosso estudo em 2 etapas. Inicialmente avaliamos a biocompatibilidade e a biodegradação das diversas membranas. Na segunda etapa avaliamos o efeito das membranas na regeneração óssea guiada usando defeito ósseo crítico em calvária de ratos (DOC).

Os objetivos específicos, discriminados de acordo com a subdivisão apresentada acima, foram:

1° Etapa: Avaliação da biocompatibilidade de membranas de colágeno polianiônico mineralizadas e reticuladas implantadas em tecido subcutâneo de ratos

- Avaliar e quantificar a intensidade de inflamação tecidual desencadeada pelos diferentes tipos de membranas analisadas, através da contagem de células inflamatórias ao redor das membranas.
- Avaliar e quantificar a presença de cápsula fibrosa envolvendo as membranas analisadas, mensurando sua espessura.
- Determinar o tempo de reabsorção de cada tipo de membrana.

2° Etapa: Avaliação da regeneração óssea guiada produzida por membranas de colágeno mineralizadas e reticuladas em defeitos críticos em calvária de ratos.

- Avaliar e quantificar a intensidade de inflamação tecidual desencadeada pelos diferentes tipos de membranas analisadas.
- Determinar o tipo de membrana que induz o fechamento do defeito ósseo em menor tempo possível.
- Determinar o tempo de reabsorção de cada tipo de membrana.

2 MATERIAIS E MÉTODOS COMUNS ÀS DUAS ETAPAS DO PRESENTE TRABALHO

2.1 Preparação das membranas de colágeno polianiónico (CPA)

As membranas absorvíveis testadas neste projeto, produzidas pelo Grupo de Biomateriais do Laboratório de Telecomunicações e Engenharia e Ciência dos Materiais (LOCEM) do Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará (UFC), foram obtidas de fibras de colágeno solúvel, completamente processado, livre de células, lipídios e proteínas imunogênicas, extraído a partir de tecido conjuntivo de intestino de animais jovens (bovinos).

O colágeno aniônico foi preparado de serosa de intestino bovino por hidrólise alcalina seletiva de cadeias laterais de carboxiamidas de resíduos de aminoácidos asparagina e glutamina presentes nas moléculas de colágeno (GOISSIS *et al.*, 1999). Para hidrolisar os grupos amidas seletivamente, 50g de serosa de intestino bovino, em estado úmido, foram tratadas a 20 °C por 48 h com solução alcalina (3 ml de solução/g de tecido), sais (cloridos e sulfatos), bases alcalinas (K^+ e Na^+) e metais alcalinos (Ca^{2+}). Os materiais resultantes foram equilibrados com solução contendo Na_2SO_4 , NaCl, KCl e $CaSO_4$ (6 ml de solução/g de tecido) por um período de 12 h e o excesso de sal foi removido como descrito anteriormente (GOISSIS, MORIAK, 1990). Os materiais foram suspensos em água desionizada, o pH ajustado para 3,5 com ácido acético puro e a mistura homogeneizada em um liquidificador. A concentração do colágeno polianiónico solúvel foi 10 mg/g, como determinado pela análise de hidroxiprolina (STEGEMANN; STALDER 1967). O colágeno aniônico solúvel foi dializado 0,13 M, pH 7,4 em tampão fosfato e o material resultante foi centrifugado a 5.000 rpm a 15°C para formar um gel de colágeno com concentração de 30 mg/g. O gel de colágeno aniônico foi dispensado em moldes de acrílico em solução tampão fosfato (0,13 mol/L em pH 7,4) e secos em capela de fluxo laminar. É desejável após secagem das membranas uma concentração de colágeno por unidade de área da membrana em torno de 1 mg/cm². As membranas foram caracterizadas por técnicas como Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Espectroscopia no infravermelho e Microscopia Eletrônica de Varredura (Figura 5).

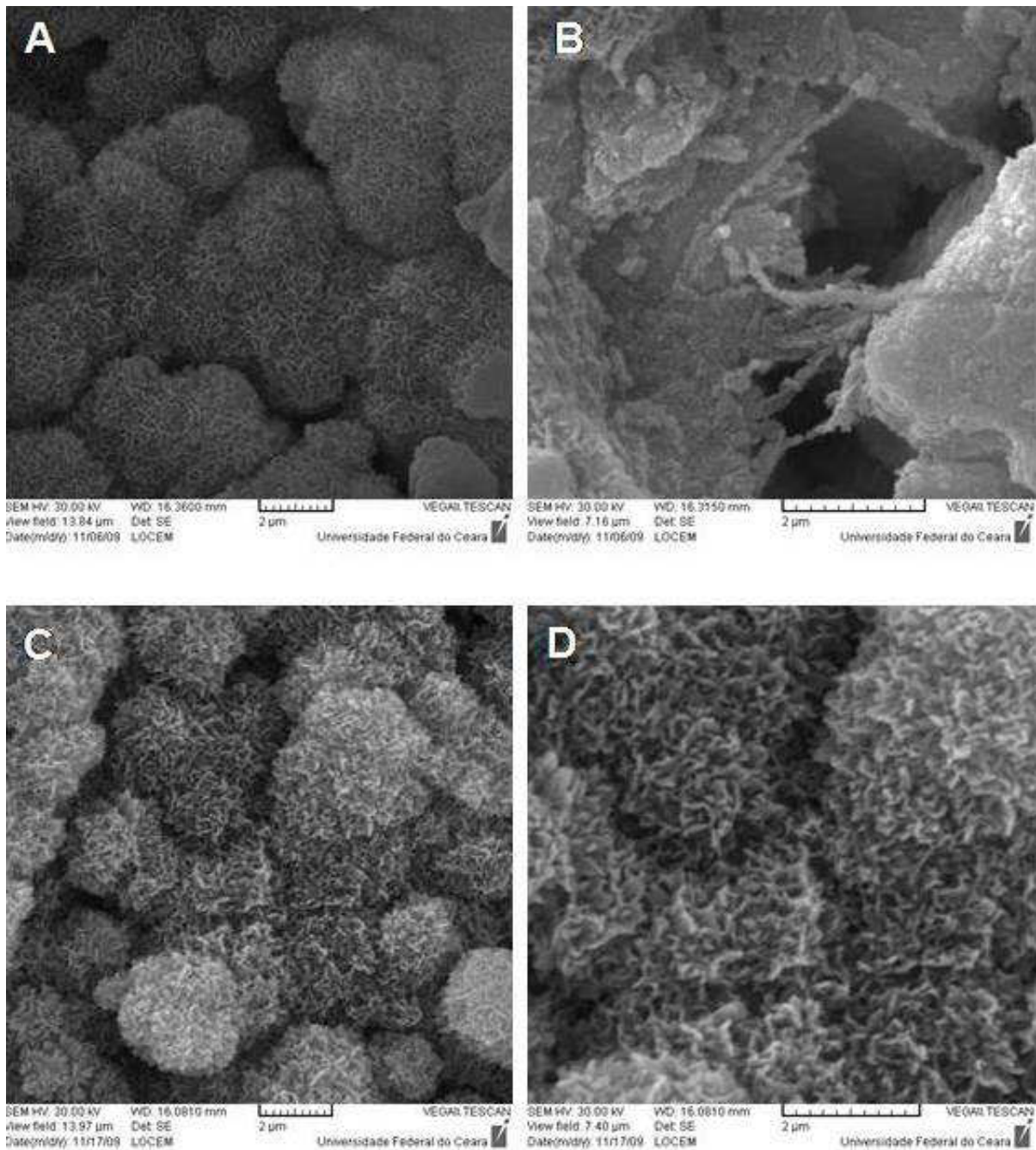
2.2 Processo de mineralização das membranas de colágeno polianiónico

A cobertura de apatita sobre as membranas foi realizada pelo processo de imersões alternadas descrito por Tagushi *et al.* (2001) e modificado pelo Grupo de Biomateriais do LOCEM. As membranas de colágeno aniônico (espessura de 0,15 mm), lavadas em água deionizada, foram mineralizadas (pH 9) em um processo consecutivo de 0, 25 e 75 ciclos (amostras: CPA, CPA 25 e CPA 75, respectivamente). Cada ciclo, compreendeu quatro etapas de tratamento em intervalos de 3 min cada, com solução de CaCl_2 0,2mol/L (em tampão Tris-HCl 0,02 mol/L) e solução tampão de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,12 mol/L, intercalados por duas lavagens em água destilada (2 min cada) para remover o excesso de solução não incorporada a matriz. O grau de mineralização foi dado pelo número de ciclos do processo. Ao final do tratamento as amostras foram secas em capela de fluxo laminar.

2.3 Reticulação das membranas de colágeno mineralizadas com glutaraldeído (GA)

As membranas de colágeno mineralizadas (0, 25 e 75 ciclos de imersão em solução contendo cálcio e fosfato), foram tratadas progressivamente, à temperatura ambiente, com 50 mL de solução de glutaraldeído (preparada em solução tampão fosfato 0,13 mol/L a pH 7,4) nas concentrações 0,01% (1h) e 0,05% (7h). Após a reação, as amostras foram imersas em solução de glicina: borato (0,025 mol/L: 0,05 mol/L a pH 9,2) (3 vezes por 15 min), lavadas em solução tampão fosfato 0,13 mol/L (pH 7,4) e a seguir em água deionizada (4 vezes por 20min) e secas em capela de fluxo laminar para os ensaios biológicos (amostras: CPA GA, CPA 25GA e CPA 75GA) (Figura 5).

Figura 5: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de membranas mineralizadas de colágeno (CPA 25GA e CPA 75).



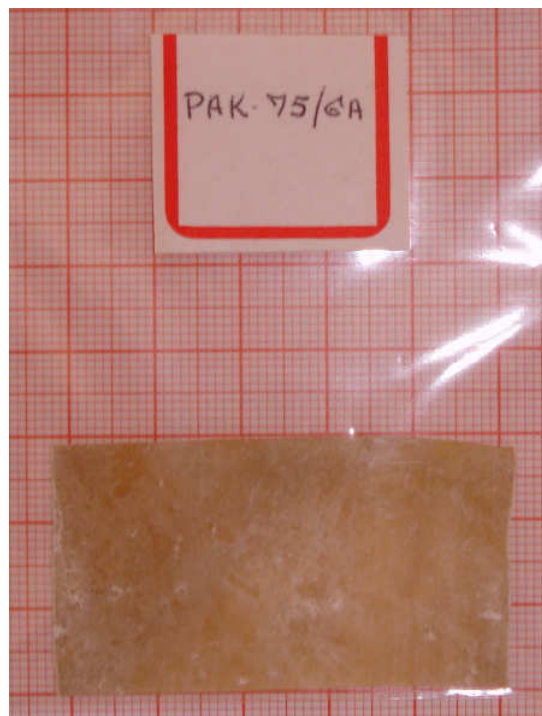
(A) Com CPA 25GA em aumento de 10000x (10k), verifica-se a formação de uma camada porosa e esponjosa dos cristais de HA, (B) com maior aproximação 20000x (20K) observa-se a presença de fibras mineralizadas de colágeno. (C) Com CPA 75: a morfologia esponja-porosa dos cristais de HA recobre completamente a superfície da membrana, aumento de 10000x (10k) e (D) aumento de 20000x(20K).

Fonte: Ilustração cedida pelo Prof Dr. Júlio Góes, do Departamento de Física da UFC.

2.4 Esterilização das membranas de colágeno polianiônico

As membranas confeccionadas foram recortadas sobre um papel milimetrado (**quadrados de 5x5 mm, 1° etapa; círculos de 8 mm de diâmetro, 2° etapa**) embaladas em grau cirúrgico e enviadas para esterilização por radiação gama (25K γ G) (Embrarad, Cotia, São Paulo, Brasil) (Figura 6).

Figura 6: Membrana de colágeno impregnada com 75 ciclos de hidroxiapatita e reticulada com glutaraldeído (CPA 75GA).



Membranas fabricadas pelo Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará. Essas membranas foram cortadas, sobre um papel milimetrado, em quadrados de 5x5 mm ou círculos com 8 mm de diâmetro e enviadas para esterilização por radiação gama. Fonte: arquivo pessoal.

3 MATERIAIS E MÉTODOS INERENTES A 1° ETAPA DO PRESENTE TRABALHO

3.1 Membranas de colágeno polianiônico

Membranas de colágeno polianiônico (CPA), obtidas de serosa de intestino bovino, mineralizadas com hidroxiapatita (25°C, em 0, 25 ou 75 ciclos consecutivos de imersão em solução contendo cálcio e fosfato) (pH 9,0) (amostras: CPA, CPA 25, CPA 75, respectivamente) e reticuladas com glutaraldeído (amostras: CPA GA, CPA 25GA e CPA 75GA, respectivamente) foram usadas. Nesse estudo uma membrana desmineralizada de cortical óssea bovina (Genderm, Genius, Baumer S.A., Brasil) foi usada como controle.

3.2 Animais

Os procedimentos cirúrgicos e o protocolo de tratamento foram conduzidos de acordo com a Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA, UFC), de acordo com o protocolo de número 20/09 (Anexo A). Os animais, provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (UFC), foram mantidos sob condições de temperatura entre 22 e 24°C e ciclos de 12h–12h claro e escuro controlados durante os experimentos. Estes foram alojados em gaiolas apropriadas, em número de seis animais em cada uma delas, com alimentação balanceada à base de ração. A água foi disponibilizada à vontade. Todos os esforços foram realizados no sentido de reduzir o número de animais utilizados, a dor, o sofrimento e o estresse dos mesmos.

Foram utilizados para o teste em tecido subcutâneo, 48 ratos machos (*Rattus Norvegicus*, albinos, Wistar) com massa corpórea entre 180 e 200 gramas. Os animais foram divididos em 7 grupos experimentais de 6 animais cada, onde cada animal recebeu as diferentes membranas.

- I- **Grupo Controle:** recebeu a membrana de colágeno comercial (Genderm, Baumer, Brasil).
- II- **Grupo CPA:** recebeu a membrana de colágeno sem impregnação com hidroxiapatita.
- III- **Grupo CPA 25:** recebeu a membrana de colágeno com 25 ciclos de impregnação com hidroxiapatita.
- IV- **Grupo CPA 75:** recebeu a membrana de colágeno com 75 ciclos de impregnação com hidroxiapatita.
- V- **Grupo CPA GA:** recebeu a membrana de colágeno reticulada com glutaraldeído e sem impregnação com hidroxiapatita.
- VI- **Grupo CPA 25GA:** recebeu a membrana de colágeno reticulada com glutaraldeído e com 25 ciclos de impregnação com hidroxiapatita.
- VII- **Grupo CPA 75GA:** recebeu a membrana de colágeno reticulada com glutaraldeído e com 75 ciclos de impregnação com hidroxiapatita.

Os ratos foram anestesiados pela injeção intra-peritoneal (IP) de tribromo 0,5% na dose de 500mg/Kg. A tricotomia foi realizada na área dorsal escapular e pélvica seguida a anti-sepsia com solução de álcool iodado. Incisões horizontais de aproximadamente 1cm foram realizadas em 7 locais da superfície dorsal na direção látero-lateral (Figura 7). Com uma tesoura cirúrgica de ponta romba, penetrando através da incisão em direção caudal, o tecido subcutâneo foi divulsionado até o ponto onde as membranas (5 x 5 mm) imersas em solução de fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% foram posicionadas. As incisões foram suturadas com fio de seda 4.0 (Ethicon - Johnson & Johnson, Brasil), seguida pela assepsia com álcool iodado. Os animais foram mantidos sob observação em gaiolas unitárias, por 24 horas, para evitar que se machucassem.

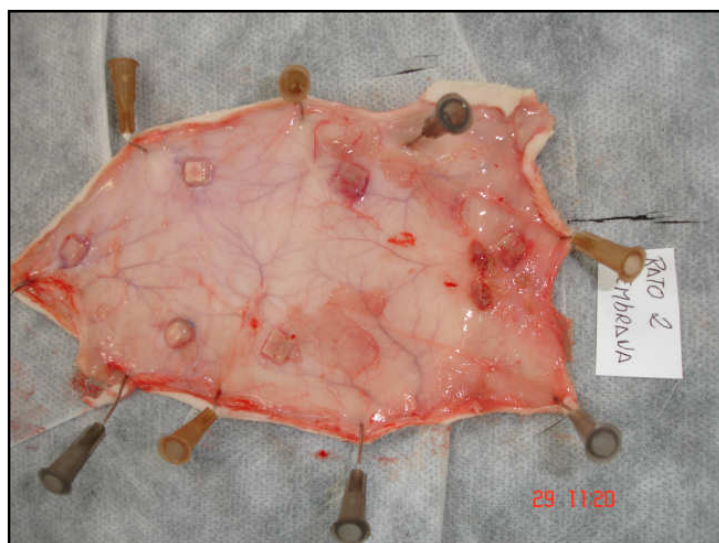
Após 24 horas, 7, 15, 30, 60 e 120 dias, os animais foram sacrificados pela administração intra-peritoneal (IP) de 1,5ml de hidrato de cloral. A pele dorsal foi raspada e os implantes cirurgicamente removidos junto com uma porção do tecido circunjacente (Figura 8).

Figura 7: Sete incisões para colocação das membranas realizadas na região dorsal dos ratos.



Incisões horizontais de aproximadamente 1 cm foram realizadas em 7 locais da superfície dorsal na direção látero-lateral. Fonte: arquivo pessoal.

Figura 8: Remoção das membranas e tecido circunjacente, nos períodos de 1, 7, 15, 30, 60 e 120 dias.



A pele dorsal foi raspada e as membranas cirurgicamente removidas junto com uma porção do tecido circunjacente. Fonte: arquivo pessoal.

Foram coletadas amostras para análises histológicas do infiltrado inflamatório, atividade de mieloperoxidase, dosagem de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-10), avaliação da presença e espessura de cápsula fibrosa, imunohistoquímica para metaloproteinase (MMP-1/8) e avaliação da biodegradação.

3.3 Parâmetros avaliados

3.3.1 Análise histológica

Em cada experimento, amostras de cada membrana e tecido circunvizinho foram removidas de cada animal (seis animais por grupo) para análise histológica (totalizando 36 animais). Os espécimes foram fixados em solução de formol tamponado por 24 horas, desidratados em etanol, clarificados com xilol e embebidos em parafina. A microtomia foi realizada em cortes longitudinais medindo 4 μ m de espessura e os cortes corados pelo método de hematoxilina e eosina (H&E) para avaliação em microscópio óptico da intensidade do infiltrado inflamatório, mensuração da cápsula fibrosa e quantificação da biodegradação das membranas.

3.3.1.1 Intensidade do infiltrado inflamatório

Com o objetivo de avaliar o infiltrado inflamatório, células polimorfonucleares e mononucleares foram contadas em 5 campos por lâmina ao redor da membrana, em grupos de 6 animais cada (X1000) e análise estatística foi realizada.

3.3.1.2 Mensuração da cápsula fibrosa

Com o objetivo de avaliar a espessura de cápsula fibrosa, os cortes foram fotografados no microscópio Leica (40X) e a mensuração linear da cápsula fibrosa (μ m) foi obtida em 3 diferentes localizações nas extremidades e parte central de cada membrana usando *software* NHImage.

3.3.1.3 Biodegradação das membranas

O percentual de reabsorção foi examinado nos dias 1, 7, 15, 30, 60 e 120 dias. Para calcular esse valor os cortes de cada grupo foram fotografados no microscópio Leica (40x) e a área total de cada membrana foi mensurada (μ m²) usando o *software* NHImage. A média calculada serviu como unidade para análise estatística. A área da membrana de cada grupo foi calculada como porcentagem do

respectivo grupo basal (dia 1) de acordo com a fórmula: média da área das membranas analisadas nos dia 7, 15, 30, 60 e 120 dias dividido pela média da área das membranas no grupo basal multiplicado por 100. Considerando que o grupo basal não sofreu reabsorção (0% reabsorvido), o valor foi subtraído de 100 para obter o valor de reabsorção.

3.3.2 Atividade de mieloperoxidase (MPO) no tecido subcutâneo adjacente às membranas

Nos grupos sacrificados 24 horas e 7 dias após a cirurgia, foi realizada a análise da atividade de mieloperoxidase, importante na quantificação da inflamação aguda. As medidas de atividade da mieloperoxidase foram realizadas nos tecidos subcutâneos usando uma versão modificada do método descrito por Bradley, Christensen, Rothstein (1982) e Bradley *et al.*, (1982).

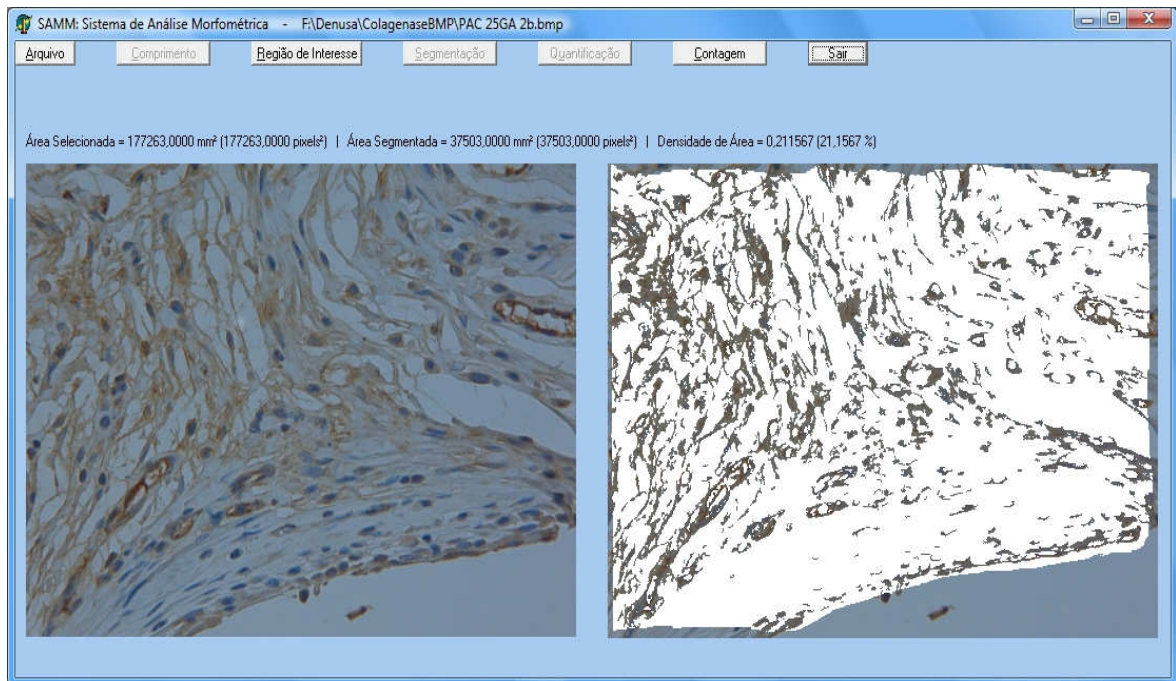
3.3.3 Dosagem de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-10) no tecido subcutâneo adjacente às membranas

As amostras de tecido subcutâneo adjacente às membranas foram removidas dos animais nos dias 1 (n=6) e 7 (n=6) para dosagem de citocinas (totalizando 12 animais). Os espécimes foram armazenados em freezer a -70°C até que a análise fosse realizada. O tecido coletado foi homogeneizado e processado como descrito SaWeh-Garabedian *et al.* (1995). A detecção das concentrações de TNF- α , IL-1 β e IL-10 foram determinadas pelo método de ELISA, como descrito previamente (CUNHA *et al.*, 1993). As placas foram incubadas durante a noite a 4°C com anticorpo anti-rato TNF- α , IL-1 β e IL-10 (2 ug/ml). Após o bloqueio das placas, as amostras foram adicionadas a várias diluições em duplicatas e incubadas a 4°C por 24 h. As placas foram lavadas 3 vezes com solução tampão e o anticorpo policlonal biotilado de ovelha anti-TNF- α , anti-IL-1 β or anti-IL-10 (diluído 1:1000 com tampão 1% BSA) foi adicionado as placas. Após o período de incubação a temperatura ambiente por 1 hora, as placas foram lavadas e 50ul de avidin-HRP (diluição 1:5000) foram adicionados as placas. O reagente colorido o-fenilenodiamina (OPD; 50 μ l) foi adicionado 15 min depois e as placas foram incubadas no escuro 37°C por 15 a 20 min. A reação enzimática foi bloqueada com H₂SO₄ e a absorbância mensurada em 490nm. Os valores mensurados foram expressos em picogramas/mililitro (pg/ml).

3.3.4 Imunohistoquímica para metaloproteinase (MMP1/8)

Imunohistoquímica para metaloproteinase foi realizada com o método de estreptavidina-biotina-peroxidase em cortes de tecido fixados em formalina, parafinizados e montados em lâminas (4µm de espessura) cobertas com poli-L-lisina. Os cortes foram desparafinados e rehidratados pelo tratamento com xilol e concentrações de álcool. Após a recuperação com antígeno, a peroxidase endógena foi bloqueada (15 min) com peróxido de hidrogênio 3% (v/v) e os cortes foram lavados com tampão fosfato (PBS). Os cortes foram incubados durante a noite (4°C) com o anticorpo policlonal primário para coelho MMP-1/8 (H-300) diluído em 1:200 em PBS adicionado a albumina de soro bovino (PBS-BSA). Os cortes foram posteriormente incubados com anticorpo biotilado de cabra anti-coelho diluído 1:400 em PBS-BSA. Após lavagem, os cortes foram incubados com avidina-biotina-horseradish peroxidase conjugada (Strep ABC complexo de Vectastain® ABC *Reagent* e solução substrato de peroxidase) por 30 min, de acordo com o protocolo de Vectastain. Metaloproteinase foi visualizada com o cromóforo 3,3-diaminobenzidina (DAB). Os cortes de controle negativo foram processados simultaneamente como descrito acima, mas o primeiro anticorpo foi substituído com 5% PBS-BSA. Os cortes foram contra-corados com Harry's hematoxilina, desidratado em concentrações de álcool, clarificados em xilol e cobertos com lamínulas. Quatro cortes de cada grupo foram processados. O tecido circunvizinho das 2 extremidades de cada membrana foram fotografados com o microscópio Leica (400x) e analisadas pelo sistema de análise morfométrica (SAMM), um programa de computador que captura o percentual de coloração marrom com objetivo de quantificar o grau de coloração por metaloproteinase (Figura 9).

Figura 9: Análise por imunohistoquímica para metaloproteinase pelo sistema de análise morfológica (SAMM).



Este programa de computador captura o percentual de coloração marrom com objetivo de quantificar o grau de coloração por metaloproteinase. Fonte: arquivo pessoal.

4 MATERIAIS E MÉTODOS INERENTES A 2° ETAPA DO PRESENTE TRABALHO

4.1 Membrana de colágeno polianiónico

Membranas de colágeno polianiónico de serosa de intestino bovino (CPA) mineralizadas a 25°C em 0, 25 ou 75 ciclos consecutivos de imersão com hidroxiapatita (pH 9,0) e reticuladas com glutaraldeído (CPA GA, CPA 25GA e CPA 75GA, respectivamente) foram testadas nesta segunda etapa, por terem apresentado os melhores resultados nas análises de biocompatibilidade e biodegradação. O preparo dessas membranas, assim como a mineralização e a reticulação com glutaraldeído foram descritos anteriormente. Utilizou-se uma membrana desmineralizada de cortical óssea bovina (Genderm, Genius, Baumer S.A., Brasil) como controle.

4.2 Animais

Os procedimentos cirúrgicos e o protocolo de tratamento foram conduzidos de acordo com a Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA, UFC), de acordo com o protocolo de número 25/10 (Anexo B). Os animais, provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (UFC), foram mantidos sob condições de temperatura entre 22 e 24°C e ciclos de 12h–12h claro e escuro controlados durante os experimentos. Estes foram alojados em gaiolas apropriadas, em número de seis animais em cada uma delas, com alimentação balanceada à base de ração. A água foi disponibilizada à vontade. Todos os esforços foram realizados no sentido de reduzir o número de animais utilizados, a dor, o sofrimento e o estresse dos mesmos.

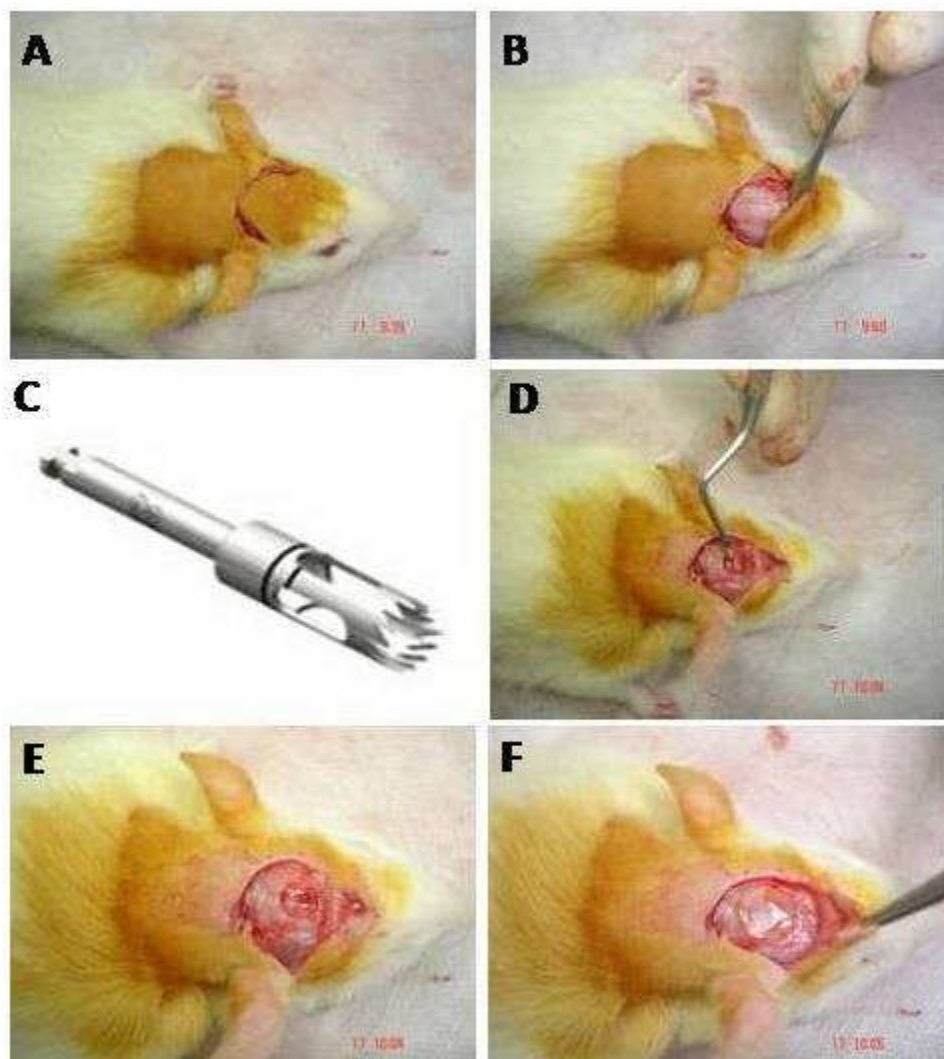
Cento e noventa ratos machos (*Rattus norvegicus*, albinos, Wistar), pesando entre 200-300 g, foram utilizados. Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

- I- **Grupo Sham:** defeito cirúrgico não coberto por membrana de colágeno.
- II- **Grupo Controle:** defeito cirúrgico coberto por membrana de colágeno comercial (Genderm, Baumer, Brasil).
- III- **Grupo CPA GA:** defeito cirúrgico coberto com membrana de colágeno polianiônico (CPA), reticulada com glutaraldeído e sem impregnação com hidroxiapatita.
- IV- **Grupo CPA 25GA:** defeito cirúrgico coberto com membrana de colágeno polianiônico (CPA), reticulada com glutaraldeído e impregnada com 25 ciclos de hidroxiapatita.
- V- **Grupo CPA 75GA:** defeito cirúrgico coberto com membrana de colágeno polianiônico (CPA), reticulada com glutaraldeído e impregnada com 75 ciclos de hidroxiapatita.

Os ratos foram anestesiados pela injeção intra-peritoneal (IP) de tribromo a 0,5% (0,1 mL/100g de peso). Após a assepsia com álcool iodado, uma incisão semi-lunar foi realizada no escalpo na região posterior da calvária, permitindo o levantamento de um retalho de espessura total em direção anterior. Um defeito ósseo crítico de 5,25 mm de diâmetro, foi realizado com broca trefina (Conexão, Brasil) em baixa rotação sob copiosa irrigação com soro fisiológico, com profundidade equivalente a espessura da calvária. O defeito incluiu a sutura sagital. Cada defeito ósseo criado foi recoberto com uma das várias membranas analisadas, recortadas em forma de disco, com 8mm de diâmetro, de acordo com cada grupo (Figura 10). As membranas não foram fixadas ao osso subjacente, apenas posicionadas e mantidas em posição pelo reposicionamento e sutura do tecido mole (Catgut simples 5.0, Plast Suture, Brasil). Cada grupo foi sacrificado com altas doses de hidrato de cloral, 24 horas (6 animais por grupo), 4 (6 animais por grupo), 8 (8 animais por grupo) ou 12 (12 animais por grupo) semanas após o procedimento cirúrgico (totalizando 160 animais). A área do defeito cirúrgico e o tecido circunjacente foram removidos em bloco e fixados em formol tamponado a 10% por 24 horas. Após a realização da radiografia digital e tomografia computadorizada, os blocos foram descalcificados com ácido etilendiaminotetracético (EDTA) a 10%, por aproximadamente 30 dias. Após a descalcificação da calvária, seccionou-se com lâmina de bisturi a área envolvendo o defeito cirúrgico e em seguida os blocos foram

processados e embebidos em parafina. Cortes com espessura de 4 μ m foram realizados em direção longitudinal iniciando próxima ao centro do defeito cirúrgico. Os cortes foram corados em hematoxilina e eosina para análise em microscopia óptica. Os grupos nos quais os animais foram sacrificados 24 horas após o procedimento cirúrgico foram chamados de grupos basais (Figura 10).

Figura 10: Seqüência do procedimento cirúrgico realizado para criação do defeito ósseo-crítico em calvária de ratos.



Após a assepsia com álcool iodado, uma incisão semi-lunar foi realizada no escalpo na região posterior da calvária (A), permitindo o levantamento de um retalho de espessura total em direção anterior (B). Um defeito ósseo crítico de 5,25 mm em diâmetro, foi realizado com broca trefina (C). O fragmento da calota seccionado foi removido cuidadosamente com cureta cirúrgica (D e E). O defeito ósseo criado foi coberto com um disco de cada grupo de membranas utilizadas (8mm de diâmetro), nenhum tipo de fixação das membranas ao osso foi utilizada (F). Fonte: arquivo pessoal.

4.3 Parâmetros avaliados

4.3.1. Avaliação da formação óssea

4.3.1.1 Radiografia digital

Radiografias digitais de todos os espécimes foram realizadas usando o aparelho de raios X (Spectro 70X Seletronic, Dabi Atlante, São Paulo, SP, Brasil) e sensor digital, usando os seguintes parâmetros: 8 mA, 70 kVp, distância foco/filme de 8 cm e tempo de exposição de 0,1 s. As imagens digitais dos espécimes foram analisadas com o programa NIHImageJ. O valor médio da área radiolúcida em pixel/mm foi mensurado para comparar a quantidade de tecido mineralizado produzido em resposta a cada tipo de membrana utilizada. A área radiolúcida é inversamente proporcional à quantidade de osso formado. As mensurações da área radiolúcida foram realizadas em todos os grupos experimentais 4, 8 e 12 semanas após o procedimento cirúrgico. O grupo de animais, sacrificados 24 horas após a cirurgia (grupo basal), foi utilizado como referência para as medidas do defeito ósseo original, uma vez que não foi observada formação óssea nas primeiras 24 horas.

Dessa forma, a neo-formação óssea em cada grupo foi calculada como porcentagem em relação ao grupo basal de acordo com a seguinte fórmula: média da área radiolúcida de cada grupo após 4, 8 e 12 semanas multiplicado por 100 e dividido pela média da área radiolúcida do grupo basal. Como a área radiolúcida do grupo basal corresponde a 100%, o valor resultante foi subtraído de 100, para corresponder ao valor de neo-formação óssea.

4.3.1.2 Tomografia computadorizada

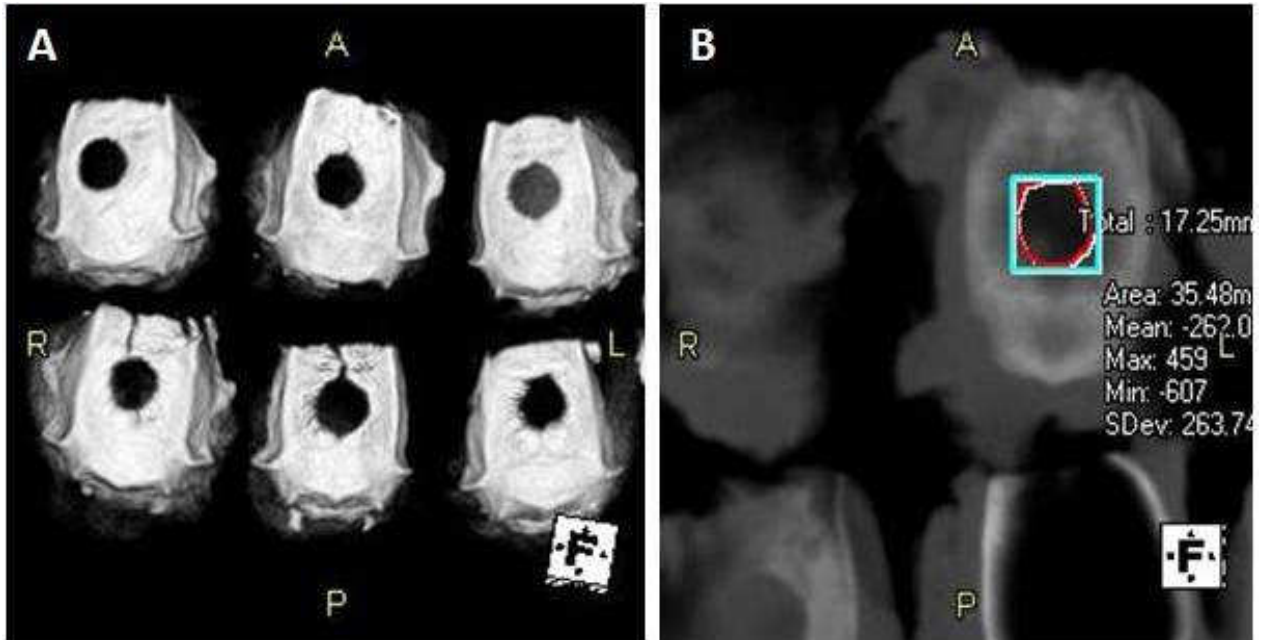
Tomografias computadorizadas foram realizadas utilizando o aparelho de tomografia CT Scanner PreXion 3D (PreXion Co., Ltd. Tokyo, Japan) (90 kV / 4 mA, Resolução 608 x 616, 200 μ m). O melhor corte tomográfico envolvendo o defeito ósseo de cada animal foi selecionado para o cálculo da área radiolúcida 4 e 12 semanas após a cirurgia, com o programa NIHImageJ (Figura 11). Em seguida, o valor médio da área radiolúcida em mm^2 de cada grupo foi mensurado para avaliar a

quantidade de tecido mineralizado produzido em resposta a cada tipo de membrana utilizada, uma vez que a área radiolúcida é inversamente relacionada à formação óssea. O grupo de animais, sacrificados 24 horas após a cirurgia (grupo basal), foi utilizado como referência para as medidas do defeito ósseo original, uma vez que não foi observada formação óssea nas primeiras 24 horas.

4.3.1.3 Densidade radiográfica

Adicionalmente, 12 semanas após o procedimento cirúrgico, foi realizada a análise da densidade radiográfica, ou seja, dos níveis de cinza, de uma área de interesse de 35 mm², selecionada no defeito ósseo de cada animal e expressa em graus de cinza (Figura 11). Densidade radiográfica é uma unidade logarítmica que descreve a relação entre a luz que atinge o filme e luz sendo transmitida através do filme. A maior densidade radiográfica representa áreas mais opacas do filme, e áreas de menor densidade, mais transparentes do filme. Dessa forma, essas leituras possibilitam o acompanhamento da evolução das neoformações ósseas de forma padronizada. Nesse sistema, o diagnóstico fundamenta-se na detecção de diferentes densidades entre imagens que representam as alterações da neoformação óssea. As áreas de formação óssea estão correlacionadas com maior densidade radiográfica (MARTINS *et al.*, 2009). O valor médio da densidade radiográfica obtida de cada grupo foi utilizado para análise estatística.

Figura 11: Visualização das calotas cranianas captadas pelo aparelho de tomografia computadorizada Scanner PreXion 3D



(A) Visualização das calotas cranianas. (B) O melhor corte tomográfico envolvendo o defeito ósseo foi selecionado e as imagens digitais dos espécimes foram analisadas com o programa NIHImageJ . Realizavam-se medições da área radiolúcida, bem como análise da densidade radiográfica na área referente à região de interesse do defeito cirúrgico (35mm²).

4.3.2 Análise histológica

Dois cortes histológicos de cada animal, representando aproximadamente o centro do defeito cirúrgico, foram selecionados com o objetivo de aumentar a confiabilidade dos dados obtidos através da radiografia digital e tomografia computadorizada no que diz respeito à neo-formação óssea. A análise histológica permitiu, ainda, avaliar a presença de cápsula fibrosa envolvendo essas membranas, a fim de calcular a porcentagem de animais, dentro de cada grupo, que apresentavam cápsula nos diversos períodos de observação. Avaliou-se também a reabsorção sofrida por cada tipo de membrana através de imagens capturadas por uma câmera acoplada ao microscópio óptico (aumento de 40x) da região de interesse, correspondente às bordas de cada defeito ósseo. A partir dessas avaliações os seguintes escores foram atribuídos:

Escore 0: Membrana não reabsorvida.

Escore 1: 0 a 25% da membrana reabsorvida.

Escore 2: 26 a 50% da membrana reabsorvida.

Escore 3: 51 a 75% da membrana reabsorvida.

Escore 4: 76 a 100% da membrana reabsorvida.

4.3.3 Atividade de mieloperoxidase (MPO) no tecido subcutâneo adjacente ao defeito da calvária

A atividade de MPO foi mensurada no tecido subcutâneo adjacente ao defeito da calvária, usando uma versão modificada de Bradley, Christensen, Rothstein (1982) e Bradley *et al.*, (1982). Os animais tiveram a amostra do tecido subcutâneo adjacente ao defeito da calvária removido 24 horas após o procedimento cirúrgico para análise da atividade de MPO (totalizando 30 animais). Os espécimes foram armazenados a -70°C até que o ensaio fosse realizado. O tecido foi pesado e triturado usando uma Polytron Ultraturrax em solução tamponada gelada (hexadecyltrimethylammonium bromide-HTAB), e o homogenato centrifugado a 4°C por 15 min (4.200 rpm). O supernadante foi coletado para análise no teste de enzima

ligada a imunossorbância (ELISA) e os valores foram expressos como unidade MPO por miligrama de tecido.

4.3.4 Dosagem de citocinas (TNF- α , IL-1 β) no tecido subcutâneo adjacente ao defeito da calvária

Os animais tiveram a amostra do tecido subcutâneo adjacente ao defeito da calvária removido 24 horas após o procedimento cirúrgico para dosagem de citocinas (totalizando 30 animais, os mesmos utilizados para dosagem de MPO). Os espécimes foram armazenados em freezer a -70°C até que a análise fosse realizada. O tecido coletado foi homogeneizado e processado como descrito SaWeh-Garabedian *et al.* (1995). A detecção das concentrações de TNF- α , IL-1 β foram determinadas pelo método de ELISA, como descrito previamente (CUNHA *et al.*, 1993). As placas foram incubadas durante a noite a 4°C com anticorpo anti-rato TNF- α e IL-1 β (2 μ g/ml). Após o bloqueio das placas, as amostras foram adicionadas a várias diluições em duplicatas e incubadas a 4°C por 24h. As placas foram lavadas 3 vezes com solução tampão e o anticorpo policlonal biotilado de ovelha anti-TNF- α ou anti-IL-1 β (diluído 1:1000 com tampão 1% de albumina bovina sérica, BSA) foi adicionado as placas. Após o período de incubação a temperatura ambiente por 1 hora, as placas foram lavadas e 50 μ l de avidin-HRP (diluição 1:5000) foram adicionados as placas. O reagente colorido *o*-fenilenodiamina (OPD; 50 μ l) foi adicionado 15 min depois e as placas foram incubadas no escuro 37°C por 15 a 20 min. A reação enzimática foi bloqueada com H₂SO₄, e a absorvância mensurada a 490nm. Os valores mensurados foram expressos em picogramas/mililitro (pg/ml).

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni foi usada para comparar a média dos valores observados. A probabilidade do valor $p < 0,05$ foi considerada ter diferença estatística. Ambas as análises foram executadas usando o programa Prism 3 software (Graph-Pad Software Inc., USA).

6 RESULTADOS INERENTES A 1° ETAPA DO PRESENTE TRABALHO

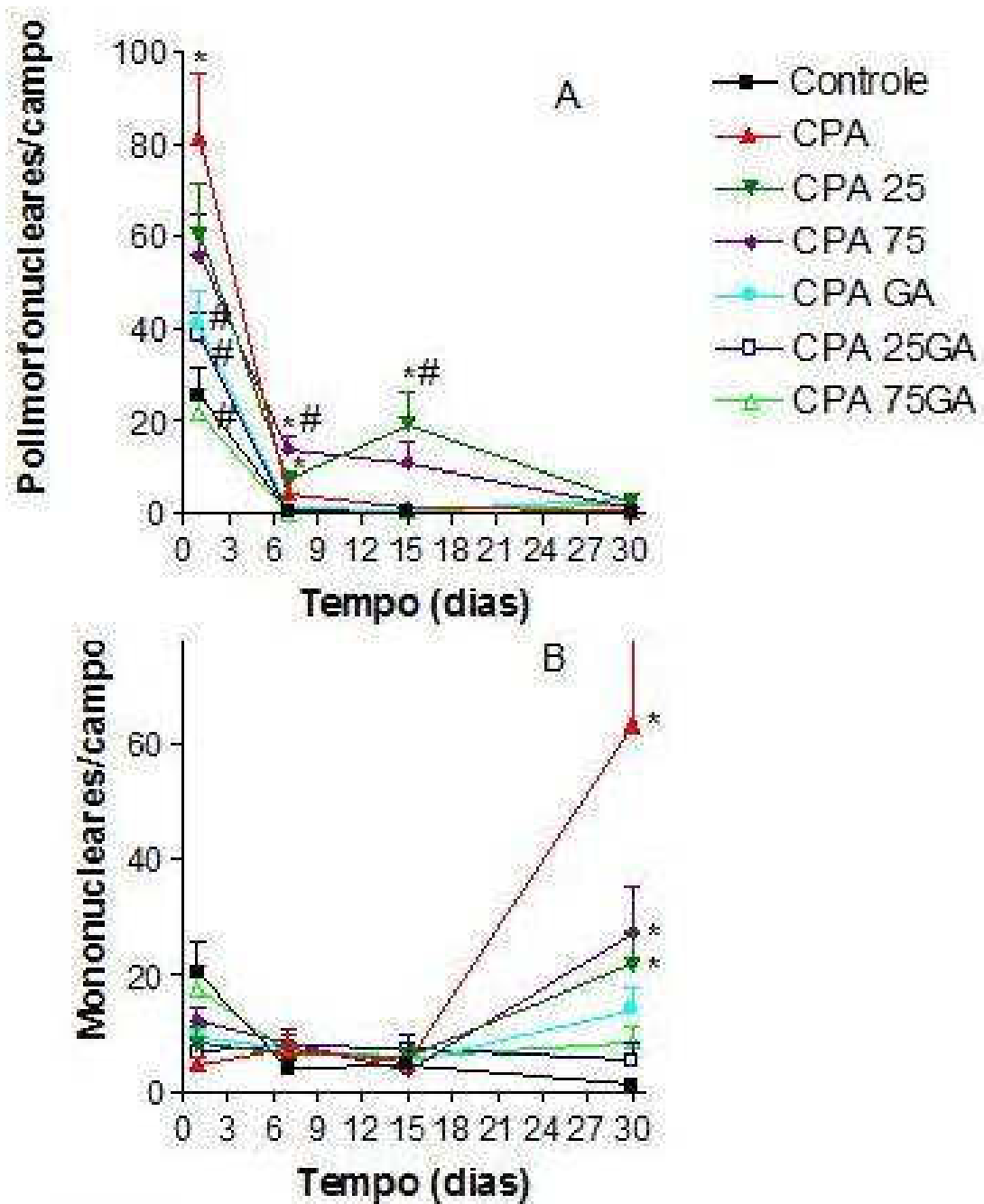
6.1 Análise histológica

6.1.1 Intensidade do infiltrado inflamatório

Células polimorfonucleares- No dia 1, todos os grupos apresentaram reação inflamatória aguda, mas apenas o grupo CPA apresentou aumento estatisticamente significativo de células polimorfonucleares/campo comparado com o grupo controle (* $p < 0,05$). Os grupos cujas membranas foram reticuladas com glutaraldeído (CPA GA, CPA 25GA e CPA 75GA) apresentaram um reduzido infiltrado de polimorfonucleares comparado com o grupo CPA, sem reticulação (# $p < 0,05$). No dia 7, a reação diminuiu em todos os grupos, mas o número de polimorfonucleares/campo foi estatisticamente maior no grupo CPA 25 e CPA 75, quando comparado com o grupo controle (* $p < 0,05$). Neste período, o grupo CPA 75 mostrou um grande número destas células comparado ao grupo CPA (# $p < 0,05$). No dia 15, o infiltrado de polimorfonucleares no grupo CPA 25 ainda se apresentou alto em relação ao grupo controle (* $p < 0,05$) e CPA (# $p < 0,05$). No dia 30, o infiltrado inflamatório agudo desapareceu em todos os grupos (Figura 12A).

Células mononucleares- Nos dias 1 e 7, o número de células mononucleares/campo foi baixo em todos os grupos. Após o dia 15, o número de mononucleares por campo começou a aumentar e no dia 30, o número de células mononucleares/campo nos grupos CPA, CPA 25 e CPA 75 aumentou em relação ao controle (* $p < 0,05$). Os grupos CPA GA, CPA 25GA e CPA 75GA não apresentaram infiltrado mononuclear significativo em comparação ao controle (Figura 12B).

Figura 12: Efeito das membranas de colágeno implantadas em tecido subcutâneo na contagem de leucócitos.



Cada ponto representa a média \pm EPM. A) células polimorfonucleares por campo de 6 animais, B) células mononucleares por campo de 6 animais. * $P < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo controle. # $P < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo CPA. Os dados foram analisados pelos testes de Análise de Variância (ANOVA) e Bonferroni.

6.1.2 Mensuração da cápsula fibrosa

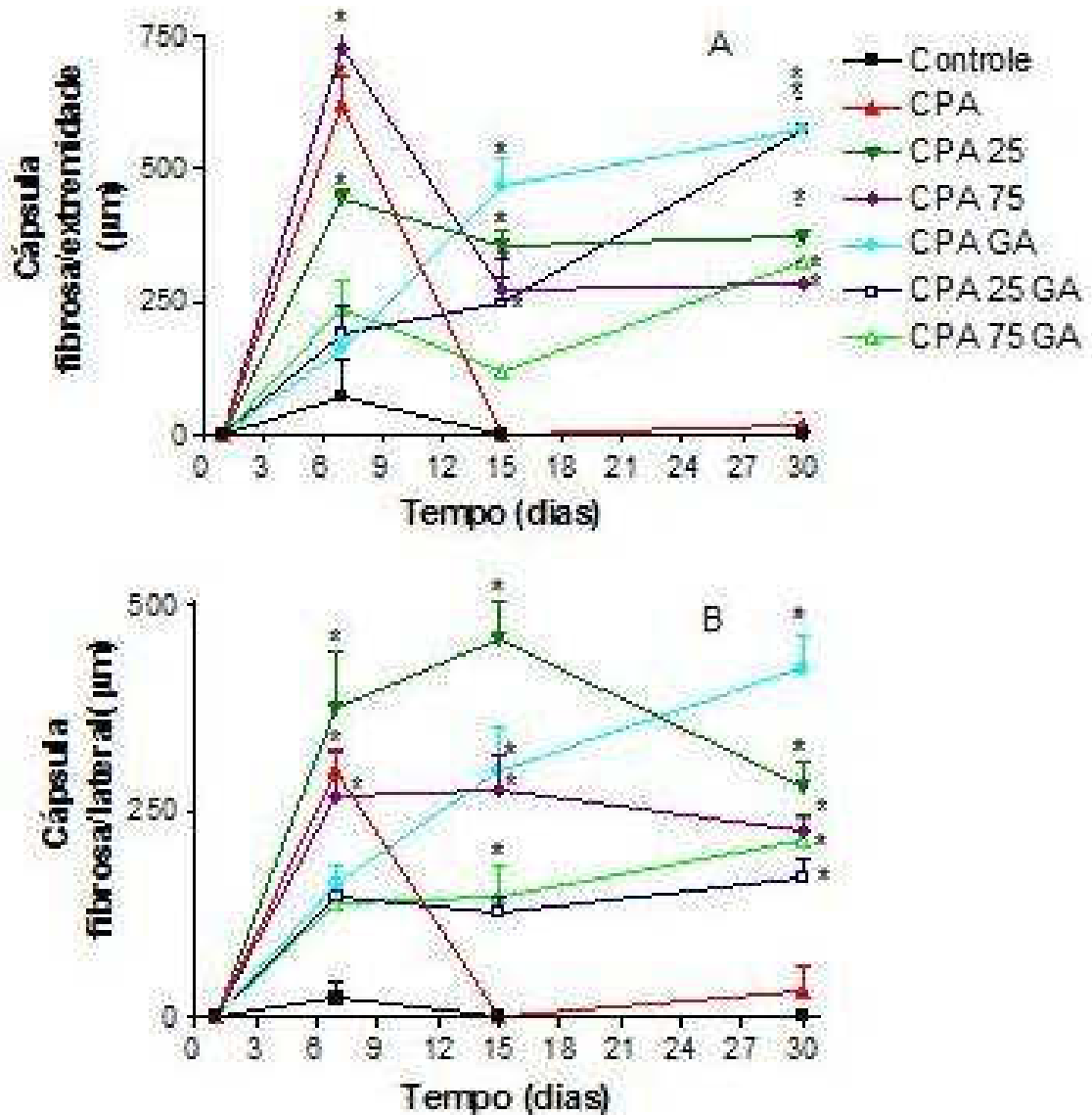
No dia 7, a cápsula fibrosa na região da extremidade da membrana apresentava-se mais espessa nos grupos sem reticulação (CPA, CPA 25 e CPA 75), comparando-se ao grupo controle ($*p<0,05$). No dia 15, as membranas controle e a CPA foram reabsorvidas e a cápsula desapareceu. A cápsula envolvendo as membranas CPA 25 e CPA 75 diminuiu sua espessura e esta redução foi estatisticamente diferente do grupo controle ($*p<0,05$). No dia 30, as cápsulas envolvendo as membranas dos grupos com reticulação (CPA GA, CPA 25GA e CPA 75GA) tornaram-se mais espessas, com diferença estatística em relação ao grupo controle ($*p<0,05$). As cápsulas dos grupos CPA 25 e CPA 75 embora houvessem reduzido a espessura se comparado ao dia 7, ainda se apresentavam estatisticamente diferentes do grupo controle ($p^*<0,05$) (Figura 13A).

Os dados referentes a cápsula fibrosa na região lateral a membrana, apresentaram-se similares aos dados obtidos na extremidade, com exceção que no dia 7 à 15, a cápsula do grupo CPA 25 ainda continuava aumentando em espessura. No dia 30, a espessura da cápsula fibrosa dos grupos CPA, CPA 25, CPA 75, CPA GA, CPA 25 GA e CPA 75GA foi superior a $150\mu\text{m}$ (Figura 13B).

6.1.3 Biodegradação das membranas

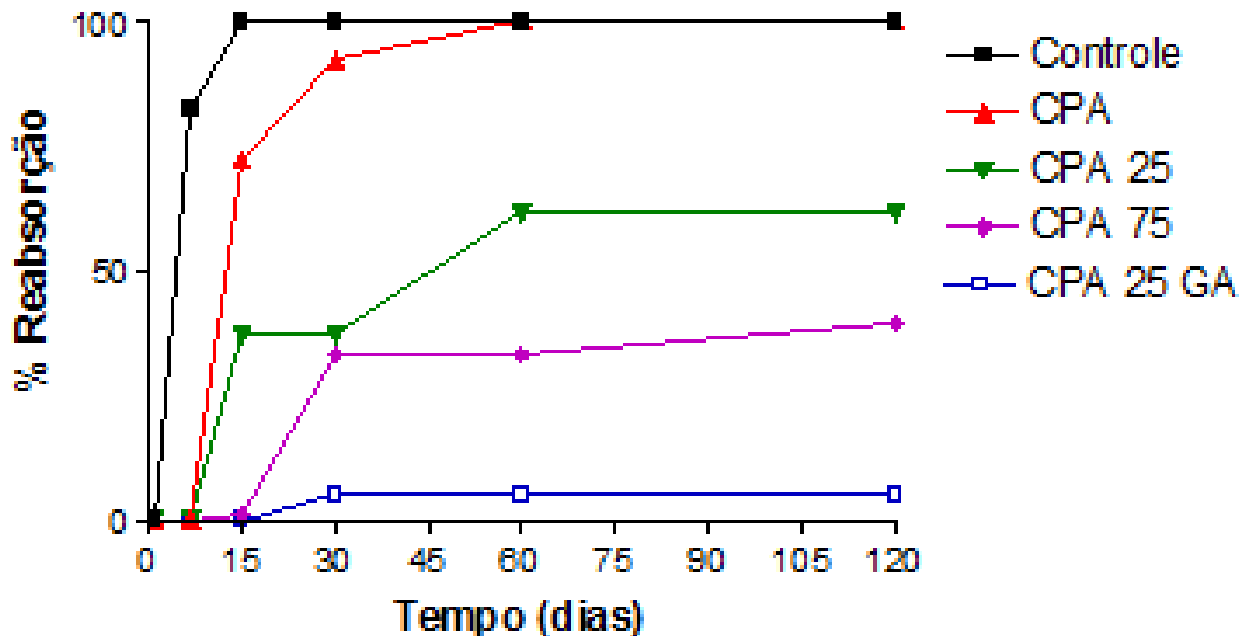
Após 15 dias, as membranas do grupo controle foram completamente reabsorvidas. Em alguns animais, no grupo CPA, apenas resíduos das membranas puderam ser observados após 30 dias. As membranas impregnadas com hidroxiapatita (CPA 25, CPA 75) sofreram intensa reabsorção. Contrariamente, as membranas impregnadas com hidroxiapatita e reticuladas com glutaraldeído (CPA GA, CPA 25GA, CPA 75GA) estavam intactas no período de observação de 120 dias. As membranas com glutaraldeído mostraram-se mais biocompatíveis e se mantiveram livre de biodegradação nos diversos períodos de observação (Figura 14).

Figura 13: Espessura de cápsula fibrosa formada na extremidade e parede lateral das membranas.



Mensuração linear realizada pelo programa NHImage. Cada ponto representa a média \pm EPM de 6 animais. * $P < 0.05$ representa diferença estatística em relação ao grupo controle. Os dados foram analisados pelos testes de Análise de Variância (ANOVA) e Bonferroni.

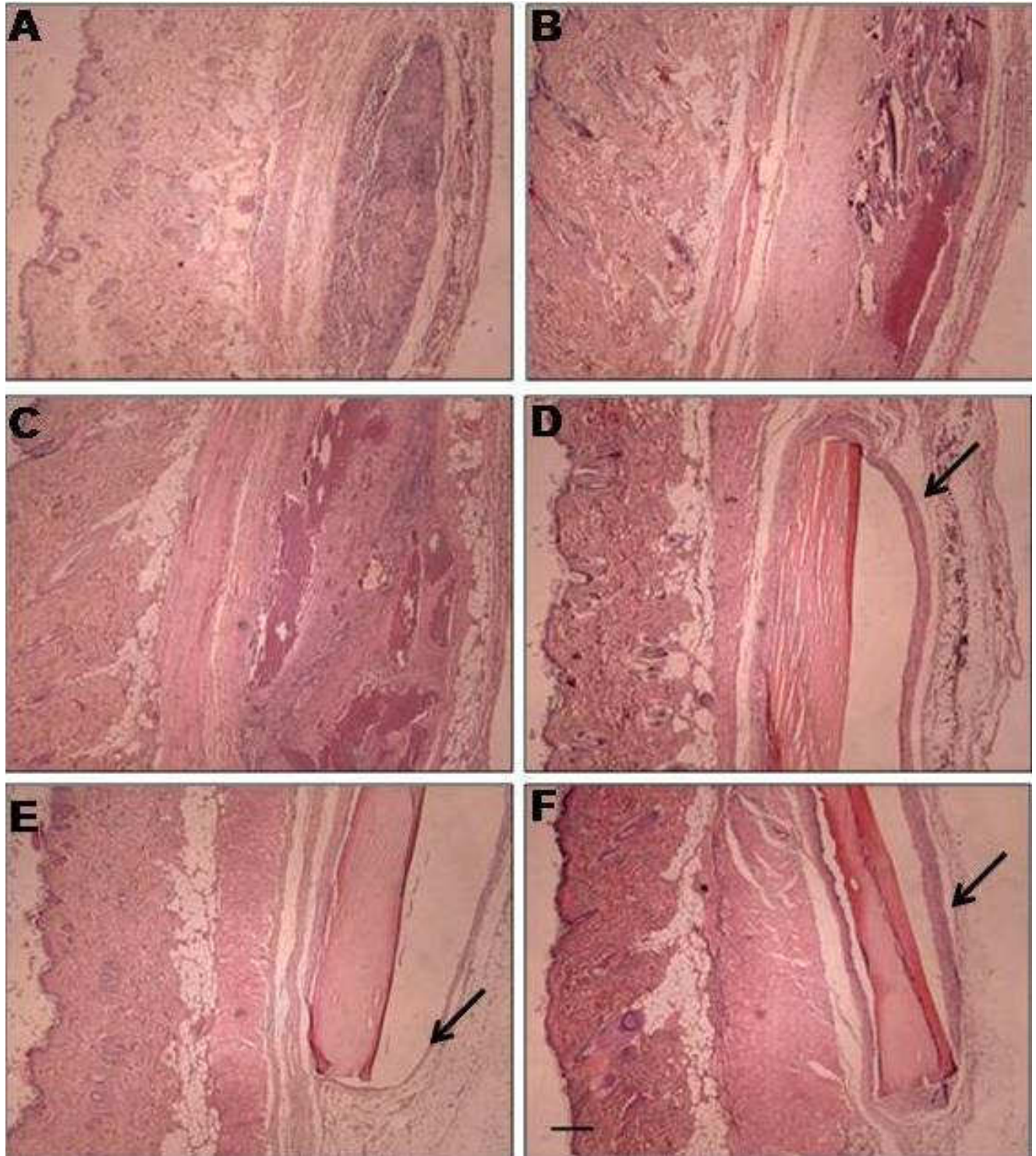
Figura 14: Percentual de reabsorção da área da membrana em relação ao 1º dia de cada grupo.



As membranas dos grupos controle e CPA foram totalmente reabsorvidas, as dos grupos CPA 25 e CPA 75 sofreram reabsorção parcial, já as dos grupos CPA GA e CPA 75 GA não sofreram reabsorção período de 120 dias.

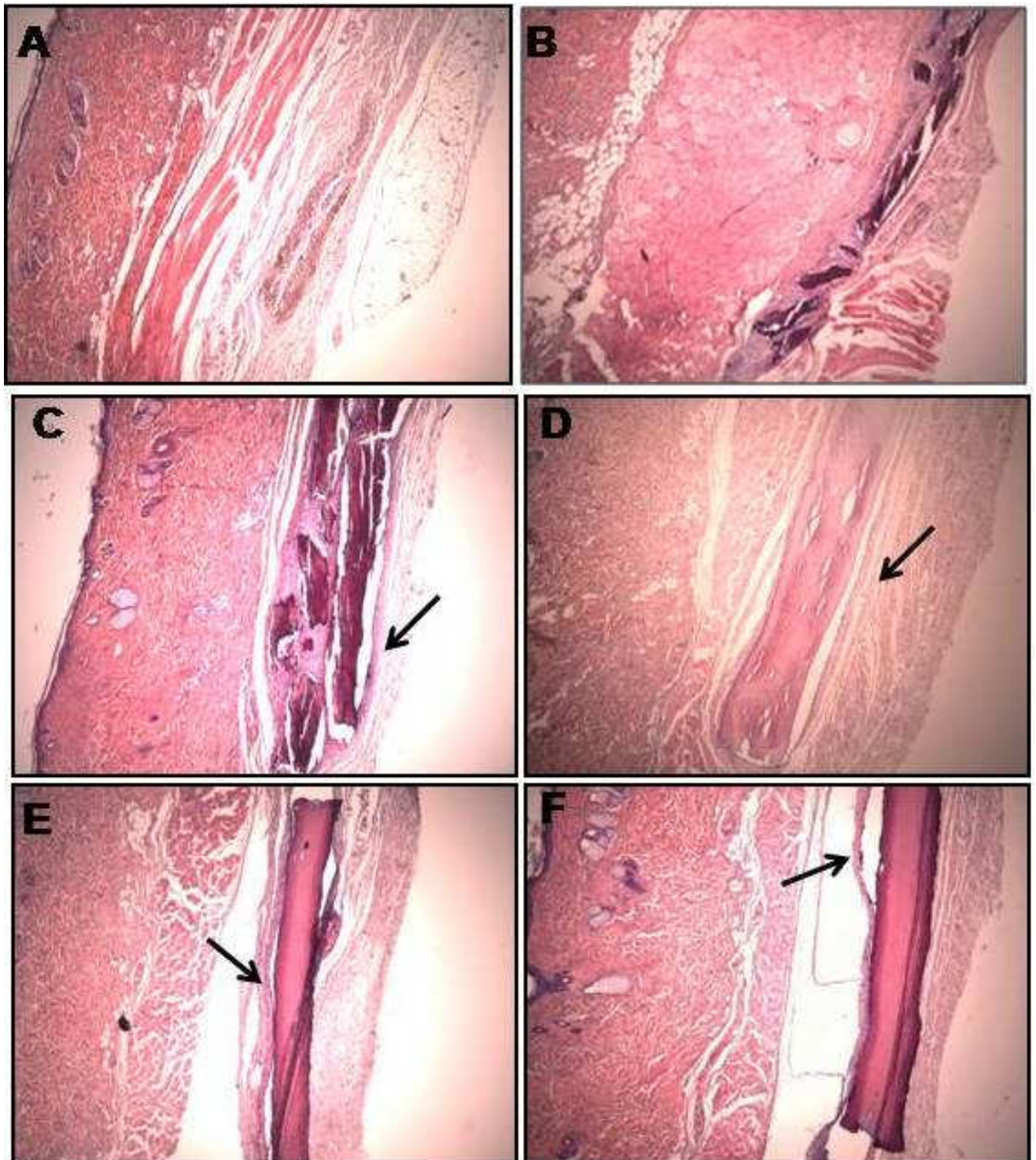
As figuras 15, 16 e 17 mostram o aspecto microscópico das membranas e do tecido subcutâneo adjacente dos ratos, no período de 30, 60 e 120 dias. CPA mostrou completa reabsorção (A); CPA 25 e CPA 75 mostraram reabsorção parcial (B e C, respectivamente); CPA GA, CPA 25GA e CPA 75GA (D, E e F, respectivamente) mostram membranas preservadas e presença de cápsula fibrosa (seta preta) após o período de 120 dias.

Figura 15: Aspecto microscópico das membranas (CPA) implantadas no tecido subcutâneo dos ratos, após trinta dias.



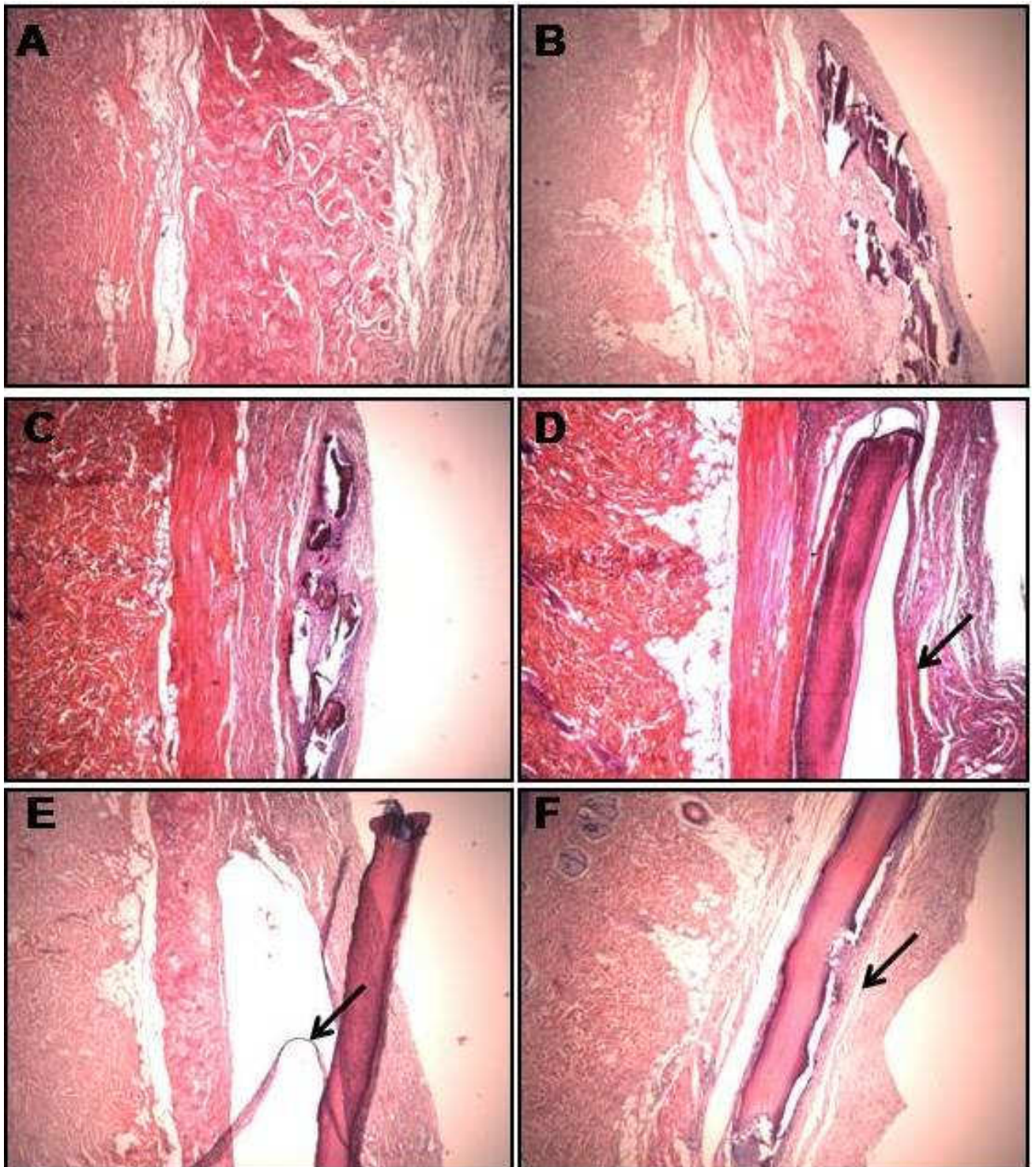
As membranas e os tecidos circunjacentes foram removidos e processados com hematoxilina/eosina. As fotomicrografias representam: A) CPA, B) CPA 25, C) CPA 75, D) CPA GA, E) CPA 25GA, F) CPA 75GA. As setas mostram a cápsula fibrosa ao redor das membranas. Barra= 250 μ m (X40).

Figura 16: Aspecto microscópico das membranas (CPA) implantadas no tecido subcutâneo dos ratos, após sessenta dias.



As membranas e os tecidos circunjacentes foram removidos e processados com hematoxilina/eosina. As fotomicrografias representam: A) CPA, B) CPA 25, C) CPA 75, D) CPA GA, E) CPA 25GA, F) CPA 75GA. As setas mostram a cápsula fibrosa ao redor das membranas.

Figura 17: Aspecto microscópico das membranas (CPA) implantadas no tecido subcutâneo dos ratos, após 120 dias.

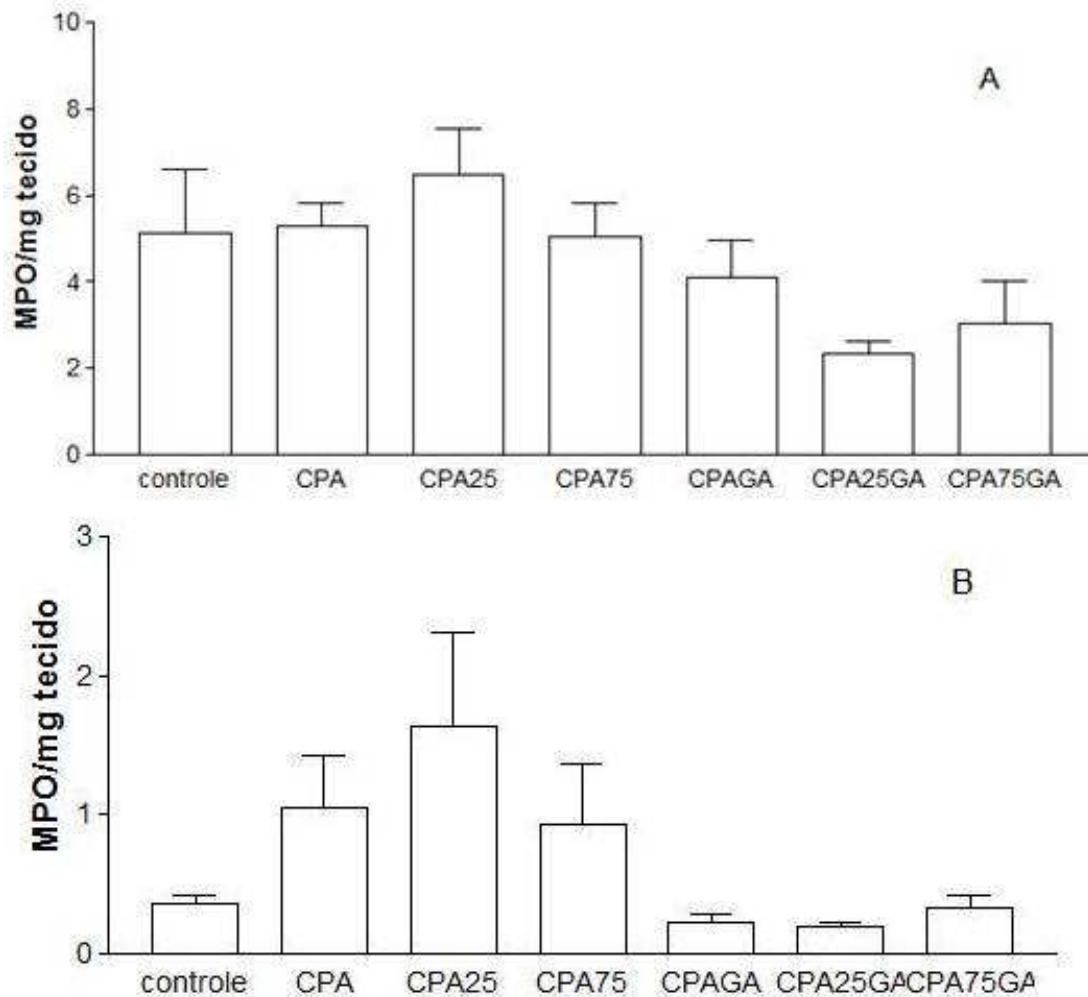


As membranas e os tecidos circunjacentes foram removidos e processados com hematoxilina/eosina 120 dias após a implantação das membranas. As fotomicrografias representam: A) CPA, B) CPA 25, C) CPA 75, D) CPA GA, E) CPA 25GA, F) CPA 75GA. As setas mostram a cápsula fibrosa ao redor das membranas.

6.2 Atividade de mieloperoxidase (MPO) no tecido subcutâneo adjacente às membranas

Não houve diferença estatística dentro dos grupos com relação a atividade de MPO, embora as membranas CPA, CPA 25 e CPA 75 apresentem valores mais elevados dessa enzima no dia 7 (Figure 18 A e B).

Figura 18: Atividade de mieloperoxidase (MPO) no tecido subcutâneo adjacente às membranas.



Os animais foram sacrificados no 1° e 7° dias (A, B , respectivamente), e as membranas e tecidos circunjacentes removidos para o ensaio. As barras representam a média \pm EPM de 6 animais. Os dados foram analisados pelos testes de Análise de Variância (ANOVA) e Bonferroni.

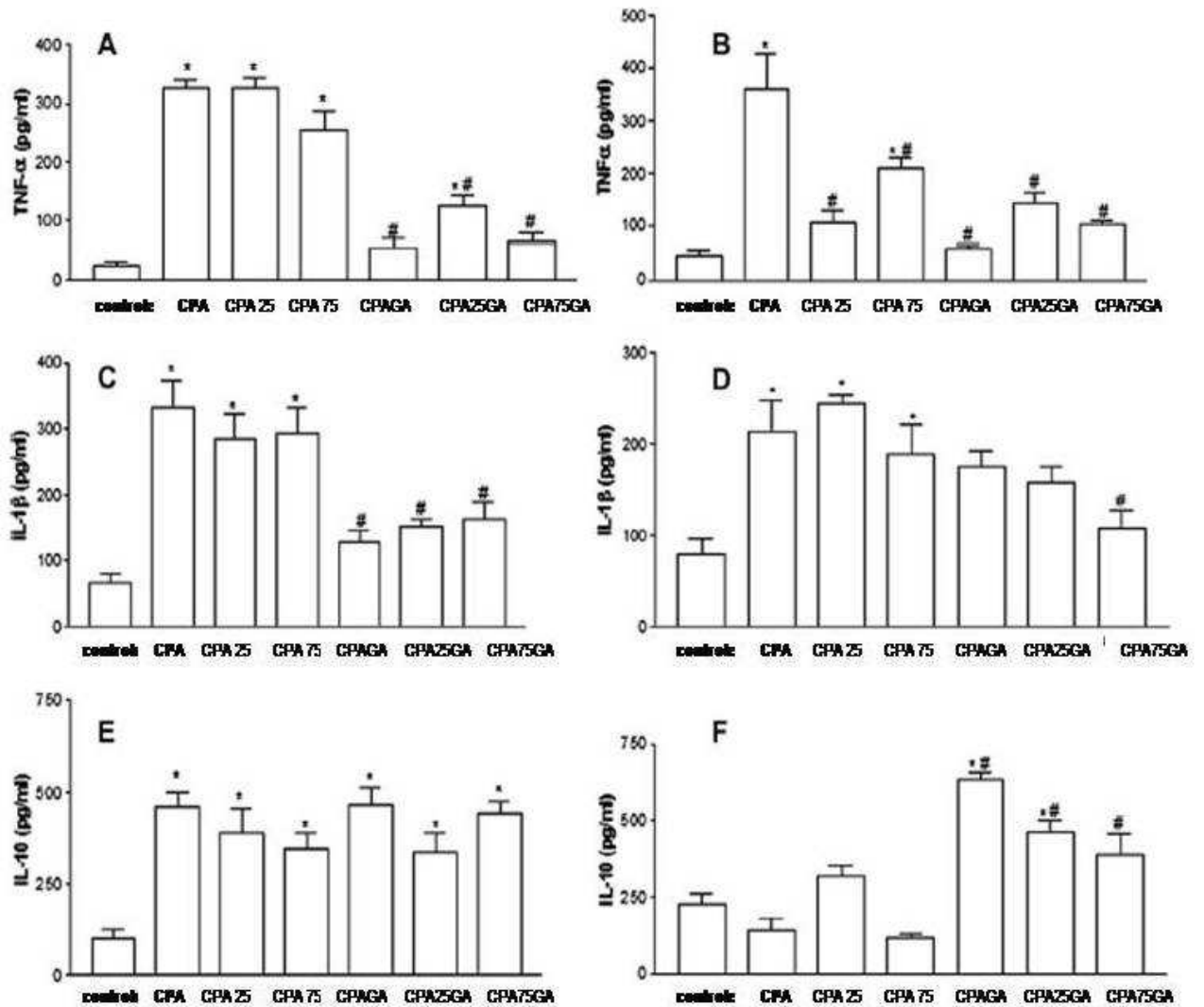
6.3 Dosagem de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-10) no tecido subcutâneo adjacente às membranas

Foi observado aumento significativo ($*p < 0,05$) da citocina pró-inflamatória TNF- α nos grupos CPA, CPA 25, CPA 75 e CPA 25GA quando comparado ao grupo controle. Os grupos com ligação cruzada (CPA GA, CPA 25GA, CPA 75GA) apresentaram reduzidos níveis de TNF- α em relação ao grupo CPA ($\#p < 0,05$). No dia 7, os níveis desta citocina estavam altos nos grupos CPA e CPA 75, comparado ao grupo controle ($*p < 0,05$), enquanto todos os outros grupos apresentaram níveis reduzidos de TNF- α .

Os níveis da citocina pró-inflamatória IL-1 β apresentavam-se elevados nos grupos sem reticulação (CPA, CPA 25 e CPA 75) nos dias 1 e 7 comparado ao controle ($*p < 0,05$), enquanto os grupos que receberam membranas reticuladas com glutaraldeído apresentaram reduzidos níveis de IL-1 β quando comparado ao grupo CPA no dia 1 ($\#p < 0,05$); entretanto apenas CPA 75GA apresentou níveis reduzidos significativamente de IL-1 β no dia 7, se comparado ao grupo CPA ($\#p < 0,05$).

Observou-se níveis elevados da citocina anti-inflamatória IL-10 no dia 1 em todos os grupos quando comparados ao controle ($*p < 0,05$), e no dia 7, nos grupos com ligação cruzada em relação ao grupo controle ($*p < 0,05$) e ao grupo CPA ($\#p < 0,05$) (Figura 19).

Figura 19: Efeito da dosagem de citocinas no tecido subcutâneo adjacente às membranas.



Após o sacrifício dos animais uma amostra do tecido subcutâneo foi removido para dosagem das citocinas TNF- α (A, B) IL-1 β (C, D), IL-10 (E, F) no 1° e 7° dias, respectivamente. As barras representam a média \pm EPM de 6 animais. *P<0,05 representa diferenças estatísticas em relação ao grupo controle. #P<0,05 representa diferenças estatísticas em relação ao grupo CPA. Os dados foram analisados pelos testes de Análise de Variância (ANOVA) e Bonferroni.

6.4 Imunohistoquímica para metaloproteinase (MMP1/8)

A análise do percentual de coloração marrom na imunohistoquímica para metaloproteinase (MMP1/8) apresentou marcação intensa em todos os grupos avaliados sem apresentar, no entanto, diferenças estatísticas entre os grupos (Tabela 1). Observou-se a presença de grande quantidade de fibroblastos e macrófagos, células responsáveis pela produção de metaloproteinase 1 (MMP-1). Não foram encontradas células inflamatórias, como neutrófilos, que podem ser responsáveis pela produção de metaloproteinase 8 (MMP-8) (Figura 20).

Tabela 1 - Imunohistoquímica para metaloproteinase (MMP1/8) nos tecidos subcutâneos adjacentes às membranas em ratos.

GRUPOS	% DENSIDADE
Controle	8,14 ± 6,11
CPA	6,93 ± 4,48
CPA 25	6,42 ± 5,27
CPA 75	5,40 ± 0,68
CPA GA	10,69 ± 2,42
CPA 25GA	14,57 ± 4,62
CPA 75GA	11,88 ± 4,66

Legenda: Avaliação da marcação imunohistoquímica para metaloproteinase pelo sistema de análise morfométrica (SAMM), um programa que captura o percentual da coloração marrom com objetivo de quantificar a expressão dessa enzima. Os animais dos diversos grupos foram sacrificados 7 dias após a implantação das membranas e uma amostra de tecido subcutâneo ao redor de cada membrana foi removido e processado para o ensaio de imunohistoquímica para metaloproteinase. Os dados representam o percentual de densidade de coloração e representam a média ± EPM de 6 animais.

Figura 20 - Imunohistoquímica para metaloproteinase (MMP1/8) nos tecidos subcutâneos adjacentes às membranas em ratos.

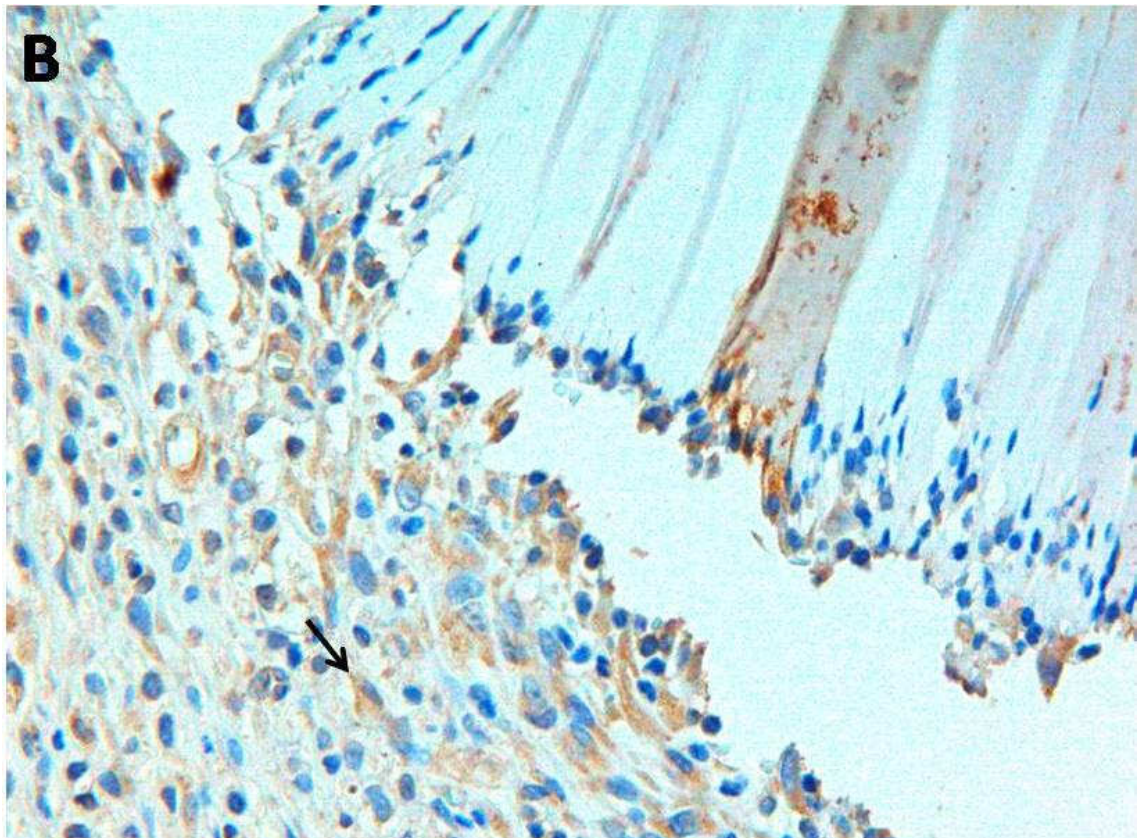
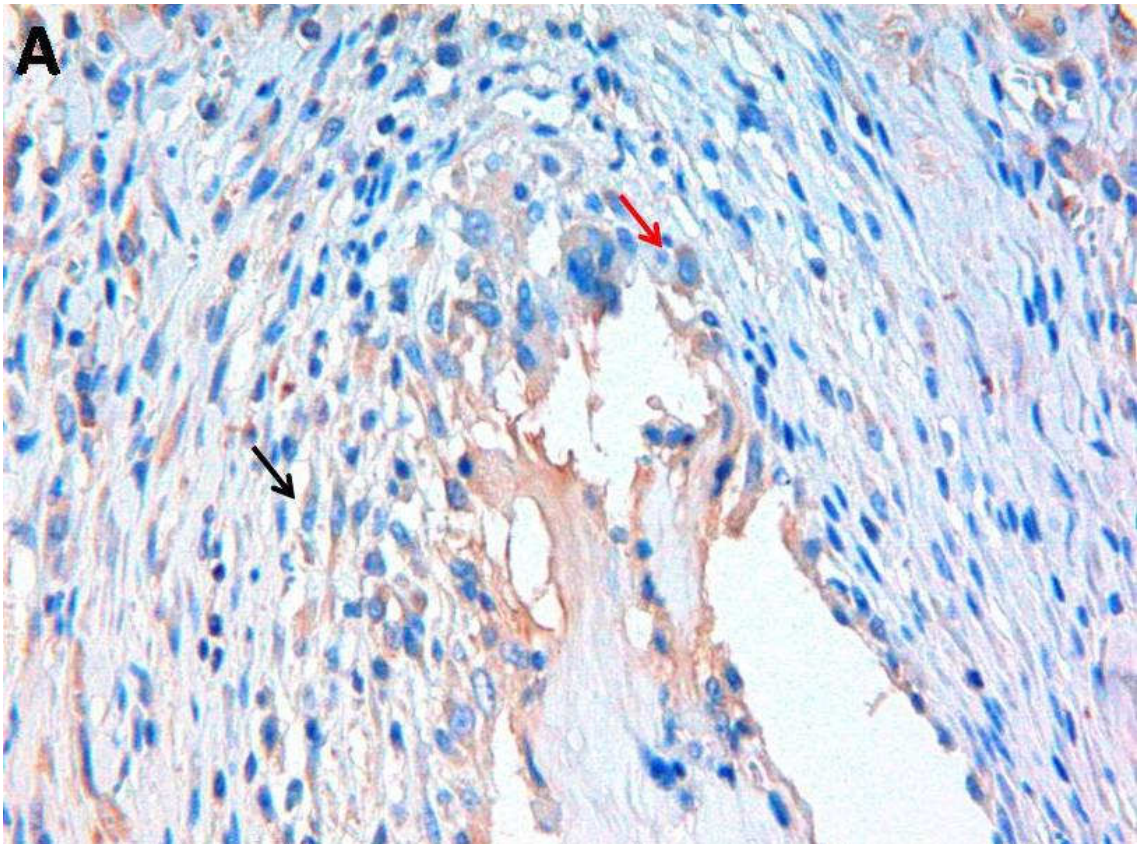
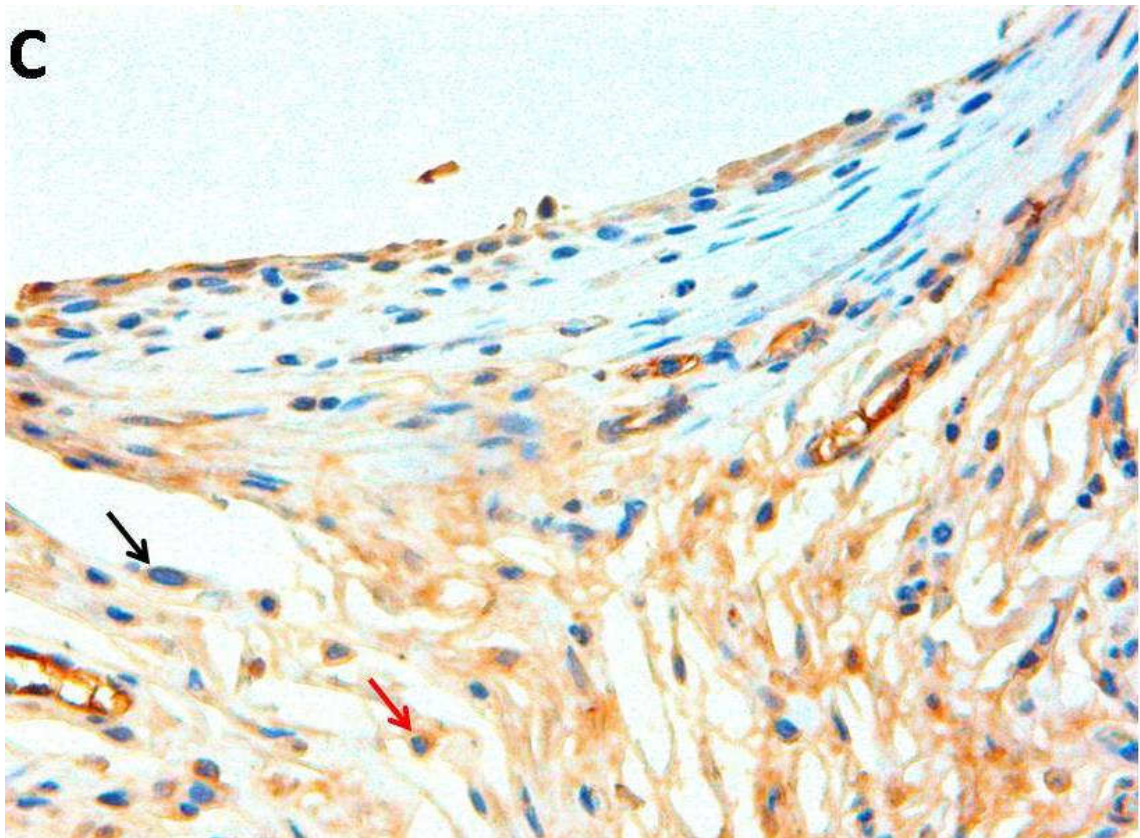


Figura 20 - Imunohistoquímica para metaloproteinase (MMP1/8) nos tecidos subcutâneos adjacentes às membranas em ratos (Cont.)



Avaliação da marcação imunohistoquímica para MMP1/8 pelo sistema de análise morfométrica (SAMM), um programa que captura o percentual da coloração marrom com objetivo de quantificar a expressão dessa enzima. Os animais dos diversos grupos foram sacrificados 7 dias após a implantação das membranas e uma amostra de tecido subcutâneo ao redor de cada membrana foi removido e processado para o ensaio de imunohistoquímica para metaloproteinase. A) controle, B) CPA e C) CPA 25GA. A seta preta representa fibroblasto e a seta vermelha representa macrófago. Aumento de 1000X.

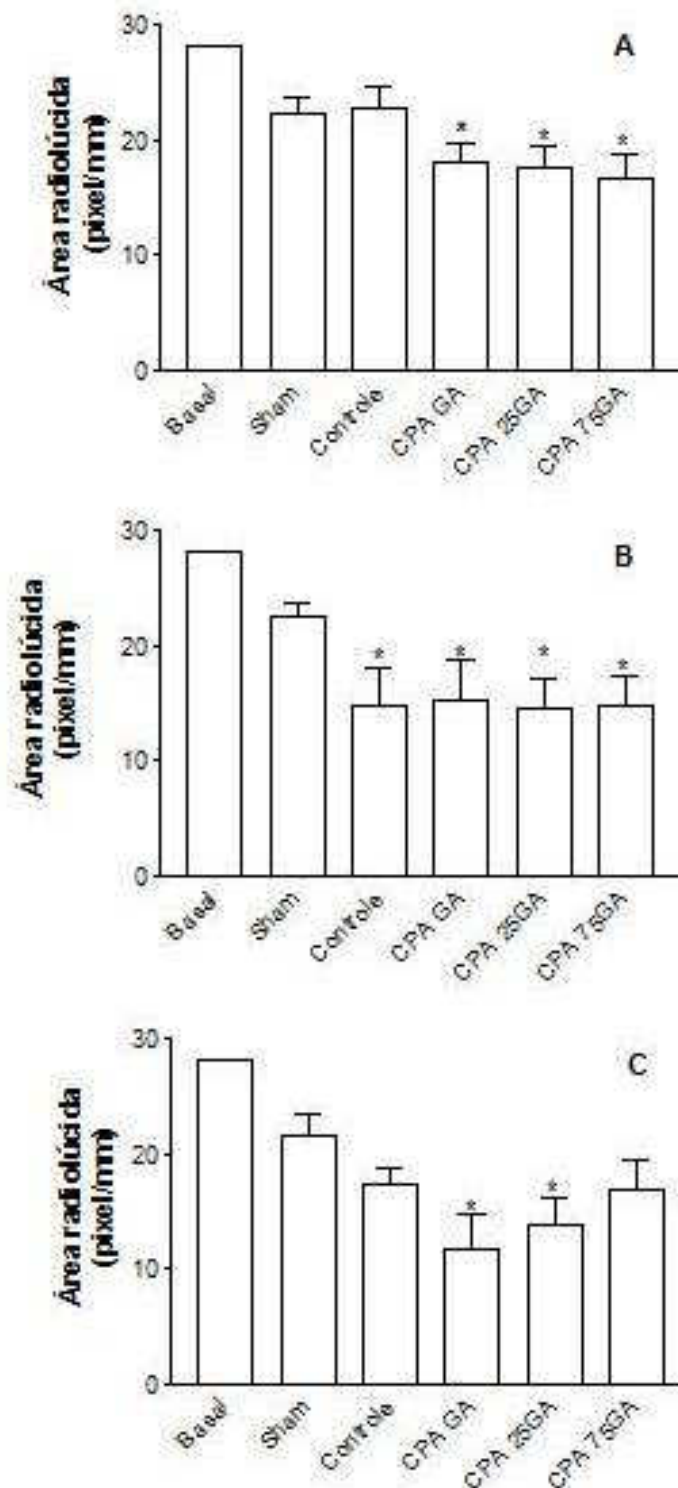
7 RESULTADOS INERENTES A 2ª ETAPA DO PRESENTE TRABALHO

7.1 Avaliação da formação óssea

7.1.1 Radiografia digital

Após 4 semanas, os grupos experimentais (CPA GA, CPA 25GA e CPA 75GA) exibiram uma redução da área radiolúcida (pixel/mm), apresentando diferença estatística em relação ao grupo basal (grupo sacrificado 24 horas após o procedimento cirúrgico) (* $p < 0,05$) (Figura 21A). Após 8 semanas, a área radiolúcida de todos os grupos experimentais (CPA GA, CPA 25GA e CPA 75GA) e do grupo controle apresentava-se significativamente menor (* $p < 0,05$) em relação ao grupo basal (Figura 21B). Após 12 semanas observamos que somente os grupos experimentais CPA GA, CPA 25GA apresentaram diferença estatística se comparados ao grupo basal (Figura 21C).

Figura 21: Radiografia digital 4 (A), 8 (B) e 12 (C) semanas após o procedimento cirúrgico.

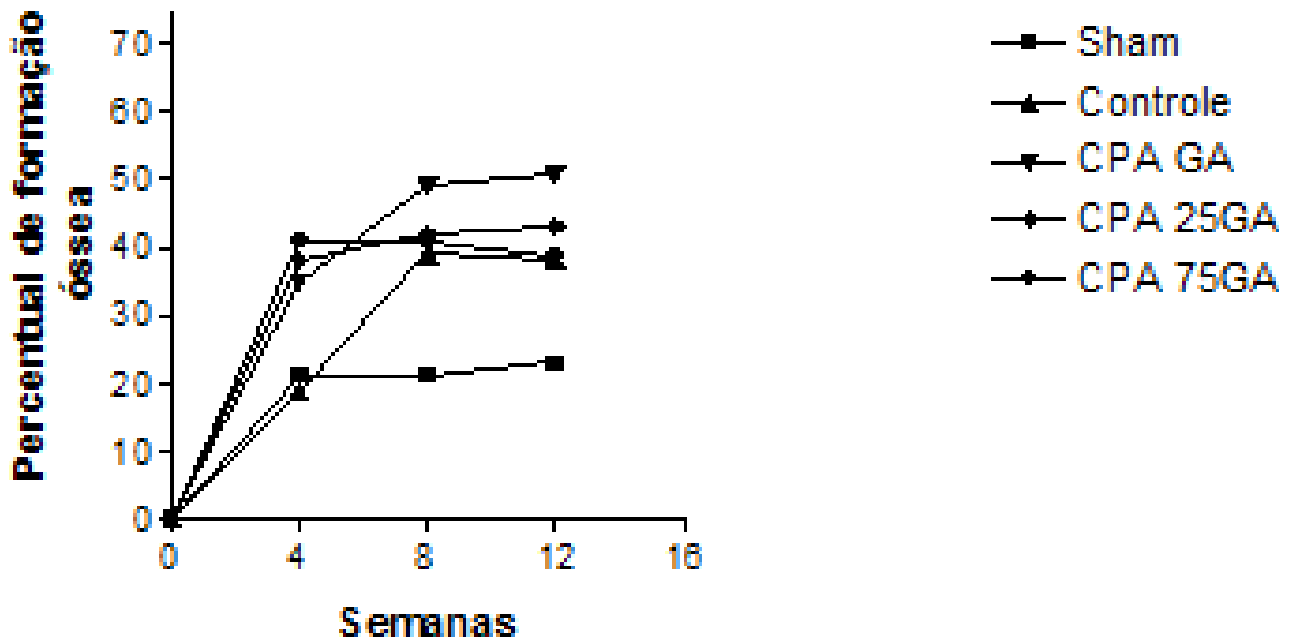


A barra representa o valor médio \pm o erro padrão da média (SEM). *P<0,05 representa a diferença estatística comparada com o grupo basal (24 horas após o procedimento cirúrgico). Os dados foram analisados pelos testes de Análise de Variância (ANOVA) e Bonferroni.

Percentual de neo-formação óssea:

A figura 22 mostra o percentual de formação óssea 4, 8 e 12 semanas após o procedimento cirúrgico. Foi observado, em todos os grupos experimentais (CPA GA, CPA 25GA e CPA 75GA), 4 semanas após a implantação das membranas, um aumento de aproximadamente 40% na formação óssea em relação aos grupos Controle e Sham, ambos apresentando um percentual próximo de 20%. As análises da formação óssea realizadas 8 e 12 semanas após a cirurgia apresentaram resultados semelhantes, observado-se um aumento na formação óssea nos grupos controle, CPA, CPA 25GA e CPA 75GA em torno de 40 a 50%, enquanto no grupo Sham a neo-formação óssea continuou próxima de 20%. O grupo de CPA GA apresentou o melhor resultado ao longo das 12 semanas de avaliação em torno de 50% de formação óssea.

Figura 22: Percentual de neo-formação óssea 4, 8 e 12 semanas após o procedimento cirúrgico.



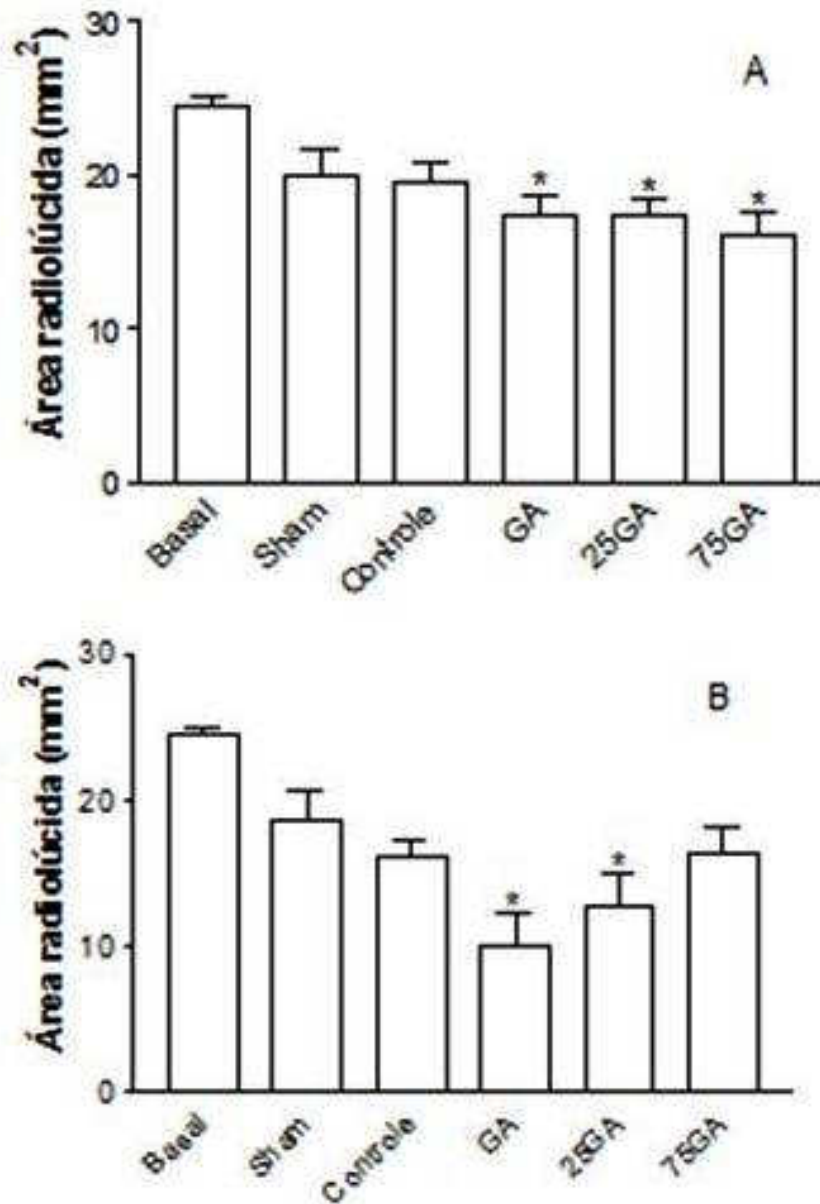
A área radiolúcida de cada grupo foi calculada como porcentagem em relação a área do grupo basal de acordo com a seguinte fórmula: média da área radiolúcida de cada grupo após 4, 8 e 12 semanas, multiplicado por 100 e dividido pela média da área radiolúcida do grupo basal. Como área radiolúcida do grupo basal corresponde a 100%, o valor resultante foi subtraído de 100, para corresponder ao valor de neo-formação óssea.

7.1.2 Tomografia computadorizada

Após 4 semanas, os grupos experimentais (CPA GA, CPA 25GA e CPA 75GA) exibiram uma menor área radiolúcida, estatisticamente significativa, se comparados com o grupo basal (* $p < 0,05$) (Figura 23A). Após 12 semanas, apenas os grupos experimentais CPA GA, CPA 25GA apresentaram diferença estatística em relação ao grupo basal (* $p < 0,05$) (Figura 23 B).

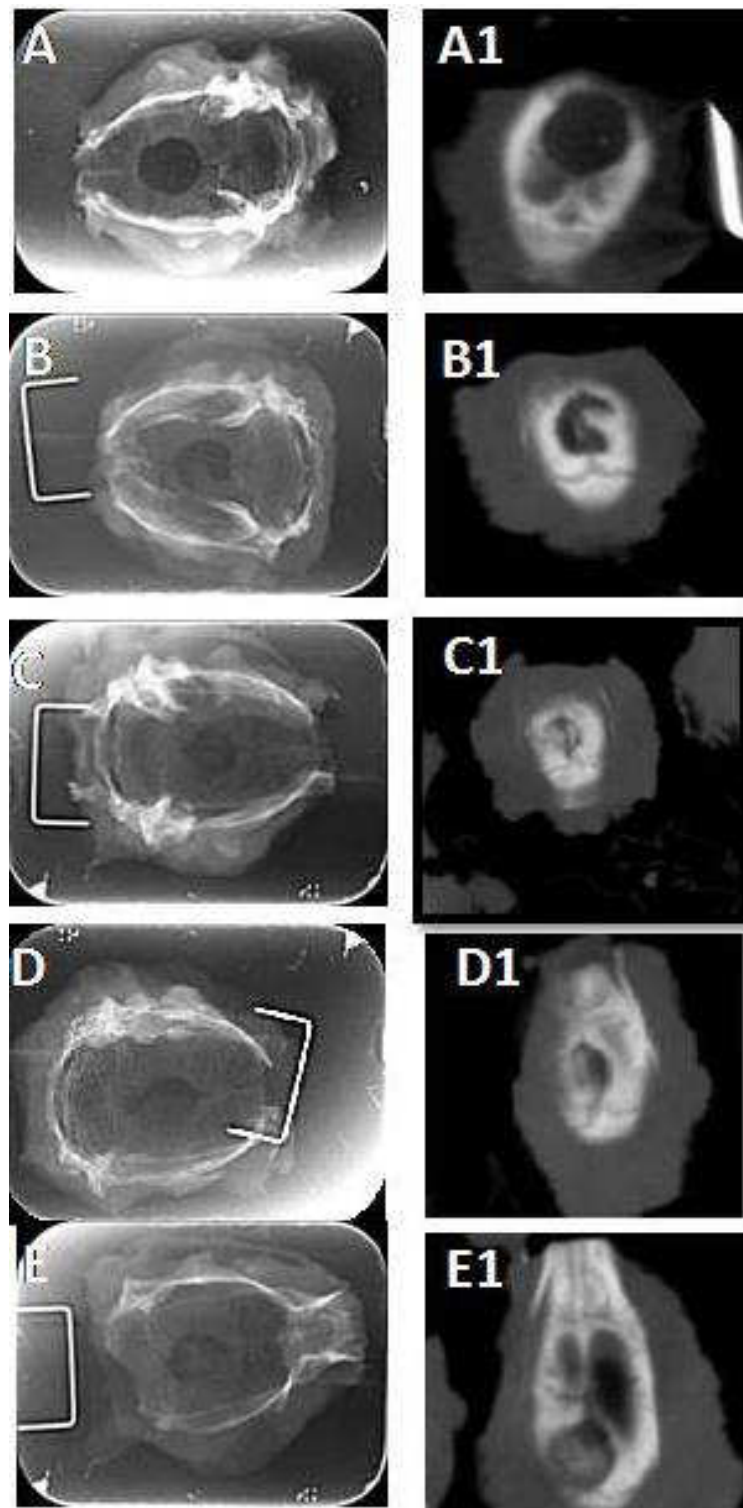
Na figura 24, podem-se visualizar as imagens obtidas pelas radiografias digitais e tomografias computadorizadas 12 semanas após os procedimentos cirúrgicos, realizadas no mesmo animal. Observamos claramente uma redução na área radiolúcida nas imagens radiográficas e tomográficas dos grupos CPA GA (C e C₁) e CPA 25GA (D e D₁) em relação aos grupos sham (A e A₁) e controle (B e B₁). Observamos, ainda, que tomografia computadorizada fornece imagens com maior definição das bordas do defeito ósseo em relação às imagens obtidas pela radiografia digital, oferecendo maior facilidade e confiabilidade na avaliação da neoformação óssea.

Figura 23: Tomografia computadorizada 4 (A) e 12 (B) semanas após o procedimento cirúrgico.



O valor médio da área radiolúcida (mm²) de cada grupo foi mensurado para comparar a quantidade de tecido mineralizado produzido em resposta a cada tipo de membrana utilizada. A barra representa o valor médio \pm o erro padrão da média (SEM). *P<0,05 representa a diferença estatística comparada ao grupo basal (24 horas após o procedimento cirúrgico). Os dados foram analisados pelos testes de análise de variância (ANOVA) e Bonferroni.

Figura 24: Comparação entre as imagens visualizadas pela radiografia digital e tomografia computadorizada 12 semanas após o procedimento cirúrgico.

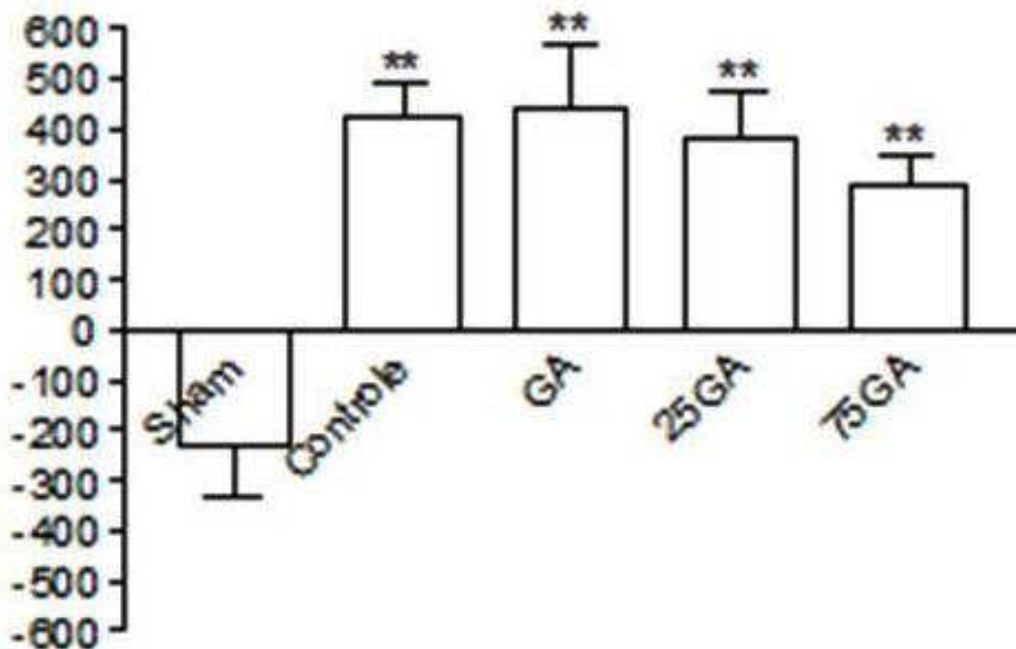


As imagens correspondem: A) grupo Sham, B) grupo Controle, C) grupo CPA GA, D) grupo CPA 25GA e E) grupo CPA 75GA. As imagens A, B, C, D e E, correspondem às radiografias digitais; as imagens A1, B1, C1, D1 e E1, correspondem às tomografias computadorizadas do mesmo animal.

7.1.3 Densidade radiográfica

Após 12 semanas observou-se que os grupos controle e de CPA GA, CPA 25GA e CPA 75GA apresentaram densidades similares e com diferença estatística em relação ao grupo Sham (** $p < 0,05$) (Figura 25).

Figura 25: Densidade, obtida pela tomografia computadorizada, 12 semanas após o procedimento cirúrgico.



O valor médio densidade radiográfica de cada grupo foi mensurado para comparar a quantidade de tecido mineralizado produzido em resposta a cada tipo de membrana utilizada. A barra representa o valor médio \pm o erro padrão da média (SEM). ** $P < 0,05$ representa a diferença em relação ao grupo Sham. Os dados foram analisados pelos testes de Análise de Variância (ANOVA) e Bonferroni.

7.2 Análise histológica

A análise histológica da área correspondente ao defeito cirúrgico realizada 4 semanas após a implantação das membranas revelou uma reabsorção acentuada das membranas do grupo controle (Tabela 2; Fig. 26B). Nos grupos experimentais CPA GA e CPA 25GA as membranas apresentam-se íntegras (Tabela 2; Fig. 26C e 26D, respectivamente), enquanto o grupo CPA 75GA mostrou sinais de reabsorção das membranas (Tabela 2; Fig. 26E).

Após 8 semanas do procedimento cirúrgico, apenas os grupos controle e CPA 75GA mostraram sinais de reabsorção acentuada (Tabela 3; Fig. 27B e 27E, respectivamente), enquanto nos grupos CPA GA e CPA 25GA as membranas continuavam íntegras (Tabela 3; Fig. 27C e 27D, respectivamente).

As membranas do grupo controle apresentaram-se totalmente reabsorvidas 12 semanas após a cirurgia (Tabela 4; Fig. 28B), enquanto as membranas do grupo CPA 75GA apresentavam-se em acentuado estado de reabsorção (Tabela 4; Fig. 28E). As membranas do grupo CPA GA e CPA 25GA permaneceram íntegras, mesmo no maior período de observação, correspondente à 12 semanas (Tabela 4; Fig. 28C e 28D, respectivamente).

A avaliação histológica realizada 4 semanas após o procedimento cirúrgico revelou, ainda, a presença de cápsula fibrosa ao redor das membranas em todos os animais dos grupos CPA GA e CPA 25GA e em 80% dos animais dos grupo CPA 75GA, enquanto não foi observada a formação de cápsula fibrosa no grupo controle (Tabela 2).

Após 8 semanas, foi encontrada cápsula fibrosa contornando apenas algumas membranas do grupo controle (37,5%), enquanto as membranas dos grupos CPA GA e CPA 25GA encontraram-se envoltas por espessa cápsula fibrosa em todos os animais (100%) e no grupo CPA 75GA a presença de cápsula fibrosa foi observada em aproximadamente 60% dos animais (Tabela 3).

Após 12 semanas da implantação das membranas, não foi observada a presença de cápsula fibrosa em nenhum animal do grupo controle. Nos grupos CPA GA e CPA 25GA, a cápsula estava presente, envolvendo a membrana, em 100%

dos animais, enquanto no grupo CPA 75GA apenas 81,81% dos animais apresentavam cápsula fibrosa contornando as membranas (Tabela 4). Observamos uma relação direta entre a integridade das membranas e a presença de cápsula fibrosa, cuja espessura tende a diminuir, e mesmo desaparecer, à medida que as membranas são reabsorvidas (Tabela 2, 3 e 4).

Nas figuras 26, 27 e 28 podem-se observar os cortes histológicos dos grupos realizados 4, 8 e 12 semanas após os procedimentos cirúrgicos.

Tabela 2: Tabela apresentando os aspectos histológicos, conforme os escores avaliados, 4 semanas após o procedimento cirúrgico. #P<0,05 em relação ao grupo controle.

4 semanas n=6	Sham	Controle	CPA GA	CPA 25GA	CPA 75GA
Reabsorção da membrana	-----	4(0-4)	0(0)#	0(0)#	4(1-4)
Presença de cápsula fibrosa	0%	0%	100%	100%	80%

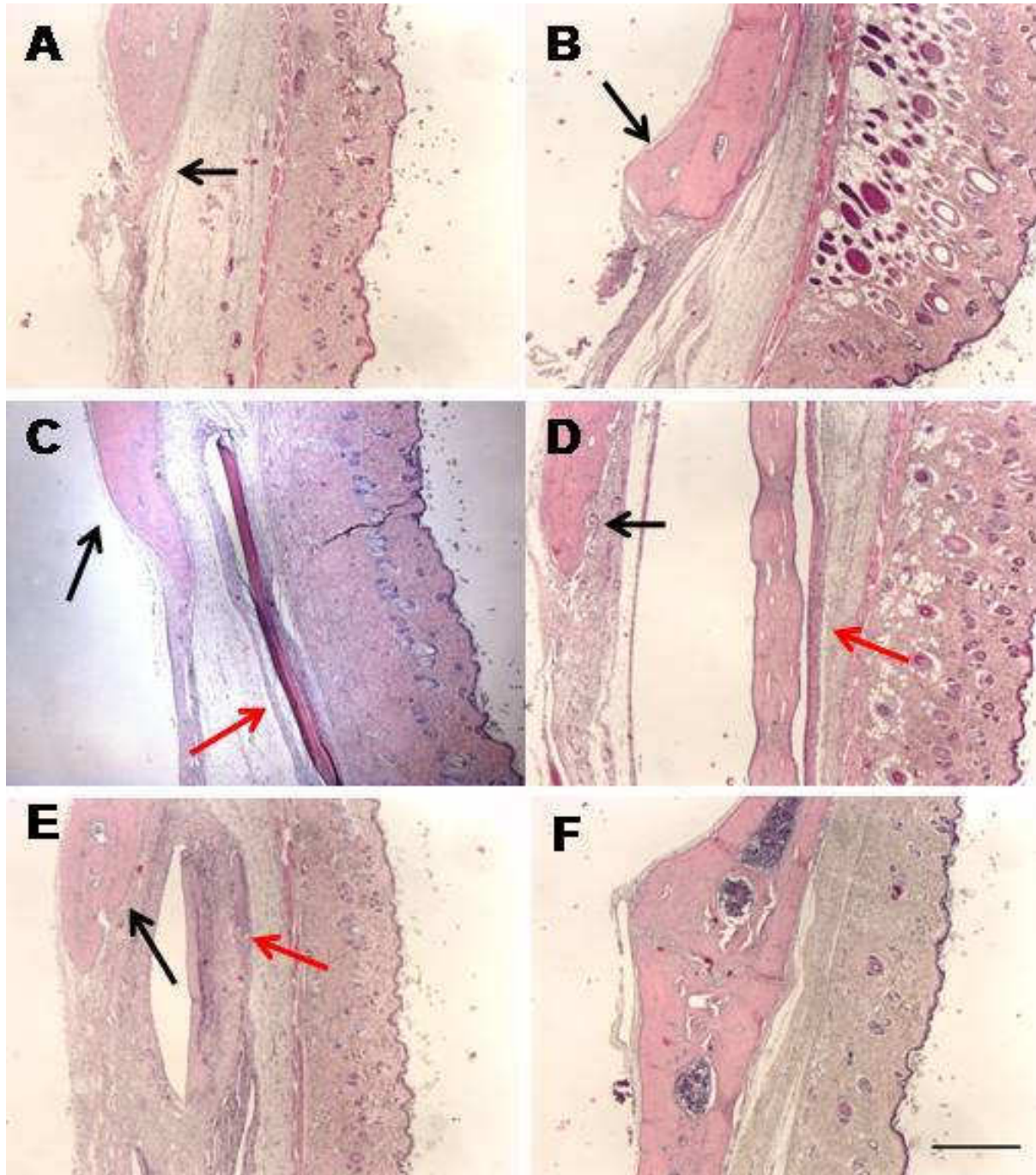
Tabela 3: Tabela apresentando os aspectos histológicos, conforme os escores avaliados, 8 semanas após o procedimento cirúrgico.

8 semanas n=8	Sham	Controle	CPA GA	CPA 25GA	CPA 75GA
Reabsorção da membrana	-----	1(0-4)	0(0)	0(0-1)	4(0-4)
Presença de cápsula fibrosa	0%	37,5%	100%	100%	60%

Tabela 4: Tabela apresentando os aspectos histológicos, conforme os escores avaliados, 12 semanas após o procedimento cirúrgico. #P<0,05 em relação ao grupo controle.

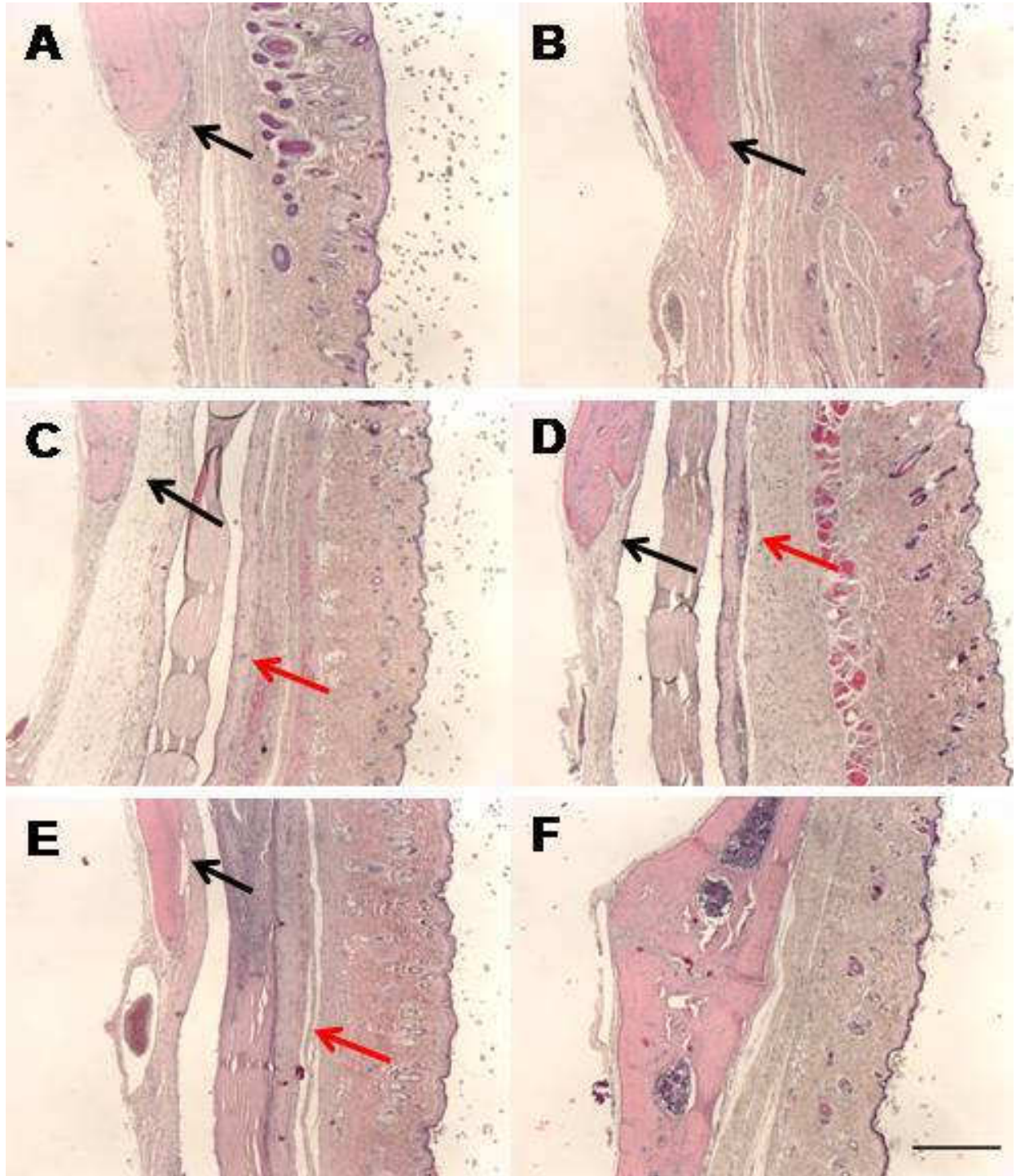
12 semanas n=12	Sham	Controle	CPA GA	CPA 25GA	CPA 75GA
Reabsorção da membrana	-----	4(4)	0(0)#	0(0-1)#	3(0-4)
Presença de cápsula fibrosa	0%	0%	100%	100%	81,81%

Figura 26: Aspecto microscópico das membranas implantadas sob o tecido subcutâneo da calvária de ratos 4 semanas após a confecção de defeito crítico de 5.25mm.



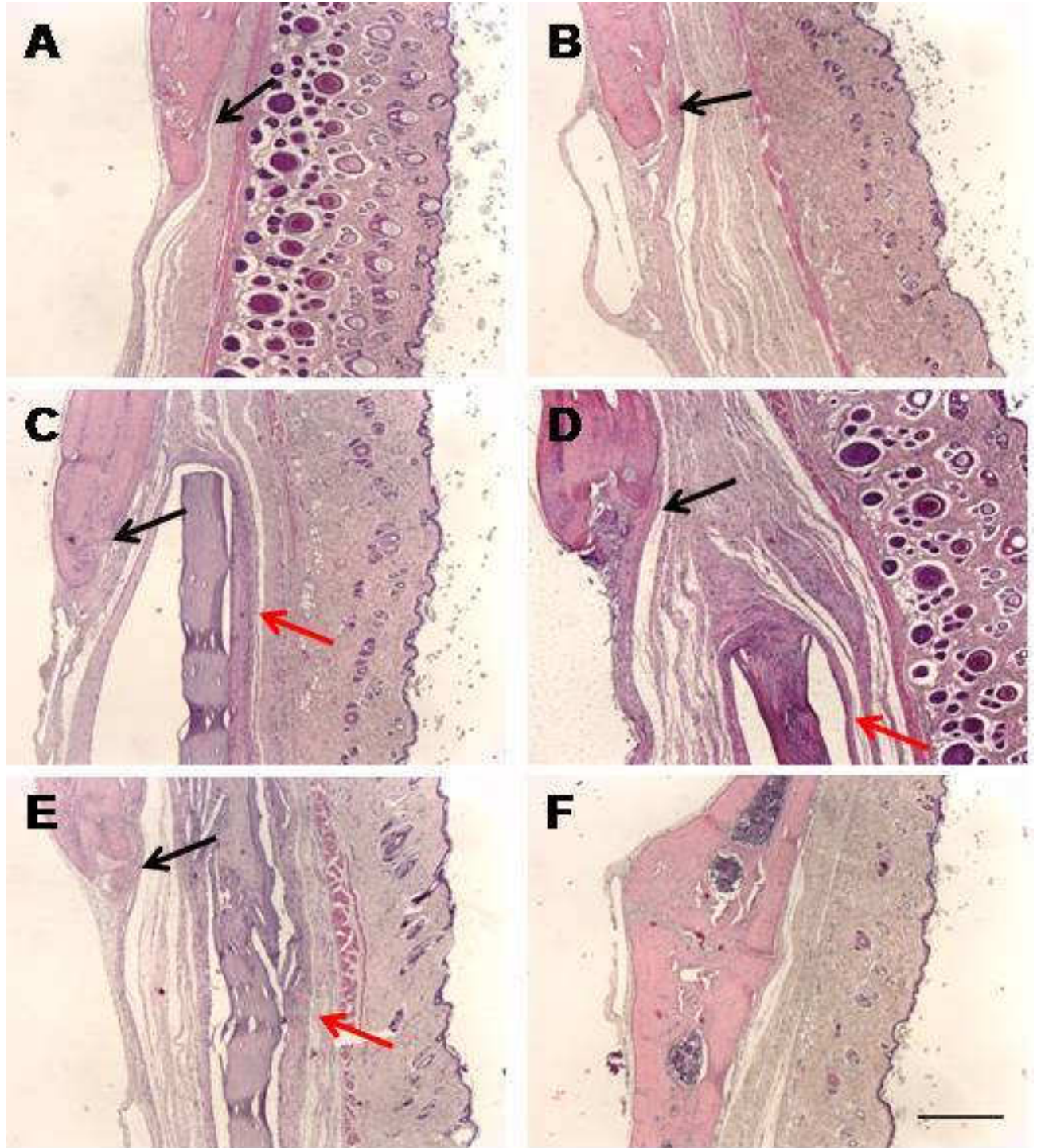
Após o procedimento cirúrgico, as membranas, a calvária e o tecido circunjacente foram removidos, processados e corados com hematoxilina/eosina. As fotomicrografias representam (A) Sham, (B) Controle, (C) CPA GA, (D) CPA 25GA, (E) CPA 75GA e (F) animais não operados. As setas pretas representam o osso neo-formado. As setas vermelhas representam a cápsula fibrosa. Barra de escala: 250 μ m (X40 aumento).

Figura 27: Aspecto microscópico das membranas implantadas sob o tecido subcutâneo da calvária de ratos 8 semanas após a confecção de defeito crítico de 5,25mm.



Após o procedimento cirúrgico, as membranas, a calvária e o tecido circunjacente foram removidos, processados e corados com hematoxilina/eosina. As fotomicrografias representam (A) Sham, (B) Controle, (C) CPA GA, (D) CPA 25GA, (E) CPA 75GA e (F) animais não operados. As setas pretas representam o osso neo-formado. As setas vermelhas representam a cápsula fibrosa. Barra de escala: 250 μ m (X40 aumento).

Figura 28: Aspecto microscópico das membranas implantadas sob o tecido subcutâneo da calvária de ratos 12 semanas após a confecção de defeito crítico de 5,25mm.



Após o procedimento cirúrgico, as membranas, a calvária e o tecido circunjacente foram removidos, processados e corados com hematoxilina/eosina. As fotomicrografias representam (A) Sham, (B) Controle, (C) CPA GA, (D) CPA 25GA, (E) CPA 75GA e (F) animais não operados. As setas pretas representam o osso neo-formado. As setas vermelhas representam a cápsula fibrosa. Barra de escala: 250 μ m (X40 aumento).

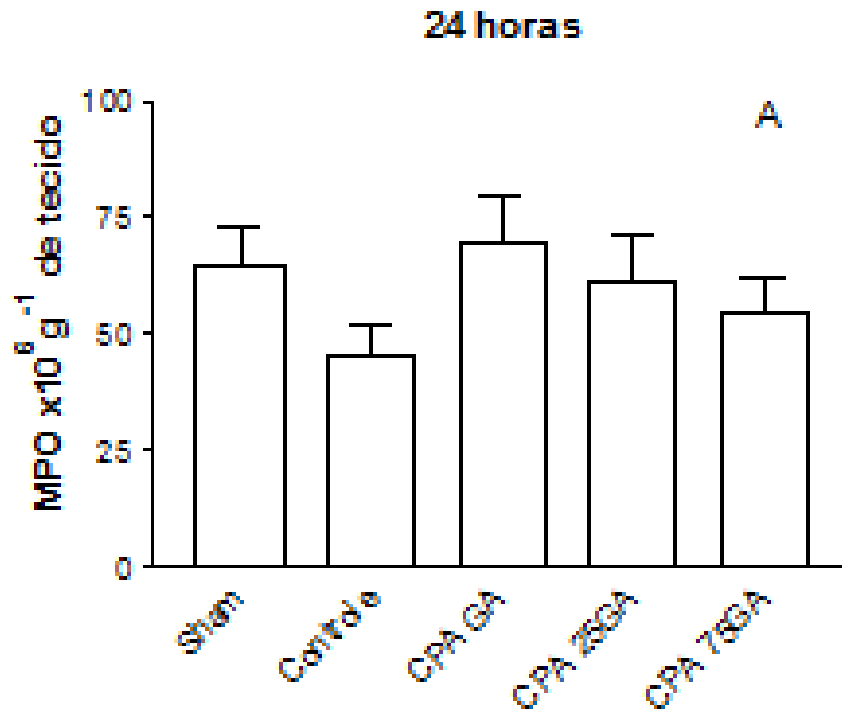
7.3 Atividade de mieloperoxidase (MPO) no tecido subcutâneo adjacente ao defeito da calvária

Não houve diferença estatística entre os grupos em relação à atividade de mieloperoxidase ($p>0,05$) (Figura 29).

7.4 Dosagem de citocinas (IL-1 β , TNF- α) no tecido subcutâneo adjacente ao defeito da calvária

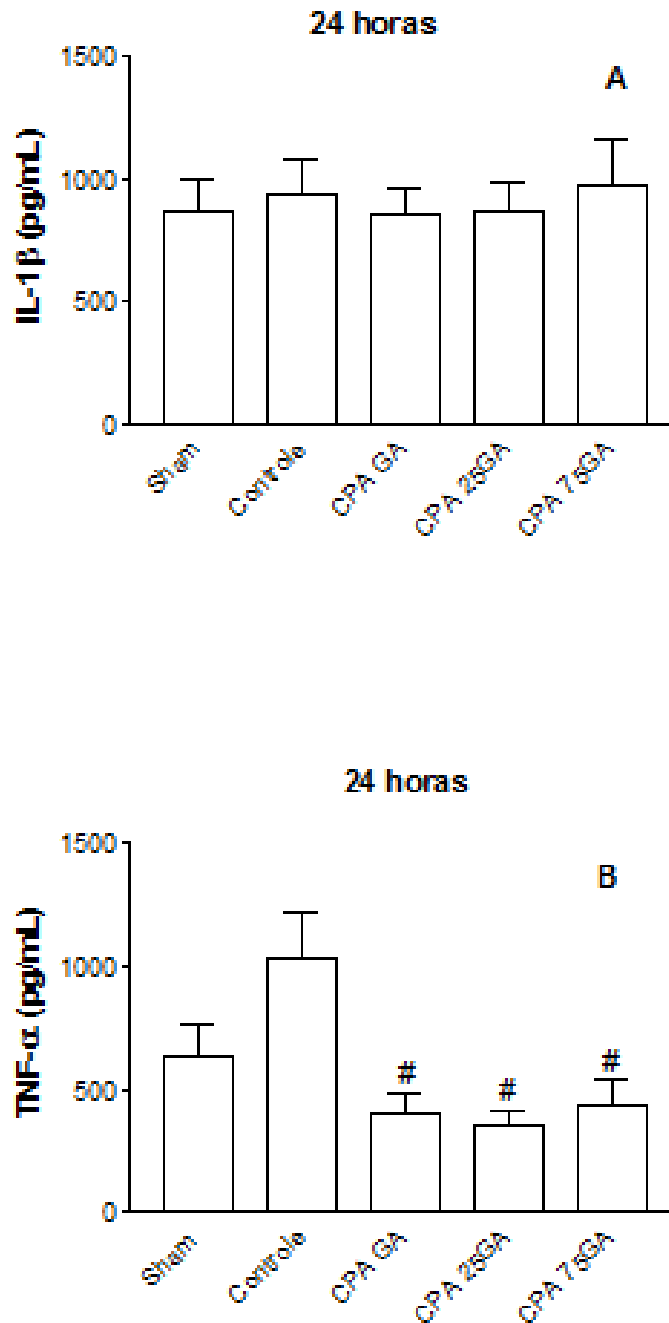
Após 24 horas do procedimento cirúrgico, não houve diferença estatística significativa na dosagem da citocina pró-inflamatória IL-1 β nos grupos experimentais CPA GA, CPA 25GA e CPA 75GA comparados com os grupos Sham e Controle ($p>0,05$) (Figura 30A). Já com relação a citocina TNF- α , houve diferença estatística entre os grupos experimentais CPA GA, CPA 25GA e CPA 75GA se comparados ao grupo Controle, onde a produção desta citocina foi menor ($\#p<0.05$) (Figura 30B).

Figura 29: Atividade de mieloperoxidase (MPO) no tecido subcutâneo adjacente ao defeito da calvária.



Os animais tiveram a amostra de cada membrana e do tecido subcutâneo adjacente ao defeito da calvária removidos 24 horas após o procedimento cirúrgico para análise da atividade de MPO. A barra representa o valor médio \pm o erro padrão da média (SEM). Não houve diferença estatística entre os grupos. Os dados foram analisados pelos testes de Análise de Variância (ANOVA) e Bonferroni.

Figura 30: Dosagem de citocinas (IL-1 β , TNF- α) no tecido subcutâneo adjacente ao defeito da calvária.



Os animais tiveram a amostra de cada membrana e do tecido subcutâneo, adjacente ao defeito da calvária, removidos 24 horas após o procedimento cirúrgico para dosagem de citocinas IL-1 β (A), TNF- α (B). A barra representa o valor médio \pm o erro padrão da média (SEM). #P<0,05 representa diferença estatística em relação ao grupo controle. Os dados foram analisados pelos testes de Análise de Variância (ANOVA) e Bonferroni.

8 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou a eficácia de três membranas de colágeno obtidas a partir de serosa de intestino bovino, mineralizadas por processos alternativos de imersão em 0, 25 e 75 ciclos de hidroxiapatita e reticuladas com glutaraldeído na cicatrização óssea, utilizando um modelo de defeito ósseo crítico em calvária de ratos. A relevância do trabalho baseia-se na importância do desenvolvimento de barreiras físicas, de lenta reabsorção, que preservem o espaço necessário para a neoformação óssea, prevenindo a invasão dessa área por tecido conjuntivo fibroso (DAHLIN *et al.*, 1988; DAHLIN *et al.*, 1989). Essa técnica, conhecida como regeneração óssea guiada (ROG), foi desenvolvida a partir do princípio da regeneração tecidual guiada (RTG), originalmente usada para o tratamento de defeitos periodontais, e hoje aplicada com sucesso no tratamento de diversos tipos de defeitos ósseos (KARRING *et al.*, 1993; NYMAN *et al.*, 1995). Essas membranas de colágeno reabsorvíveis, desenvolvidas pela Universidade Federal do Ceará são manufaturadas por um processo simples e de baixo custo operacional, o que permitiria sua comercialização em grande escala.

A primeira parte deste trabalho teve como finalidade avaliar a biocompatibilidade e tempo de reabsorção destas membranas (CPA GA, CPA 25GA, CPA 75GA) bem como de membranas de colágeno mineralizadas, mas não reticuladas com glutaraldeído (CPA, CPA 25, CPA 75), após implantação em tecido subcutâneo de ratos. Uma membrana comercial de colágeno confeccionada a partir de osso cortical bovino desmineralizado foi selecionada como controle por ser amplamente utilizada e aprovada clinicamente. No presente estudo, as membranas experimentais sem reticulação com glutaraldeído sofreram biodegradação precoce e apenas fragmentos estavam ainda presentes 120 dias após a implantação. Todas as membranas experimentais com reticulação (CPA GA, CPA 25GA e CPA 75GA), entretanto, encontravam-se intactas no tecido subcutâneo após 120 dias, o que as caracteriza como uma boa opção para uso em terapia de RTG e ROG, uma vez que muitas pesquisas têm demonstrado que a membrana deve permanecer intacta por um período superior a 30 dias para evitar o crescimento de tecido mole, que impediria o crescimento ósseo desejado (IGLHAUT *et al.*, 1998). Se a membrana for reabsorvida antes de 4 semanas, esse objetivo não será alcançado (AUKHILL *et al.*,

1986). Vários autores defendem que membranas absorvíveis utilizadas nos procedimentos de ROG devem suportar a formação óssea e maturação por um período de no mínimo de 6 meses (SCHENK 1994; HUTMACHER *et al.*, 2001).

Observamos que a absorção da membrana comercial controle no tecido subcutâneo iniciou-se precocemente e no 15º dia já apresentava-se completamente reabsorvida. Estes dados estão de acordo com a literatura mostrando que a degradação das membranas de colágeno pode-se iniciar de 4 a 28 dias após o seu posicionamento (ZHAO *et al.*, 2000; OWENS; YUKNA 2001). No que diz respeito a defeitos periodontais, um dos tópicos fundamentais em relação à RTG e ROG é o quanto essa membrana deve permanecer no local com a função de proteger as células do ligamento periodontal contra o crescimento do tecido gengival (IGLHAUT *et al.*, 1998). Embora uma duração de 10 dias pareça ser longa bastante para evitar a migração apical do epitélio, se a membrana de colágeno for completamente reabsorvida antes de 30 dias, novo cemento pode ser encontrado na área de cicatrização, mas osso neo-formado não será produzido (PITARU *et al.*, 1989). O cemento é o tecido mineralizado que recobre as raízes dentárias, ancorando as fibras do ligamento periodontal; não contém vasos (sanguíneos e linfáticos), não possui inervação e nem sofre remodelação fisiológica, ao contrário do osso alveolar.

As análises dos parâmetros inflamatórios realizadas no presente estudo demonstraram que as respostas inflamatórias induzidas pela implantação subcutânea das membranas sem reticulação foram mais acentuadas do que aquelas desencadeadas pelas membranas reticuladas. Este fato está de acordo com Lee *et al.* (2002), que observaram que numerosas células multinucleadas e neutrófilos são comumente encontrados no tecido conjuntivo ao longo da superfície dos resíduos das membranas de colágeno em 30 dias. Nesse contexto, a biodegradação precoce sofrida pelas membranas experimentais sem reticulação no tecido subcutâneo pode justificar nossos achados, uma vez que a presença dos fragmentos dessas membranas durante os estágios iniciais de cicatrização estariam contribuindo para a amplificação da resposta inflamatória. Estes resquícios podem responder ainda pela presença de células gigantes, evidenciadas pela análise histológica, margeando as membranas sem reticulação. Células gigantes são células multinucleadas, formadas a partir do fusionamento de macrófagos, que fagocitam corpos estranhos de grandes dimensões. De fato, não foram encontradas células gigantes de corpo estranho nos

grupos que receberam os implantes subcutâneos de membranas reticuladas com glutaraldeído, mais resistentes à biodegradação. Nesses grupos, observamos ainda uma clara diminuição da resposta inflamatória, evidenciada pela reduzida contagem de leucócitos e pelos menores níveis de citocinas encontrados no tecido ao redor dessas membranas. Baseado nessas observações, um período de cicatrização mais longo (6 meses) pode ser necessário para que as membranas de colágeno sem reticulação usadas na RTG alcancem melhores resultados, permitindo que o espaço ocupado pela membrana e células inflamatórias seja lentamente substituído por tecido conjuntivo, osso e cimento (LEE *et al.*, 2002).

Todos os biomateriais usualmente ativam uma leve resposta inflamatória no hospedeiro. Essa resposta normalmente se estende por um período de tempo maior do que o observado na cicatrização de defeitos sem membranas e é esperada e até mesmo desejável, visto que, atualmente, o conceito de biocompatibilidade evoluiu; não mais se supõe que materiais biocompatíveis devam ser absolutamente inertes ou inócuos, mas que as respostas induzidas ao organismo hospedeiro sejam controláveis. Uma reação inflamatória mais longa pode causar um atraso no processo de cicatrização. A biocompatibilidade dos biomateriais é avaliada principalmente pela reação do tecido onde estes são aplicados. Os biomateriais podem ser classificados como bioinertes ou bioativos. Bioinertes são materiais que não desempenham nenhuma atividade no hospedeiro quando implantados, enquanto que os bioativos estimulam à uma resposta desejada. O material biocompatível ideal, utilizado como indutor da cicatrização, deve ser bioativo, induzindo o estímulo a todas as fases da cicatrização, além de ser reabsorvível, não sendo necessária uma segunda etapa cirúrgica para sua remoção. Também é importante salientar que os produtos decorrentes da sua reabsorção não deveriam interferir no processo de cicatrização (CHESTER, 1987; WILLIAMS, 1987).

Dois procedimentos de reticulação para estabilização do colágeno têm sido desenvolvidos, o tratamento com radiações gama e ultravioleta, e o tratamento químico. O procedimento químico de reticulação, freqüentemente envolve reagentes bifuncionais contendo grupos reativos tipo glutaraldeído e diisocianatos ou envolve ativação de grupos carboxílicos seguido de reação com grupos amino da molécula (carbodiimida e acil azida). A reticulação de colágeno com glutaraldeído envolve a reação de grupos amino livres de resíduos de aminoácidos lisina e hidroxilisina nas

cadeias de polipeptídeo com os grupos aldeídos (CHANG *et al.*, 2001). No presente estudo, a reticulação da membrana com glutaraldeído (GA) foi realizada gradualmente com solução de 0,01% (1h) e 0,05% (7h) GA, menor do que a concentração de GA descrita na literatura (GOISSIS *et al.*, 1999). Essa nova metodologia de reticulação provavelmente contribuiu para a reduzida reação inflamatória observada no nosso estudo. O uso de 0,05% GA como reagente de ligação cruzada para controlar o grau de biodegradabilidade das membranas de colágeno foi baseado no fato que tem sido o reagente de escolha para melhorar as propriedades mecânicas e a biocompatibilidade de muitos dispositivos de colágeno implantados (BOON; RUIJGROK; VARDAXI, 1995). Membranas de colágeno aniônicos reticuladas com 0,05% GA apresentaram boa biocompatibilidade sem efeitos biológicos adversos e a biodegradação controlada foi alcançada em função do tempo de exposição ao GA. O comportamento biológico observado com membranas reticuladas com GA em 8-h sugere que as membranas de colágeno aniônico podem ter uso potencial, não só associado com a RTG para reconstrução dos tecidos periodontais, mas também em outras aplicações de biomateriais de colágeno, aonde controlada biodegradabilidade é requerida (GOISSIS *et al.*, 1999).

Entretanto, quando a reticulação é muito intensa ocorre uma redução na flexibilidade da membrana, dificultando sua acomodação aos diversos tecidos, como osso e dente (MINABE *et al.*, 1989). Desta forma, o grau ideal de reticulação não foi ainda totalmente definido. Embora a reticulação seja um procedimento desejável na preparação da membrana, este procedimento pode prolongar a citotoxicidade do material. O uso de reticulação a 0,05% GA foi baseado no fato que o mesmo melhora as propriedades mecânicas e a biocompatibilidade do colágeno e que a reticulação a 0,1% GA é caracterizada por uma alta estabilidade e biocompatibilidade pós implantação, sem sinais de efeitos citotóxicos (VAN LUYN *et al.*, 1992; BOON; RUIJGROK; VARDAXI, 1995). Nossos dados mostraram que as membranas reticuladas não foram reabsorvidas no período de 120 dias e que talvez um período de observação mais longo seja necessário para que se inicie o processo de reabsorção. Caso a reabsorção não aconteça, essa membrana teria que ser removida cirurgicamente, fato não desejado. Sugere-se que uma menor concentração de reticulação (0,01% de GA durante todo o processo) poderia permitir

uma degradação mais rápida desta membrana, o que será avaliado nos próximos estudos.

Outra vantagem citada na literatura das membranas reticuladas é sua capacidade de cicatrização, até quando prematuramente expostas ao meio bucal contaminado. Esse fato foi parcialmente explicado pelo fato que, embora exposta prematuramente, essas membranas tem a capacidade de suportar a degradação colagenolítica bacteriana enquanto facilita a cicatrização de tecido mole sobre a membrana exposta (MOSES *et al.*, 2005).

Observamos, em todos os grupos experimentais, intensa marcação imunohistoquímica para metaloproteinase nos tecidos circunjacentes às membranas, 7 dias após a implantação, o que revela uma pré-disposição do hospedeiro em degradar essas membranas, independentemente da sua composição. As metaloproteinases da matriz (MMP) fazem parte de uma família de enzimas peptidase responsáveis pela degradação dos componentes da matriz extracelular, incluindo colágeno. MMP-1 é designada como colagenase intersticial, fibroblasto colagenase, ou colagenase 1 e MMP-8 é designada como colagenase neutrofílica, colagenase PMNL, ou colagenase tipo 2 e degrada colágeno tipos I, II e III. MMP-8 é expressa exclusivamente em condições inflamatórias (REYNOLDS *et al.*, 1994; ARMSTRONG; JUDE, 2002). A metaloproteinase MMP-8 é o tipo predominante na periodontite. A principal origem desta colagenase é a partir de neutrófilos degranulados e extravasados, os quais estão presentes na gengiva inflamada. Elevados níveis de MMP-8 estão altamente correlacionados com a profundidade de sondagem, perda clínica da fixação do dente e sangramento à sondagem (RAI *et al.*, 2008).

A intensa marcação imunohistoquímica para MMP1/8 foi observada em todos os grupos experimentais, sete dias após a implantação subcutânea das membranas. A principal origem da MMP-8 é a partir de neutrófilos extravasados. Uma das formas de avaliar a migração de neutrófilos para os tecidos é através do ensaio da atividade de mieloperoxidase (MPO), enzima presente nos grânulos azurófilos dessas células. Como detectamos baixa atividade de MPO nos tecidos subcutâneos circunjacentes às membranas testadas no sétimo dia de experimento, esperávamos uma fraca marcação para MMP1/8 nesse período, a não ser que a marcação tenha

evidenciado a MMP-1. A atividade da MMP-8, de fato, era limitada anteriormente aos neutrófilos (SORSA *et al.*, 2004), no entanto têm sido descrito na literatura que muitos outros tipos celulares presentes no periodonto de humanos, em condições normais e patológicas, como células epiteliais do sulco gengival, fibroblastos, células endoteliais, monócitos, macrófagos e células plasmáticas podem ser induzidas a ativar MMPs distintas, inclusive MMP-8 (TERVAHARTIALA *et al.*, 2000; UITTO *et al.*, 2000). No presente trabalho, portanto, macrófagos ou monócitos, juntamente com fibroblastos, podem ser as células responsáveis pela intensa expressão de MMP-1/8 nos tecidos subcutâneos no sétimo dia após a implantação das membranas.

Os dados obtidos na primeira parte do presente estudo sugerem, portanto, que as membranas experimentais reticuladas com glutaraldeído, além de permanecerem íntegras por mais tempo, são mais biocompatíveis em relação às membranas sem reticulação, motivo pelo qual as membranas reticuladas (CPA GA, CPA 25GA e CPA 75GA) foram selecionadas para a segunda parte do presente estudo, cuja finalidade foi avaliar a eficácia dessas membranas na regeneração óssea guiada. Utilizou-se para esse fim o modelo de defeito crítico em calvária de ratos, desenvolvido por Freeman e Turnbull (1973), pois se apresenta apropriado para o estudo de regeneração óssea, pela facilidade de manuseio, estabilidade e pelo baixo risco de complicações. Modelos animais para o estudo de regeneração óssea devem satisfazer os seguintes critérios: 1) O menor tamanho de defeito ósseo não deve ser menor do que o defeito ósseo crítico para cada espécie determinada; 2) o modelo não deve ser caro; 3) os animais devem estar disponíveis e serem fáceis de manipular e anestésiar; 4) o sítio do implante deve incluir osso cortical e medular; 5) o defeito ósseo deve ser estável e não permitir morbidade; 6) o risco de fratura deve ser minimizado; 7) o modelo animal deve permitir acompanhamento tanto radiográfico quanto histológico da regeneração óssea (BOSCH; MELSEN; VARGERVIK, 1998).

Quando se utiliza o modelo de defeito ósseo crítico, essas membranas posicionadas sobre o defeito cirúrgico permitem tempo para que células mesenquimais ósseas, de crescimento lento, possam repovoar o defeito, enquanto evita o rápido crescimento do tecido epitelial e conjuntivo (CLOKIE; URIST 2000). O tamanho do defeito ósseo de calvária utilizado em nosso estudo (5,25mm) está de acordo com vários estudos prévios de defeito ósseo crítico em ratos (MARDAS;

KOSTOPOULOS; KARRING, 2002; FURLANETO *et al.*, 2007; MARDAS, KOSTOPOULOS, KARRING, 2008; KOZLOVSKY *et al.*, 2009; POTIJANYAKUL *et al.*, 2010). A sutura sagital foi utilizada como referência para padronizar a posição do defeito ósseo em todos os animais, de forma que o maior diâmetro do defeito coincidiu com a sutura. Qualquer possibilidade de inclusão do tecido conjuntivo da sutura sagital estaria presente em todos os grupos. Modelos experimentais similares que incluem a sutura sagital têm sido relatados em outros estudos (BRUNEL *et al.* 1996; MARDAS; KOSTOPOULOS; KARRING, 2002; KIM *et al.*, 2004). Parece razoável afirmar que células precursoras da sutura da região dorsal e frontal do defeito migram para a ferida cirúrgica pelo espaço criado pela membrana antes que as células ósseas originárias das margens dos defeitos tenham ocupado a área (MARDAS; KOSTOPOULOS; KARRING, 2002). Tradicionalmente, muitos autores têm utilizado 8 milímetros como um defeito crítico no osso do crânio de ratos, como descrito por Ray *et al.* (1957). No entanto, outros autores descreveram o defeito de 5 mm ser suficiente no osso de calvárias de Sprague-Dawley e ratos Wistar, uma vez que apresenta uma regeneração incompleta ao longo do tempo (BOSH *et al.*, 1995). O tamanho menor tem várias vantagens, tais como a prevenção de lesão do seio sagital venoso e a possibilidade de realizar duas craniectomias em cada animal. Em geral, o defeito ósseo criado em calvária de ratos representa um modelo experimental adequado para a regeneração de osso membranoso. Fisiologicamente, o osso cortical da calvária se assemelha a uma mandíbula atrófica, portanto, resultados também podem ser aplicados a área maxilo-facial (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986). Foi decidido não fixar as membranas testadas, pois se essas membranas mostrassem resultados satisfatórios apenas com fixação, seria uma grande desvantagem para a prática clínica, pois essas membranas não seriam capazes de competir com as membranas de colágeno já disponíveis no mercado.

Na nossa pesquisa, avaliamos o tecido ósseo calcificado através de radiografias digitais e tomografias computadorizadas e o tecido ósseo descalcificado por meio de cortes histológicos. Desta forma, os métodos utilizados para investigar a formação óssea se complementaram, resultando numa maior confiabilidade dos resultados. É importante esclarecer que, além de avaliar e quantificar neoformação óssea, analisamos outros aspectos referentes à resposta inflamatória induzida pela

implantação das membranas nos tecidos circunjacentes, assim como a biodegradação sofrida por essas membranas.

As radiografias digitais e tomografias computadorizadas mostram-se técnicas úteis e confiáveis para mensurar a nova formação óssea, especialmente em modelo de defeito crítico, aonde o contorno original do defeito pode ser facilmente recuperado (SCHORTINGHUIS *et al.*, 2005; MARECHAL *et al.*, 2005). A tomografia computadorizada produz uma imagem de alta resolução, é rápida, a dose de radiação é mínima e pode produzir uma imagem óssea adequada de pequenos animais, além de consumir menor tempo do que a análise histológica (PRYOR; SUSIN; WIKESJO, 2006). Alguns autores, usando modelo crítico em calvária, só consideram os dados qualitativos após avaliação radiográfica (DUPOIRIEUX *et al.*, 2009). Outros autores também encontraram baixos valores de acurácia quando avaliações radiográficas foram empregadas e não recomendam a utilização de métodos radiográficos sem a confirmação histológica (PRYOR; SUSIN; WIKESJO, 2006).

No nosso estudo, os dados obtidos pela tomografia computadorizada mostraram-se mais confiáveis, pois o defeito cirúrgico pode ser analisado com maior nitidez, escolhendo-se o melhor corte para a realização da mensuração. Embora os resultados obtidos com a radiografia digital e tomografia computadorizada sejam bastante similares, nos períodos avaliados, a tomografia computadorizada mostrou-se mais sensível que a radiografia digital na avaliação das diferenças entre os grupos. Como a formação óssea é um processo tri-dimensional (3D), técnicas que forneçam medições em 3D são mais apropriadas para analisar a formação óssea durante o processo de cicatrização do que as que fornecem imagens em 2 dimensões (2D), como as radiografias digitais e os estudos histológicos. Recentemente, metodologias alternativas têm sido desenvolvidas para a pesquisa sobre a cicatrização óssea, especialmente após fraturas, incluindo análise microrradiográfica, testes mecânicos, densitometria e de marcadores biológicos (YEOM *et al.*, 2008). Micro Tomografia Computadorizada pode fornecer informações quantitativas em relação ao padrão tridimensional e distribuição de mineralização ao nível macromolecular da estrutura óssea, avaliação da espessura e número de trabéculas ósseas, densidade mineral, que são fortemente

correlacionados com propriedades mecânicas e do estado de modelagem e remodelamento dentro de uma região (MUCHLER *et al.*, 2010).

A avaliação histológica, nessa análise específica, foi complementar, pois permitiu a exclusão dos dados coletados (dados das radiografias digitais e tomografias computadorizadas) de animais nos quais se observou deslocamento completo da membrana, ou seja, a membrana não foi evidenciada no corte histológico. Embora a histomorfometria seja utilizada em vários trabalhos como o método selecionado para mensurar a neoformação óssea (FURLANETO *et al.*, 1997), requer tempo substancial e esforço para o preparo das amostras, incluindo a incorporação em parafina ou metilmetacrilato, seccionamento em fatias finas (4 a 100 μm de espessura) e múltiplos procedimentos de coloração, ao contrário da tomografia computadorizada, que consome bem menos tempo. Outro aspecto limitante da análise histológica para a quantificação óssea é a impossibilidade de utilizar as amostras para outras avaliações ou ensaios (YEOM *et al.*, 2008). Ademais, observamos no presente estudo, no que diz respeito à quantificação da formação óssea, que a avaliação histológica mostrou-se menos sensível, pois se observa claramente nas análises por imagem que a neo-formação óssea é irregular. Dessa forma, o osso neo-formado que não se encontra no plano de corte não seria evidenciado na análise histológica, comprometendo os resultados.

Histologia é importante para caracterizar o padrão e distribuição de celularidade no osso desmineralizado, parâmetro fortemente relacionado à cinética da formação óssea e mineralização, uma vez que evidencia a presença de células relacionadas ao metabolismo ósseo (osteócitos, osteoblastos e osteoclastos). A análise histopatológica também permite a caracterização da natureza do tecido ósseo nas regiões não mineralizadas intertrabeculares com relação às células hematopoiéticas, tecido gorduroso e fibrose, vascularização e o status de uma resposta inflamatória local residual induzida pelos materiais implantados. Ademais, a realização de análises imunohistoquímicas pode refinar ainda mais a caracterização de fenótipos de células, como também evidenciar a liberação de proteínas por essas células, uma vez que se utiliza marcadores moleculares específicos (MUCHLER *et al.*, 2010).

Em nossa pesquisa os dados das radiografias digitais e tomografias computadorizadas 4 e 12 semanas após a implantação das membranas mostram aumento significativo na formação óssea nos grupos CPA GA e CPA 25GA, em relação ao grupo que não recebeu nenhuma membrana recobrimo o defeito ósseo (sham), mostrando-se superior a membrana controle. Nossos resultados estão de acordo com estudos que demonstram a eficácia de membranas de colágeno testadas em animais e utilizadas clinicamente em humanos na regeneração óssea (ZITZMANN *et al.*, 1997; HOCKERS *et al.*, 1999). O uso clínico dessas membranas na região circunjacente a implantes dentários resultou em melhor preservação dos níveis de osso marginal em comparação à membranas não reabsorvíveis (ZITZMANN; SCHARER; MARINELLO, 2001), reforçando dados da literatura que relatam melhores resultados do colágeno em relação à outros materiais utilizados na ROG, como barreiras de polímero e politetrafluoroetileno (MAO *et al.*, 1997).

A carga elétrica negativa das membranas de colágeno utilizadas neste trabalho pode afetar o comportamento das células e a distribuição dos componentes extra-celulares do tecido. A principal característica da mudança da carga do colágeno é a melhora nas propriedades dielétricas comparado ao colágeno nativo. Foi mostrado que superfícies carregadas positivamente induzem a formação de tecido conjuntivo, enquanto superfícies carregadas negativamente estimulam a formação de tecido ósseo (GOES *et al.*, 2002). A matriz de colágeno aniônico é um material promissor para recuperação de defeitos ósseos por causa de sua biocompatibilidade e osteocondutividade, bem como a habilidade de atuar no período de cicatrização sem os atrasos associados a outras membranas (ROCHA; GOISSIS; ROSSI, 2002).

O aumento na regeneração óssea, observada nos grupos CPA GA e CPA 25GA, resultou na redução, em torno de 40 a 50% do defeito ósseo em relação ao defeito original. Uma das razões para não ter ocorrido o completo fechamento do defeito ósseo nesses grupos pode estar relacionado com a qualidade do osso adjacente ao defeito, fator importante na regeneração óssea. Defeitos em osso compacto (qualidade tipo I) têm mostrado reduzido preenchimento ósseo se comparado ao osso do tipo mais medular (ZITZMANN; SCHARER; MARINELLO, 1999). Como o osso cortical da calvária de ratos é considerado como osso tipo I, isso pode ter influenciado a diminuição da regeneração óssea quando comparado a

defeitos em osso mandibular, que apresenta maior quantidade de osso medular (ZITZMARM; ZCHARER; MARINEUO, 1999). Outra razão importante está relacionada a geometria do defeito, em particular a relação entre largura e profundidade. Essa relação afeta o potencial das células adjacentes das paredes ósseas de repopularem a área e completar o preenchimento do defeito. Nesse sentido, a geometria rasa do defeito da calvária fornece baixo potencial regenerativo e também exige propriedades mecânicas superiores das barreiras mecânicas, a fim evitar o colapso para o interior do defeito, impedindo a neoformação óssea (DUPOIRIEUX *et al.*, 2001).

Algumas membranas testadas neste trabalho foram mineralizadas, uma vez que tem sido demonstrado que arcabouços de apatita ou compósitos de colágeno-apatita são mais apropriados para adesão e proliferação de osteoblastos (CHEN *et al.*, 2006). Colágeno mineralizado produz melhor biocompatibilidade em tecidos humanos e animais em relação ao colágeno puro (SILVA *et al.*, 2004). Assim como o enxerto de tecido duro, o colágeno mineralizado também apresenta o efeito de condutividade que aumenta o crescimento de tecido ósseo (KIKUCHI *et al.*, 2001; LIAO *et al.*, 2005). Ademais, a incorporação de hidroxiapatita contribui para aumentar a resistência da membrana de colágeno, impedindo o seu colapso para o interior do defeito ósseo (SCHLIEPHAKE *et al.*, 2004).

Embora a literatura relate que arcabouços de colágeno mineralizados com hidroxiapatita propiciem a regeneração óssea, nossos dados não mostraram, em nenhum período de observação, diferenças significativas na formação óssea entre os grupos que receberam membranas impregnadas com hidroxiapatita (CPA 25GA e CPA 75GA) e o grupo CPA GA, cujos animais receberam membranas sem impregnação. Esse resultado sugere que a impregnação não promoveu aumento da disponibilidade de cristais de hidroxiapatita para o meio, provavelmente em decorrência da reticulação com glutaraldeído, que por ter sido realizada após a impregnação de hidroxiapatita, pode ter promovido o fechamento das fibras das membranas, comprometendo a liberação desses cristais para a ferida cirúrgica. Talvez seja necessário diminuir ainda mais o grau de reticulação para se obter melhores resultados. Não podemos deixar de levar em consideração, entretanto, que uma menor reticulação pode resultar em maior biodegradação das membranas, o que também pode comprometer o crescimento ósseo.

A liberação dos cristais de hidroxiapatita pode ter sido comprometida também pela presença da cápsula fibrosa ao redor das membranas, especialmente das membranas reticuladas, que apresentaram cápsula mais espessa com o decorrer do tempo, tanto quando implantadas em tecido subcutâneo como em calotas cranianas.

Dados na literatura demonstram que membranas de colágeno reticuladas não permitem a penetração dos elementos do tecido conjuntivo na sua superfície e não mostram sinais de integração com tecidos vizinhos. A falta de adesão entre essas membranas e o tecido adjacente, bem como a falta de vascularização e integração tecidual, pode resultar na tendência da membrana de se separar do tecido conjuntivo adjacente (TAL *et al.*, 2008). Esse fato pode contribuir para justificar a intensa fibrose encontrada em torno das membranas reticuladas no presente estudo. Alguns animais tiveram de ser excluídos das análises efetuadas, pois não foram encontrados vestígios das membranas no tecido subcutâneo sobre a calvária, quando visualizados na histologia, o que leva a supor que essas membranas foram deslocadas do local inicial de implantação. A falta de fixação das membranas aos ossos da calvária pode ter propiciado esses deslocamentos, apesar das propriedades inerentes do colágeno de aderir aos tecidos subjacentes sob leve pressão. Temos que considerar, ainda, que as membranas mineralizadas e reticuladas são mais rígidas que as do grupo controle, confeccionadas a partir de colágeno apenas, o que facilita a movimentação dessas membranas, favorecendo a formação da cápsula fibrosa. As interações dos animais entre si e dos animais com as paredes de suas caixas aumentam o atrito mecânico e exacerba os deslocamentos das membranas (SCHLIEPHAKE *et al.*, 2004). A maior rigidez das membranas reticuladas, no entanto, funciona como uma barreira, impedindo que haja o colapso do tecido conjuntivo e da própria membrana para o interior do defeito, o que é uma vantagem no caso de defeitos ósseos maiores. Sugere-se que a fixação dessas membranas à calvária poderia impedir a formação de uma cápsula fibrosa resultando em maior formação óssea nos grupos que receberam membranas reticuladas e mineralizadas com hidroxiapatita.

Em todos os períodos avaliados, as membranas experimentais dos grupos CPA GA e CPA 25GA apresentaram-se íntegras e envolvidas por espessa cápsula fibrosa, confirmando os dados obtidos em tecido subcutâneo de ratos (VERÍSSIMO *et al.*, 2010). Apenas as membranas do grupo experimental CPA 75GA,

apresentaram sinais de reabsorção. No modelo de calvária, as membranas comerciais de colágeno utilizadas como grupo controle ainda estavam presentes no período de 4 e 8 semanas, diferente dos nossos resultados em tecido subcutâneo de ratos, onde essa reabsorção se deu em torno de 15 dias. A diferença no grau de reabsorção da membrana, observada nos dois modelos experimentais, deve-se, provavelmente, à menor vascularização do tecido da calvária se comparado com o tecido subcutâneo da região dorsal dos ratos Wistar (VERÍSSIMO *et al.*, 2010). Não está claro se o processo de degradação das membranas pode impedir a regeneração óssea, mas se fragmentos das membranas permanecerem acumulados no centro do defeito durante os estágios iniciais de cicatrização, pode sugerir uma interferência mecânica na diferenciação osteogênica de células mesenquimais indiferenciadas (SCHLIEPHAKE *et al.*, 2004).

A avaliação histológica realizada no presente estudo sugere fortemente que a presença de cápsula fibrosa está intimamente relacionada com a reabsorção destas membranas. De fato, não foi detectada presença de cápsula fibrosa no grupo controle, cujas membranas sofreram intensa biodegradação. Observamos ainda, no grupo CPA 75GA, o desaparecimento da cápsula fibrosa à medida que as membranas eram reabsorvidas. O tipo de membrana a ser utilizada deve ser selecionado de acordo com as demandas clínicas de cada caso. Membranas com alta reabsorção devem apresentar um efeito menor do que o indicado (MOSES *et al.*, 2008). Em defeitos ósseos amplos, onde barreiras devem permanecer por maior tempo, as membranas reticuladas podem apresentar vantagens.

A indicação dessas membranas experimentais (CPA GA, CPA 25GA e CPA 75GA) é reforçada pelo fato de não desencadarem reação inflamatória importante nos tecidos circunjacentes às membranas implantadas na calota craniana, reforçando os dados obtidos em tecido subcutâneo (VERÍSSIMO *et al.*, 2010), o que pode ser confirmado pelas dosagens de mieloperoxidase, enzima presente nos grânulos azurófilos de neutrófilos, e das citocinas pro-inflamatórias IL-1 β e TNF- α nos tecidos adjacentes às membranas posicionadas na calvária. Não houve diferença estatística nas dosagens de IL-1 β e mieloperoxidase entre os animais que receberam essas membranas experimentais e os grupos sham e controle. A mieloperoxidase (MPO) pode ser considerada um indicador do acúmulo de neutrófilos no tecido, pois quando os tecidos periodontais encontram-se inflamados,

ocorre um aumento no número de polimorfonucleares (PMN) na gengiva e, conseqüentemente, há uma elevação na atividade da MPO. Além disso, foi observado que a atividade da MPO apresenta-se significativamente reduzida após terapia periodontal ou em pacientes sem comprometimento destes tecidos (MARCACCINI *et al.*, 2010).

As citocinas desempenham importante papel na patogênese da periodontite. As principais citocinas envolvidas nesta patologia são a interleucina 1 beta (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), as quais são encontradas em concentrações elevadas no periodonto de pacientes acometidos pela doença periodontal. Estas citocinas atuam direta e sinergisticamente estimulando a degradação da matriz de tecido conjuntivo, o recrutamento e/ou ativação dos osteoclastos e a reabsorção óssea. Além disso, já foi verificado que os níveis destas citocinas no sulco gengival relacionam-se diretamente à severidade da doença periodontal e podem estar reduzidos após o tratamento da periodontite (GORSKA *et al.*, 2003).

A IL-1 β estimula a produção de mediadores catabólicos do tecido conjuntivo e de reabsorção óssea, incluindo a própria IL-1 β , interleucina 6 (IL-6), TNF- α , prostaglandina E₂ (PGE₂) e metaloproteinases de matriz (MMP). Esses fatores contribuem para a perpetuação da degradação do tecido conjuntivo, bem como para o recrutamento e ativação dos osteoclastos (PAQUETTE; WILLIAMS, 2000). A IL-1 β também promove ativação de linfócitos T, proliferação de linfócitos B e estimulação da produção de anticorpos; influencia ainda na modulação da função da célula endotelial, que inclui a liberação de fator estimulador de colônias granulócito-macrófago (GM-CSF), prostaciclina (PGI₂) e síntese do fator ativador de plaquetas (PAF) (PREISS; MEYLE, 1994). O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma proteína trimérica, secretada por monócitos-macrófagos e desempenha um papel fundamental na doença periodontal como mediador da destruição tecidual. Exerce importante papel na ativação dos osteoclastos, estimulando a reabsorção óssea. Além disso, estimula a produção local de prostaglandina, induz a secreção de metaloproteinases, as quais realizam a dissolução da matriz orgânica secretada pelo osteoblasto, resultando em perda óssea local (GRAVES, 2008). A interleucina 10 (IL-10) é produzida principalmente por macrófagos ativados, e, como ela inibe as funções do macrófago, é um excelente exemplo de regulador de *feedback* negativo. Não está claro se diferentes estímulos podem agir nos macrófagos para induzir a

produção de uma citocina reguladora como a IL-10 e citocinas efetoras como TNF, ou se os mesmos estímulos desencadeiam a produção de todas as citocinas, mas com cinéticas diferentes. Os linfócitos T também secretam IL-10, e ela é produzida ainda por alguns tipos celulares não linfóides (ex: queratinócitos) (PAQUETTE; WILLIAMS, 2000).

Os animais que receberam as membranas experimentais, no modelo de defeito ósseo crítico, apresentaram, de forma significativa, menores concentrações de TNF- α nos tecidos adjacentes às membranas em relação ao grupo controle. Ademais, a avaliação histológica não evidenciou células inflamatórias e tampouco osteoclastos nas bordas da ferida cirúrgica, em nenhum dos períodos avaliados, nos grupos que utilizaram membranas de colágeno reticuladas (CPA GA, CPA 25GA e CPA 75GA). Uma inflamação leve poderia estimular reabsorção osteoclástica uma vez que osteoclastos respondem à fatores inflamatórios como IL (interleucinas) e TNF- α (KOBAYASHI *et al.*, 2000). Aplicando-se membranas em tecido subcutâneo, observou-se após 7 dias, que os animais que receberam essas membranas reticuladas apresentaram maiores dosagens de IL-10 em relação ao grupo controle, mostrando que a reação inflamatória tende a se resolver mais rapidamente que os grupos que receberam membranas sem reticulação, pois a IL-10 age inibindo a ativação das células T e finalizando as reações de imunidade mediada por células (PAQUETTE; WILLIAMS, 2000).

Esses achados em modelo de calvária estão de acordo com nossos resultados prévios (VERÍSSIMO *et al.*, 2010), demonstrando que as membranas reticuladas com glutaraldeído são biocompatíveis, além de serem resistentes à biodegradação, configurando uma boa opção quando a produção de novo osso depende de uma barreira mecânica de maior duração.

9 CONCLUSÃO

O presente estudo sugere, portanto, que as membranas experimentais de colágeno polianiónico reticuladas com glutaraldeído (CPA GA, CPA 25GA e CPA 75GA) mostraram-se mais eficazes do que a membrana comercial de colágeno, uma vez que evidenciamos maior biocompatibilidade e uma maior neo-formação óssea nos grupos reticulados. A mineralização das membranas com hidroxiapatita não influenciou o reparo ósseo no presente estudo. Esses resultados nos permitem concluir que essas membranas reticuladas são uma opção em casos de defeitos ósseos extensos, quando uma barreira mecânica de maior duração é requerida.

REFERÊNCIAS

- ACADEMY REPORT. Periodontal Regeneration. **J. Periodontol.**, v.76, p.1601-1622, 2005.
- AL-HAMDAN, K.; EBER, R.; SARMENT, D.; KOWALSKI, C., WANG, H-L. Guided tissue regeneration based-root coverage. Meta-analysis. **J. Periodontol.**, v.74, n.10, p.1520-1533, 2003.
- ARMSTRONG, D. G.; JUDE, E. B. The role of matrix metalloproteinases in wound healing. **J. Am. Pediatr. Med. Assoc.**, v.92, p.12-18, 2002.
- AUKHILL, I.; SIMPSON, D. M.; SUGGS, C.; et al. In vivo differentiation of progenitor cells of the periodontal ligament: An experimental study using physical barriers. **J. Clin. Periodontol.**, v.13, p.862–868, 1986.
- BARBER, H. D.; LIGNELLI, J.; SMITH, B. M.; BARTEE, B. K. Using a dense PTFE membrane without primary closure to achieve bone and tissue regeneration. **J. Oral. Maxillofac. Surg.**, v. 65, n.4, p.748-752, Apr, 2007.
- BET, M. R.; GOISSIS, G.; VARGASA, S.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. Cell adhesion and cytotoxicity studies over polyanionic collagen surfaces with variable negative charge and wettability. **Biomaterials**, v. 24, p.131–137, 2003.
- BET, M. R.; GOISSIS, G.; LACERDA, C. A. Characterization of polyanionic collagen prepared by selective hydrolysis of asparagine and glutamine carboxyamide side chains. **Biomacromolecules**, v. 2, p.1074-1079, 2001.
- BIKLE, D. D. Biochemical markers in the assessment of bone disease. **Am. J. Med.**, v.103, p.427-436, 1997.
- BOON, M. E.; RUIJGROK, J. M.; VARDAXI, M. J. Collagen implants remain supple allowing fibroblast ingrowth. **Biomaterials**, v.16, p.1089-1093, 1995.
- BOSCH, C.; MELSEN, B.; VARGERVIK, K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone regeneration. **J. Craniofac. Surg.** , v.9,p.310-316, 1998.
- BOSSHARDT, D. D.; SCULEAN, A. Does periodontal tissue regeneration really work? **Periodontol. 2000**, v.51, p.208-219, 2009.
- BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D. ROTHSTEIN G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**. v.60, p.618–622, 1982a.
- BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J. Invest. Dermatol.** v.78, n.3, p.206-209, 1982b.

BRUNEL, G.; PIANTONI, P.; ELHARAR, F.; BENQUE, E.; MARIN, P.; ZAHEDI, S. Regeneration of the calvarial defects using a bioabsorbable membrane technique: influence of collagen cross-linking. **J. Periodontol.**, v.67, p.1342-1348, 1996.

BUNYARATAVEJ, P.; WANG, H.L. Collagen membranes: a review. **J. Periodontol.**, v.72, p.215–229, 2001.

BUSER, D.; DULA, K.; BELSER, U.; HIRT, H. P.; BERTHOLD, H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. Surgical procedure in the maxilla. **Int. J. Periodont. Rest. Dent.**, v.13, p.29-45, 1993.

CARVALHO, P. S. P.; BASSI, A. P. F.; PEREIRA, I. A. V. D. Revisão e proposta de nomenclatura para os biomateriais. **Implant. News.**, v.1, n.3, p.255-260, maio/jun. 2004.

CHANG, M. C.; IKOMA, T.; KIKUCHI, M.; TANAKA, J. Preparation of a porous hydroxyapatite/collagen nanocomposite using glutaraldehyde as a crosslinkage agent. **J. Mater. Sci. Lett.**, v. 20, p.1199-1201, 2001.

CHEN, F. M.; ZHANG, J.; ZHANG, M.; AN, Y.; CHEN, F.; WU, Z. F. A review on endogenous regenerative technology in periodontal regenerative medicine **Biomaterials**, v. 31, p.7892-7927, 2010.

CHEN, G.; SATO, T.; OHGUSHI, H.; USHIDA T.; TATEISHI, T.; TANAKA, J. Culturing of skin fibroblasts in a thin PLGA-collagen hybrid mesh. **Biomaterials**, v.26, n.15, p.2559-2566, 2005.

CHEN, Y.; MAK, A. F. T.; WANG, M.; LI, J.; WONG, M. S. PLLA scaffolds with biomimetic apatite coating and biomimetic apatite/collagen composite coating to enhance osteoblast-like cells attachment and activity. **Surf. Coat. Technol.**, v. 201, n.3-4, p.575-580, 2006.

CHESTER, U. **Progress in biomedical engineering**. London. Elsevier Science, 1987.

CIRELL, J. A.; MARCANTONIO JR, E.; MARCANTONIO, R. A. C.; LIST, R. C. C.; GOISSI, G.; ROSSA, JR. C. Evaluation of anionic collagen membranes in the treatment of class II furcation lesions: an histometric analysis in dogs. **Biomaterials**, v.18, p.1227-1234, 1997.

CLOKIE, C.; URIST, M. Bone morphogenic protein excipients: comparative observations on Poloxamer. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.105, p. 628–637, 2000.

CORTELLINI, P.; PINI-PRATO, G.; TONETTI, M. S. Periodontal regeneration of human intrabone defects with bioresorbable membranes. A controlled clinical trial. **J. Periodontol.**, v.67, n.3, p.217-223, 1996.

COUTTENYE, M. M.; D'HAESE, P. C.; VAN HOOF, V. O.; LEMONIATOU, E.; GOODMAN; VERPOOTEN, G. A.; DE BROE, M. E. Low serum levels of alkaline phosphatase of bone origin: a good marker of a dynamic bone disease in haemodialysis patients. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v.1, p.1065-1072, 1996.

CREMERS, S.; GARNERO, P.; SEIBEL, M.J. Biochemical markers of bone metabolism. In: BILEZIKIAN, J.P.; RAISZ, L.G.; JOHN MARTIN, T. (Ed.). **Principles of Bone Biology**. 3rd ed. San Diego: Academic Press, 2008. p.1857-1881.

CUNHA, F. Q.; BOUKILI, M.A.; MOTTA, J. I. B.; VARGAFTIG, B. B.; FERREIRA, S. H. Blockade by fenspiride of endotoxin-induced neutrophil migration in the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, v.238, p.47-52, 1993.

CUNHA, M. R.; SANTOS JUNIOR, A. R.; GOISSIS, G.; GENARI, S.C. Implants of polyanionic collagen matrix in bone defects of ovariectomized rats. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v.19, p.1341-1348, 2008.

DAHLIN, C.; SENNERBY, L.; LEKHOLM, U.; LINDHE, A.; NYMAN, S. Generation of new bone around titanium implants using a membrane technique: an experimental study in rabbits. **Int. J. Oral. Max. Impl.**, v.4, p.19-25, 1989.

DAHLIN, C.; LINDE, A.; GOTTLow, J.; NYMAN, S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. **Plast. Reconstructive Surg.**, v.81, n.5, p.672-676, May, 1988.

DEUEL, T. F. In: LANZA, R. P.; LANGER, R.; CHICK, W. L. (Ed.). **Principles of tissue engineering**. London: Academic Press, 1997. p. 133-149.

DU, C.; CUI, F. Z.; ZHANG, W.; FENG, Q.L.; ZHU, X. D.; DE GROOT, K. Formation of calcium phosphate/collagen composites through mineralization of collagen matrix. **J. Biomed. Mater. Res.**, v.50, p.518-527, 2000.

DU, C.; CUI, F. Z.; ZHU, X.D.; DE GROOT, K. Three-dimensional nano- HAp/collagen matrix loading with osteogenic cells in organ culture. **J. Biomed. Mater Res.**, v.44, p.407-415, 1999.

DUPOIRIEUX, L.; POHL, J.; HANKE, M.; POURQUIER, D. A preliminary report on the effect of dimeric rhGDF-5 and its monomeric form rhGDF-5C465A on bone healing of rat cranial defects. **J. Craniomaxillofac. Surg.**, v.37, p.30-35, 2009.

DUPOIRIEUX, L.; POURQUIER, D., PICOT, M.C.; NEVES, M. Comparative study of three different membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects. **Int. J.Oral. Maxillofac. Surg.**, v. 30, p. 58-61, 2001.

FLEISHER, N.; DE WAAL, H.; BLOOM, A. Regeneration of lost attachment apparatus in the dog using vicryl absorbable mesh (polylactin 910). **Int. J. Periodont. Rest.**, v. 8, p.45-55, 1988.

FRAME, J.W. A convenient animal model for testing bone substitute animals. **J. Oral.Surg.**, v.38, p.176, 1980.

FREEMAN, E.; TURNBULL, R. S. The role of osseous coagulum as a graft material. **J. Periodont. Res.**, v. 8, p. 229, 1973.

FRIEDMANN, A.; STRIETZEL, F. P.; MARETZKI, B.; PITARU, S.; BERNIMOULIN, J. P. Observations on a new collagen barrier membrane in 16 consecutively treated patients. Clinical and histological findings. **J. Periodontol.**, v.72, n.11,p.1616-1623, 2001.

FRIEDMANN, A.; STRIETZEL, F. P.; MARETZKI, B.; PITARU, S.; BERNIMOULIN, J. P. Histological assessment of augmented jaw bone utilizing a new collagen barrier membrane compared to a standard barrier membrane to protect a granular bone substitute material. **Clin. Oral. Implants. Res.**, v.13, p.587–594, 2002.

FURLANETO, F. A.; NAGATA, M. J.; FUCINI, S. E.; DELIBERADOR, T. M.; OKAMOTO, T.; MESSORA, M. R. Bone healing in critical size defects treated with bioactive glass/calcium sulfate: a histologic and histometric study in rat calvaria. **Clin. Oral. Implants. Res.**, v.18, p.311–318, 2007.

GALGUT, P. N.; PITROLA, R.; WAITE, I.; DOYLE, C.; SMITH, R. Histological evaluation of biodegradable and non-degradable membranes placed transcutaneously in rats. **J. Clin. Periodontol.**, v.18,n.8, p.581-586, Sept. 1991.

GALGUT, P. N. Oxidized cellulose mesh used as a biodegradable barrier membrane in the technique of guided tissue regeneration. A case report. **J. Periodontol.**, v.6, n.12, p.766-768, Dec. 1990.

GARG, A. K. **Bone Biology, harvesting and grafting for dental implants:** rationale and clinical applications. Carol Stream, IL: Quintessence, 2004.

GIELKENS, P. F.; SCHORTINGHUIS, J.; DE JONG, J. R.; RAGHOEBAR, G. M.; STEGENGA, B.; BOS, R. R. Vivosorb, Bio-Gide and Gore-Tex as barrier membranes in rat mandible defects: an evaluation by microradiography and micro-CT. **Clin. Oral. Implants. Res.**, v.19, n.5, p.516-521, May 2008.

GÓES, J. C.; FIGUEIRÓ, S. D.; DE PAIVA, J. A. C.; DE VASCONCELOS, I. F.; SOMBRA, A. S. B. On the piezoelectricity of anionic collagen films. **J. Phys. Chem. Solids.**, v.63, n.3, p.465-470, 2002.

GÓES, J. C.; FIGUEIRÓ, S. D.; OLIVEIRA, A. M.; MACEDO, A. A. M.; SILVA, C. C.; RICARDO, N. M. P. S.; SOMBRA, A. S. B. Apatite coating on anionic and native collagen films by an alternate soaking process. **Acta Biomaterialia**, v.3, n.5, p.773-778, 2007.

GOISSIS, G.; BRAILE, D. M.; CARNEVALLI, N. C.; RAMIREZA, V. A. Thermal and Morphological Properties of Glutaraldehyde Crosslinked Bovine Pericardium Followed by Glutamic Acid Treatment. **Mater. Res.**, v.12, n.1, p.113-119, 2009.

GOISSIS, G.; LACERDA, C.; BARBOSAS, M. P.; PINATTI, A. **Rev. Bras. Engenharia Biomed.**, v.15, p.55, 1999.

GOISSIS, G.; MAGINADOR, S. V. S.; MARTINS, V. C. A. Biomimetic Mineralization of Charged Collagen Matrices: In Vitro and In Vivo Study. **Artif. Organs.**, v.27, n.5, p.437-443, 2003.

GOISSIS, G.; MARCANTONIO JUNIOR, E.; MARCANTÔNIO, R. M. C.; LIA, F. C. C.; CANCIAN, D. C. J.; CARVALHO, W. M. Biocompatibility studies of anionic collagen membranes with different degree of glutaraldehyde cross-linking. **Biomaterials**, v.20, p.27-34, 1999.

GOISSIS, G.; MORIAK, C.M. **BR. 9.000.972**, 2, March, 1990.

GÓMEZ, G.; KORKIAKOSKI, S.; B. M.; GONZÁLEZ, M. M.; LANSMAN, S.; ELLA, V.; SALO, T.; KI, M. K.; ASHAMMAKHI, N.; ARNAUD, E. Effect of FGF and Polylactide Scaffolds on Calvarial Bone Healing With Growth Factor on Biodegradable Polymer Scaffolds. **J. Craniofacial. Surg.** v.17, n.5, p. 935-942, Sept. 2006.

GÓRSKA, R.; GREGOREK, H.; KOWOLSKI, J.; LASKUS-PERENDYK, A.; SYCZEWSHA, M.; MADALINSKI, K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 30, n.12, p.1046-1052, 2003.

GOTTLOW, J.; NYMAN, S.; LINDHE, J.; KARRING, T.; WENNSTROM, J. New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration: case reports. **J. Clin. Periodontol.**v.13, p.604-616, 1986.

GRAVES D. Cytokines promote periodontal tissue destruction. **J. Periodontol.**, v.78, n.8, p.1585-1591, Aug. 2008.

HANLEY, D. A. Biochemical markers of bone turnover. In: HENDERSON, J. E.; GOLTZMAN, D. (Ed.). **The osteoporosis primer**. 1st ed. Cambridge: University Press, 2000. p.239-252.

HARDWICK, R.; HAYES, B. K.; FLYNN, C. Devices for dentoalveolar regeneration: an up-to-date literature review. **J. Periodontol.**, v. 66, n. 6, p. 495-505, June 1995.

HOLLINGER, J. O.; KLEINSCHMIDT, J. C. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. **J. Craniofac. Surg.**, v. 1,p. 60-68, 1990.

HOCKERS, T., ABENSUR, D.; VALENTINI, P.; LEGRAND, R., HAMMERLE, C. H. The combined use of bioresorbable membranes and xenografts or autografts

in the treatment of bone defects around implants. A study in beagle dogs. **Clin. Oral. Implants Res.**, v.10, n.6, p.487-98, Dec. 1999.

HÜRZELER, M.B.; QUIÑONES, C.R.; HUTMACHER, D.; SCHÜPBACH, P. Guided bone regeneration around dental implants in the atrophic alveolar ridge using a bioresorbable barrier. An experimental study in the monkey. **Clin. Oral. Implants. Res.**, v.8, n.4, p.323-331, Aug. 1997.

HUNT, J. A.; MCLAUGHIN, P. J.; FLANAGAN, B. F. Techniques to investigate cellular and molecular interactions in the host response to implanted biomaterials. **Biomaterials**, v. 2, p.1449–1459, 1997.

HUTMACHER, D. W.; KIRSCH, A.; ACKERMANN, K. L.; HÜRZELER, M. B. A tissue engineered cell occlusive device for hard tissue regeneration – A preliminary report. **Int. J. Periodont. Res.**, v. 21, p. 49–59, 2001.

HUTMACHER, D.; HÜRZELER, M.B.; SCHIEPHAKE, H. A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for GTR and GBR applications. **Int. J. Oral. Maxillofac. Implants.** v.11, n.5, p.667-678, 1996.

IGLHAUT, J.; AUKHILL, I.; SIMPSON, D. JOHNSTON, M. C; KOCH, G. Progenitor cell kinetics during experimental guided tissue regeneration procedure. **J. Periodontal Res.**, v. 23, p.107–117, 1988.

IMBRONITO, A. V.; ARANA-CHAVEZ, V. E.; TODESCAN, J. H. **Regeneração óssea guiada: revisão da literatura.** Disponível em: file:///D:/2001/marco/reg_osse/reg_osse.html>. Acesso em: 16 out. 2007. 14:15:59.

KARRING, T.; WARRER, K. Development of the principle of guided tissue regeneration. **Salpha Omegan**, v.85,p.19-24, 1992.

KARRING, T.; NYMAN, S., GOTTLow, J.; LAURELL, L. Development of the biological concept of guided tissue regeneration animal and human studies. **Periodontol 2000.**, v.1, p.26-35, 1993.

KASAJ, A.; REICHERT, C.; GÖTZ, H.; RÖHRIG, B.; SMEETS, R.; WILLERSHAUSEN, B. In vitro evaluation of various bioabsorbable and nonresorbable barrier membranes for guided tissue regeneration. **Head Face Med.**, v.4, p.22, 2008.

KAWASHITA, M.; NAKAO, M.; MINODA, M.; KIMA, H.-M.; BEPPU, T.; MIYAMOTO, T.; et al. Apatite-forming ability of carboxyl group-containing polymer gels in a simulated body fluid. **Biomaterials**, v. 24, p. 2477-2484, 2003.

KIKUCHI, M.; ITOH, S.; ICHINOSE, S.; SHINOMIYA, K.; TANAKA, J. Self organization mechanism in a bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized in vitro and its biological reaction in vivo. **Biomaterials**, v.22, p.1705-1711, 2001.

KIM, S. Y.; KIM, S. G.; LIM, S. C.; BAE, C. S. Effects on bone formation in ovariectomized rats after implantation of tooth ash and plaster of Paris mixture. **Int. J. Oral and Maxillofac. Surg.**, v. 62, p.852–857, 2004.

KOBAYASHI, K.; TAKAHASHI, N.; JIMI, E.; UDAGAWA, N.; TAKAMI, M.; KOTAKE, S.; NAKAGAWA, N.; KINOSAKI, M.; YAMAGUCHI, K.; SHIMA, N.; YASUDA, H.; MORINAGA, T.; HIGASHINO, K.; MARTIN, J. T.; SUDA, T. Tumor necrosis factor α stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. **J. Exp. Med.**, v. 191, p. 275-285, 2000.

KODAMA, T.; MINABE, M.; HORI, T.; WATANABE, Y. The effect of various concentrations of collagen barrier on periodontal wound healing. **J. Periodontol.** v. 60, p. 205-210, 1989.

KON, S.; RUBEN, M. P.; BLOOM, A. A.; MARDAM-BEY, W.; BOFFA, J. Regeneration of periodontal ligament using resorbable and non resorbable membranes: clinical, histological and histometric study in dogs. **Int. J. Periodontics Restorative Dent.**, v.11, n.1, p.59-71, 1991.

KOTWAL, A.; SCHMIDT, C. E. Electrical stimulation alters protein adsorption and nerve cell interactions with electrically conducting biomaterials. **Biomaterials**, v.22, p.1055-1064, 2001.

KOUVROUKOGLOU, S.; DEE, K. C.; BIZIOS, R.; MCINTIRE, L. V.; ZYGOURAKIS, K. Endothelial cell migration on surfaces modified with immobilized adhesive peptides. **Biomaterials**, v.21, p.1725-1733, 2000.

KOZLOVSKY, A.; ABOODI, G.; MOSES, O.; TAL, H.; ARTZI, Z.; WEINREB, M.; NEMCOVSKY, C. E. Bio-degradation of a resorbable collagen membrane (Bio-Gides) applied in a double-layer technique in rats. **Clin. Oral Impl. Res.**, v.20, p.1116–1123, 2009.

KRICHELDORF, F. Substitutos ósseos-Quando utilizá-los? In: CARVALHO, P. S. P. (Ed.). **Osseointegração 20 anos: visão contemporânea da implantodontia.** São Paulo: Quintessence, 2009. p.97-122.

LEE, C. H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical application of collagen. **Int. J. Pharm.**, v. 221, n.1, p.1-22, 2001.

LEE, E-J.; MERAW, S. J.; OH, T-J.; GIANNOBILE, W. V.; WANG, H-L. Comparative histologic analysis of coronally advanced flap with and without collagen membrane for root coverage. **J. Periodontol.**, v.73, n.7, p.780-788, 2002.

LIAO, S.; WANG, W.; UO, M.; OHKAWA, S.; AKASAKA, T.; TAMURA, K. et al. A three-layered nano-carbonated hydroxyapatite/collagen/PLGA composite membrane for guided tissue regeneration. **Biomaterials**, v.26, p.7564-7571, 2005.

LINDE, A.; ALBERIUS, P.; DAHLIN, C.; BJURSTAM, K.; SUNDIN, Y. Osteopromotion: a soft-tissue exclusion principle using a membrane for bone healing and bone neogenesis. **J. Periodontol.**, v.64, n.11, p.1116-1128, 1993.

LINDHE, J.; KARRING, T.; ARAÚJO, M. Anatomia do periodonto. In: LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N. P. **Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. cap.1, p. 3-48.

MACEDO, N. L.; MACEDO, L.G. S.; MATUDA, F. S.; OUCHI, S. M.; MONTEIRO, A. S. F.; CARVALHO, Y. R. Guided Bone Regeneration with Subperiosteal Implants of PTFE and Hydroxyapatite Physical Barriers in Rats. **Braz. Dent. J.** v.14, n.2, p.119-124, 2003.

MAGINI, R. S. **Regeneração Tecidual Guiada**. 2010. Disponível em:<pereo.com.br>. Acesso em: 2 out. 2011.

MAO, C.; SATO, J.; MATSUURA, M.; SETO, K. Guided tissue regeneration around dental implants in immediate extraction sockets: comparison of resorbable and nonresorbable membranes. **Chin. Med. Sci. J.**, v. 12, p.170–174, 1997.

MARCACCINI, A. M.; AMATO, P. A.; LEÃO, F. V.; GERLACH, R. F.; FERREIRA, J. T. Myeloperoxidase activity is increased in gingival crevicular fluid and whole saliva after fixed orthodontic appliance activation. **Am. J. Orthod. Dentofacial. Orthop.**, v. 138, n.5, p.613-616, Nov. 2010.

MARDAS, N.; KOSTOPOULOS, A.; KARRING, T. Bone and suture regeneration in calvarial defects by e-ptfe-membranes and demineralized bone matrix and the impact on calvarial growth: an experimental study in the rat. **J. Craniofac. Surg.**, v.13, n.3, p.453-462, 2002.

MARDAS, N.; STAVROPOULOS, A.; KARRING, T. Calvarial bone regeneration by a combination of natural anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix coupled with a synthetic cell-binding peptide (PepGent): an experimental study in rats. **Clin. Oral Impl. Res.**, v.19, p.1010–1015, 2008.

MARECHAL, M.; LUYTEN, F.; NIJS, J.; POSTNOV, A.; SCHEPERS, E.; VAN STEENBERGHE, D. Histomorphometry and micro-computed tomography of bone augmentation under a titanium membrane. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 16, p.708-714, 2005.

MARTINS, E. O. B.; JANJACOMO, L. A.; MILANEZI, L. A.; MARTINS, F. Guided Tissue Regeneration, An Actually Solution In The Treatment of Degree II Furcation Defects. **UNIMEP**, v.13, n.1, p.17-25, 2001.

MARTINS, M. C.; COSTA, C.; ABRÃO, J.; BORRI, M. L. Expansão rápida da maxila: análise da densidade radiográfica da sutura palatina mediana e sua correlação nos estágios de neoformação óssea, por meio de imagem digitalizada. **R. Dental Press. Ortodon. Ortop. Facial**, v.14, n.5, p. 170-178, 2009.

MCALLISTER, B. S.; HAGHIGHAT, K. Bone augmentation techniques. **J. Periodontol.**, v.78, n.3, p. 377-396, Mar. 2007.

MELCHER, A. H. On the repair potential of periodontal tissues. **J. Periodontol.** v.47, n.5, p.256-260, May, 1976.

MELCHER AH. Repair of wounds in the periodontal ligament on osteogenesis. **Arch. Oral. Biol.**, v.15, n.2, p.1183-1204, Dec. 1970.

MENDIETA, C.; WILLIAMS, R. C. Periodontal regeneration with bioresorbable membranes. **Curr. Opin. Periodontol.**, p.157-167, 1994.

MINABE, M.; KODAMA, T.; KOGOU, T.; TAMURA, T.; HORI, T.; WATANABE, Y.; MIYATA, T. Different cross-linked types of collagen implanted in rat palatal gingiva. **J. Periodontol.**, v.60, p.35-43, 1989.

MIYAZAKI, T.; OHTSUKI, C.; AKIOKA, Y.; TANIHARA, M. Apatite deposition on polyamide films containing carboxyl group in a biomimetic solution. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v.14, p.569-574, 2003.

MOREIRA, P. L.; AN Y. H.; SANTOS, J. A. R.; GENARI, S. C. In vitro analysis of anionic collagen scaffolds for bone repair. **J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.**, v. 71, n. 2, p.229-237, Nov. 2004.

MOSES, O.; PITARU, S.; ARTZI, Z.; NEMCOVSKY, C. E. Healing of dehiscence-type defects in implants placed together with different barrier membranes: a comparative clinical study. **Clin. Oral. Implan. Res.**, v.16, p.210-219, 2005.

MOSES, O.; VITRIAL, D.; ABOODI, G.; SCULEAN, A.; TAL, H.; KOZLOVSKY, A.; ARTZI, Z.; WEINREB M.; NEMCOVSKY, C. E. Biodegradation of Three Different Collagen Membranes in the Rat Calvarium: A Comparative Study. **J. Periodontol.**, p. 905-911, 2008.

MUSCHLER, G. F.; RAUT, V. P.; PATTERSON, T. E.; WENKE, J. C.; HOLLINGER, J. O. The Design and Use of Animal Models for Translational Research in Bone Tissue Engineering and Regenerative Medicine. **Tissue Engineering: Part B**, v.16, n.1, p.123-145, 2010.

NYMAN, S.; GOTTLLOW, J.; KARRING, T.; LINDHE, J. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. **J. Clin. Periodontol.**, v. 9, p.257-265, 1982.

NYMAN,S.; LINDHE, J.; KARRING, T.; RYLANDER, H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.** v. 9, n.4, p.290-296, July 1982.

NYMAN, R.; MAGNUSSON, M.; SENNERBY, L.; NYMAN, S.; LUNDGREN, D. Membrane-guided bone regeneration. Segmental radius defects studied in the rabbit. **Acta. Orthop. Scand.**, v.66, n.2, p.169-173, Apr. 1995.

OWENS, K. W.; YUKNA, R. A. Collagen membrane resorption in dogs: a comparative study. **Implant. Dent.**, v. 10, p.49-56, 2001.

PACHENCE, J. M. Collagen-based devices for soft tissue repair. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 33, p. 35-40, 1996.

PAQUETTE, D. W.; WILLIAMS, R. C. Modulation of host inflammatory mediators as a treatment strategy for periodontal diseases. **Periodontol.**, v.24, p.239-252, Oct. 2000.

PELPIS, A. M. D.; GOISSIS, G.; DAS-GUPTA, D. K. Dielectric and Pyroelectric. Characterization of Anionic and Native Collagen. **Polym. Eng. Sci.**, v. 36, p.2932, 1996.

PIHLSTROM, B. L.; MICHALOWICZ, B. S.; JOHNSON, N. W. Periodontal diseases. **Lancet**, v. 366, p.1809-1820, 2005.

PITARU, S.; TAL, H.; SOLDINGER, M.; NO, M. Collagen membranes prevent apical migration of epithelium and support new connective tissue attachment during periodontal wound healing in dogs. **J. Periodontal. Res.**, v.24, p.247-253, 1989.

POTIJANYAKUL, P.; SATTAYASANSAKUL, W.; PONGPANICH, S.; LEEPONG, N.; KINTARAK, S. Effects of Enamel Matrix Derivative on Bioactive Glass in Rat Calvarium Defects. **J. Oral Implantol.**, v. 36, p.195-205, 2010.

PREISS, D. L.; MEYLE, J. Interleukin-1 beta concentration of gingival crevicular fluid. **J. Periodontol.**, v.65, n.5, p. 423-428, 1994.

PRYOR, M. E.; SUSIN, C.; WIKESJÖ, U. M. Validity of radiographic evaluations of bone formation in a rat calvaria osteotomy defect model. **J. Clin. Periodontol.**, v.33, p.455-460, 2006.

RAI, M. F.; RACHACONDA, P.S.; MANNING, K.; VORWERK, B.; BRUNNBERG L.; ROHN B.; SCHIMIDT, M. F. Quantification of cytokines and inflammatory mediator in a three-dimensional model of inflammatory arthritis. **Cytokine**, v.42, n.1, p. 8-17, 2008.

RAO, K. P.; JOSEPH, T. Collagen graft copolymers and their biomedical applications. In: NIMNI, M. E. (Ed.). **Collagen**. Boca Raton, FL: CRC Press Inc., 1988. p. 63-86.

RASMUSSEN, L.; MEREDITH, N.; SENNERBY, L. Measurements of stability changes of titanium implants with exposed threads subjected to barrier membrane induced bone augmentation. An experimental study in rabbit tibia. **Clin. Oral. Implants. Res.**, v. 8, n. 4, p. 316-322, 1997.

RAY, R. D.; HOLLOWAY, J. A. Bone implants; preliminary report of an experimental study. **J. Bone. Joint. Surg. Am.**, v.39, p. 1119-1128, 1957.

REYNOLDS, J. J.; HEMBRY, R. M.; MEIKLE, M. C. Connective tissue degradation in health and periodontal disease and the roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors. **Adv. Dent. Res.**, v.8, p.312-319, 1994.

RIPAMONTI, U.; PETIT, J. C. Bone morphogenetic proteins, cementogenesis, myoblastic stem cells and the induction of periodontal tissue regeneration. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v.20, p.489-499, 2009.

ROBERTS, W. E.; GARETTO, L. P. Fisiologia e metabolismo Ósseos. In: MISH, C. E. **Implantes dentários contemporâneos**. 2. ed. São Paulo: Livraria Editora Santos, 2000. cap 17, p. 225-237.

ROBERTS, W. E.; TURLEY, P. K.; BREZNIAK, N.; FIELDER, P. J. Implants: Bone physiology and metabolism. **Calif. Dent. Assoc. J.**, v. 15, p.54-61, 1987.

ROCHA, L. B.; GOISSIS, G.; ROSSI, M. A. Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. **Biomaterials**, v.23, p.449-456, 2002.

ROSA, F. P.; LIA, R. C. C.; SOUZA, K. O. F.; GOISSIS, G.; MARCANTONIO, J. E. Tissue response to polyanionic collagen: elastin matrices implanted in rat calvária. **Biomaterials**, v.24, p.207-212, 2003.

ROTHAMEL, D.; SCHWARZ, F.; SAGER, M.; HERTEN, M.; SCULEAN, A.; BECKER, J. Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat. **Clin. Oral Impl. Res.**, v.16, p.369-378, 2005.

SAADEH, P. B.; KHOSLA, R. K.; MEHRARA, B. J.; Steinbrech, D. S.; DeVore, D. P.; McCormick, S.A.; Longaker, M. T. Repair of a critical size defect in rat mandible using allogenic type I collagen. **J. Craniofac. Surg.**, v 12, n 6 p. 573-579, 2001.

SARAIVA, G. L.; LAZARETTI-CASTRO, M. Marcadores Bioquímicos da Remodelação Óssea na Prática Clínica. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v.46, n.1, p. 72-78, 2002.

SAWEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S.; ALLCHORNE, A.; WINTER, J.; WOOLF, C. J. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v. 115, p.1265-1275, 1995.

SCANTLEBURY, T. V. 1982-1992: A decade of technology development for guided tissue regeneration. **J. Periodontol.**, v. 64, supl., p.1129-1137, Nov. 1993.

SCHENK, R. K. Bone regeneration: biologic basis. In: BUSER, D.; DAHLIN, C.; SCHENK, R. K. (Ed.). **Guided Bone Regeneration in Implant Dentistry**. Chicago, IL: Quintessence, 1994. p. 49-100.

SCHENK, R. K.; BUSER, D.; HARDWICK, W. R.; DAHLIN, C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. **Int. J. Oral. Maxillofac. Implants.**, v.9, n.1, p.13-29, Jan. 1994.

SCHLIEPHAKE, H.; TAVASSOL, F.; GEHNSKY, M.; DARD, M.; SEWING, A. Use of a mineralized collagen membrane to enhance repair of calvarial defects in rats. **Clin. Oral Impl. Res.**, v.15, p.112-118, 2004.

SCHMID, J.; WALLKAMM, B.; HÄMMERLE, C.H.F.; GOGOLEWSKI, S.; LANG, N.P. The significance of angiogenesis in guided bone regeneration. A case report of a rabbit experiment. **Clin. Oral. Implants. Res.**, v.8, n.3, p.244-248, June, 1997.

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J.O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibular nonunions. **Clin. Orthop.**, v.205, p.299-308, 1986.

SCHORTINGHUIS, J.; RUBEN, J. L.; RAGHOEBAR, G.M.; STEGENGA, B.; DE BONT, L.G. Does ultrasound stimulate osteoconduction? A placebo controlled single-blind study using collagen membranes in the rat mandible. **Int. J. Oral. Maxillofac. Implants** ., v.20, p.181-186, 2005.

SCHWARZ, F.; ROTHAMEL, D.; HERTEN, M.; SAGER, M.; BECKER, J. Angiogenesis pattern of native and cross-linked collagen membranes: an immunohistochemical study in the rat. **Clin. Oral. Implants. Res.**, v.17, p. 403-409, 2006.

SEAL, B. L.; OTERO, T. C.; PANITCH, A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. **Mater. Sci. Eng.**, v. 34, p.147-230, 2001.

SHIN, S. Y.; PARK, H. N.; KIM, K. H.; LEE, M. H.; CHOI, Y.S.; PARK, Y.J.; LEE, Y.M; KU, Y.; RHYU, I. C.; HAN, S.B.; LEE, S.J. CHUNG, C. P. Biological Evaluation of Chitosan Nanofiber Membrane for Guided Bone Regeneration. **J. Periodontol.**, v. 76, p.1778-1784, 2005.

SILVA, C. C.; PINHEIRO, A. G.; OLIVEIRA, R. S.; GÓES, J.C.; ARANHA, N.; OLIVEIRA, L. R.; SOMBRA, A. S. B. Properties and in vivo investigation of nanocrystalline hydroxyapatite obtained by mechanical alloying. **Mater. Sci. Eng.**, v.24, n.4, p.549-554, 2004.

SIMION, M.; FONTANA, F.; RASPERINI, G.; MAIORANA, C. Vertical ridge augmentation by expanded-polytetrafluorethylene membrane and combination of intraoral autogenous bone graft and deproteinized anorganic bovine bone (Bioss). **Clin. Oral. Implants. Res.**, v.18, p. 620-629, 2007.

SIMION, M.; DAHLIN, C.; BLAIR, K.; SCHENK, R.K. Effect of different microstructures of e-PTFE membranes on bone regeneration and soft tissue response: a histologic study in canine mandible. **Clin. Oral. Implants. Res.**, v.10, n.2, p.73-84, Apr. 1999.

SIROLA, K. Regeneration of defects in calvária. **Ann. Med. Exp. Biol. Finland.**, v. 38, Suppl. 2, p.1, 1960.

SORSA, T.; TJÄDERHANE, L.; SALO, T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. **Oral. Dis.**, v.10, p.311-318, Nov. 2004.

SOUSA, C.; ABREU, H.; VIEGAS, C.; AZEVEDO, J.; REIS, R.; GOMES, M.; DIAS, I. Serum total and bone alkaline phosphatase and tartrate-resistant acid phosphatase activities for the assessment of bone fracture healing in dogs. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.63, n.4, p.1007-1011, 2011.

STAHL, S. S. Repair potential of the soft tissue-root interface. **J. Periodontol.**, v.48, n.9, p.542-545, Sept. 1977.

STEGEMANN, H. H.; STALDER, K. Determination of hydroxyproline. **Clin. Chimica. Acta.**, v.18, p. 267–273, 1967.

TAGUCHI, T.; MURAOKA, Y.; MATSUYAMA, H.; KISHIDA, A.; AKASHI, M. Apatite coating on hydrophilic polymer-grafted poly(ethylene) films using an alternate soaking process. **Biomaterials**, v.22, n.1, p.53-58, 2001.

TAGUCHI, Y.; AMIZUKA, N.; NAKADATE, M.; OHNISHI, H.; FUJI, N.; ODA, K.; NOMURA, S.; MAEDA, T. A histological evaluation for guided bone regeneration induced by a collagenous membrane. **Biomaterials**, v.26, p.6158–6166, 2005.

TAL, H.; KOZLOVSKY, A.; ARTZI, Z.; NEMCOVSKY, C. E.; MOSES, O. Cross-linked and non-cross-linked collagen barrier membranes disintegrate following surgical exposure to the oral environment: a histological study in the cat. **Clin. Oral. Implan. Res.**, v.19, p.760-766, 2008.

TANAHASHI, M.; MATSUDA, T. Surface functional group dependence on apatite formation on self-assembled monolayers in a simulated body fluid. **J. Biomed. Mater. Res.**, v.34, n.3, p.305-315, 1997.

TANAHASHI, M.; YAO, T.; KOKUBO, T.; MINODA, M.; MIYAMOTO, T.; NAKAMURA, T.; et al. Apatite coated on organic polymers by biomimetic process: improvement in its adhesion to substrate by NaOH treatment. **J. Appl. Biomater.**, v.5, p.339-347, 1994.

TATAKIS, D. N.; PROMSUDTHI, A.; WIKESJÖ, U. M. E. Devices for periodontal regeneration. **Periodontol. 2000**, v.19, p.59-73, 1999.

TERVAHARTIALA, T.; PIRILÄ, E.; CEPONIS, A.; MAISI, P.; SALO, T.; TUTER, G.; KALLIO, P.; TÖRNWALL, J.; SRINIVAS, R.; KONTTINEN, Y. T.; SORSA, T. The in vivo expression of the collagenolytic matrix metalloproteinases (MMP-2,-8,-13, and -14) and matrilysin (MMP-7) in adult and localized juvenile periodontitis. **J. Dent. Res.**, v.79, n.12, p.1969-1977, Dec. 2000.

TOREZAN, J. F. R.; FONSECA, A. P. Z. Biomateriais em implantodontia. In: ZÉTOLA, A; SHIBLI, J.A.; JAYME, S. J. **Implantodontia Clínica Abross**. São Paulo: Quintessence Editora, 2010. p. 17-25.

UITTO, V-J.; OVERALL, C. M.; MCCULLOCH C. Proteolytic host enzymes in gingival crevice fluid. **Periodontol.**, v.31, p.77-104, 2000.

VAN LUYN, M. J.; VAN WACHEM, P. B.; OLDE-DAMINK, L. H.; DIJKSTRA, P. J.; FEIJEN, J.; NIEUWENHUIS, P. Relations between in vitro cytotoxicity and crosslinked dermal sheep collagens. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 26, n. 8, p. 1091-110, Aug. 1992.

VERÍSSIMO, D. M.; LEITÃO, R. F. C.; RIBEIRO, R. A.; FIGUEIRÓ, S. D.; SOMBRA, A. S.B.; GÓES, J. C.; BRITO, G. A. C. Polyanionic collagen membranes for guided tissue regeneration: Effect of progressive glutaraldehyde cross-linking on biocompatibility and degradation. **Acta Biomaterialia**, p. 4011-4018, 2010.

VERNA, C.; BOSCH, C.; DALSTRA, M.; WIKESJO, U.M. E.; TROMBELLI, L. Healing patterns in calvarial bone defects following guided bone regeneration in rats: A microCT analysis. **J. Clin. Periodontol.**, v.29, p.865-887, 2002.

VERT, M.; LI, S.; GARREAU, H. New insights on the degradation of bioresorbable polymeric devices based on lactic and glycolic acids. **Clin. Mater.**, v.10, n.1-2, p.3-8, Jan. 1992.

VIEIRA, J. G. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v.43, p.415-422, 1999.

WATTS, N. B. Clinical utility of biochemical markers of bone remodeling. **Clin. Chem.**, v. 45, p.1359-1368, 1999.

WENER, S.; TRAUB, W. Bone structure: from angstroms to microns. **Faseb J.**, v.6, p. 879-885,1992.

WIESMANN, H. P.; HARTIG, M.; STRATMANNB, U.; MEYER, U.; JOOS, U. Electrical stimulation influences mineral formation of osteoblastlike cells in vitro. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.1538,p.28–37, 2001.

WILLIAMS, D. **Definitions in biocompatibility**: Proceedings of a Concensus Conference of the European Societ for Biomaterials. London: Elsevier Science, 1987.

YEOM, H. R.; BLANCHARD, S.; KIM, S. J.; ZUNT, S.; CHU, T. M. G. Correlation Between Micro-Computed Tomography and Histomorphometry for Assessment of New Bone Formation in a Calvarial Experimental Model. **J. Craniofac. Surg.**, v.19, p.446-452, 2008.

ZELLIN, G.; LINDE, A. Treatment of segmental defects in long bones using osteopromotive membranes and recombinant human bone morphogenetic protein-2. **Scand. J. Plast. Reconstr. Hand Surg.**, v.31, p.97-104, 1997.

ZHAO, S.; PINHOLT, E. M.; MADSEN, J. E.; DONATH, K. Histological evaluation of different biodegradable and nonbiodegradable membranes implanted subcutaneously in rats. **J. Craniomaxillofac. Surg.**, v.28, p.116–122, 2000.

ZITZMANN, N. U.; NAEF, R.; SCHARER, P. Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration. **Int. J. Oral. Maxillofac. Implants.**, v.12,n.6, p.844-852, 1997.

ZITZMANN, N. U.; SCHAERER, P.; MARINELLO, C.P. Long-term results of implants treated with guided bone regeneration: a 5-year prospective study. **Int. J. Oral. Maxillofac. Implants.**, v.16,p.355–366, 2001.

ZITZMANN, N. U.; SCHARER, P.; MARINEUO, G. P. Factors influencing the success of GBR. Smoking, timing of implant placement, implant location, bone quality and provisional restoration. **J. Clin. Periodontol.**, v. 26, p.673-682, 1999.

ANEXO A – Declaração



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 20/09, sobre o projeto intitulado: **“BIOCOMPATIBILIDADE DE MEMBRANAS MINERALIZADAS ABSORVÍVEIS DE COLÁGENO ANIÔNICO E SUAS APLICAÇÕES EM REGENERAÇÃO TECIDUAL GUIADA”**, de responsabilidade de Denusa Moreira Veríssimo, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 03 de setembro de 2009.

Fortaleza, 21 de setembro de 2009.


Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

ANEXO B- Declaração



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 25/10, sobre o projeto intitulado: **“AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE NEOFORMAÇÃO ÓSSEA DE MEMBRANAS DE COLÁGENO COM DIFERENTES GRAUS DE MINERALIZAÇÃO COM HIDROXIAPATITA E RETICULAÇÃO COM GLUTERALDEÍDO EM DEFEITOS ÓSSEOS EM CALOTA CRANIANA DE RATOS”**, de responsabilidade de Denusa Moreira Veríssimo, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 09 de setembro de 2010.

Fortaleza, 17 de dezembro de 2010.


Prof. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

ANEXO C- Artigo1

Acta Biomaterialia 6 (2010) 4011–4018



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Biomaterialia

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actabiomat

Polyanionic collagen membranes for guided tissue regeneration: Effect of progressive glutaraldehyde cross-linking on biocompatibility and degradation

D.M. Veríssimo^a, R.F.C. Leitão^b, R.A. Ribeiro^a, S.D. Figueiró^c, A.S.B. Sombra^c, J.C. Góes^c, G.A.C. Brito^{b,*}

^a Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

^b Department of Morphology, School of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

^c Physics Department, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 January 2010

Received in revised form 18 April 2010

Accepted 19 April 2010

Available online 28 April 2010

Keywords:

Apatite

Collagen membrane

Glutaraldehyde cross-linking

Guided tissue regeneration

Periodontal regeneration

ABSTRACT

The ultimate goal of periodontal therapy is to control periodontal tissue inflammation and to produce predictable regeneration of that part of the periodontium which has been lost as a result of periodontal disease. In guided tissue regeneration membranes function as mechanical barriers, excluding the epithelium and gingival corium from the root surface and allowing regeneration by periodontal ligament cells. This report aims to study the effect of glutaraldehyde (GA) cross-linking on mineralized polyanionic collagen (PAC) membranes by conducting a histological evaluation of the tissue response (biocompatibility) and by assessing the biodegradation of subcutaneous membrane implants in rats. We studied six different samples: a PAC, a PAC mineralized by alternate soaking processes for either 25 or 75 cycles (PAC 25 and PAC 75, respectively) and these films cross-linked by GA. Inflammatory infiltrate, cytokine dosage, fibrosis capsule thickness, metalloproteinase immunohistochemistry and membrane biodegradation after 1, 7, 15 and 30 days were measured. The inflammatory response was found to be more intense in membranes without cross-linking, while the fibrosis capsules became thicker in cross-linked membranes after 30 days. The membranes without cross-linking suffered intense biodegradation, while the membranes with cross-linking remained intact after 30 days. The cross-linking with GA reduced the inflammatory response and prevented degradation of the membranes over the entire course of the observation period. These membranes are thus an attractive option when the production of new bone depends on the prolonged presence of a mechanical barrier.

© 2010 Acta Materialia Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In periodontal therapy the goal is to control periodontal tissue inflammation and to produce the predictable regeneration of that part of the periodontium which has been lost as a result of periodontal disease. The concept of guided tissue regeneration (GTR) is based on the assumption that only periodontal ligament cells and/or bone cells have the potential to regenerate the attachment apparatus of the tooth. In GTR membranes function as mechanical barriers, excluding the epithelium and gingival corium from the root surface, allowing regeneration by periodontal ligament cells [1,2]. GTR-based root coverage can be successfully used to repair gingival recession defects [3]. Animal studies have indicated that root coverage utilizing bioabsorbable membranes resulted in greater amounts of connective tissue as well as a trend towards greater amounts of bone and cementum when compared with a traditional coronal apical flap [4]. These membrane barriers have

also been applied to regenerate bone surrounding implant defects, in the so-called guided bone regeneration (GBR) procedure [5].

Improvements in this field are being gradually introduced with the use of controlled biodegradable membranes obtained from collagen [6], vicryl [7] and polylactic acid [8]. The main advantages associated with collagen membranes when applied to the GTR technique are their naturally low antigenicity, high biocompatibility [9] and controlled biodegradability induced by cross-linking reagents. At the same time, collagen stimulates the migration of periodontal ligament cells to the site of healing [10,11].

Collagen is known to have different effects on tissue restoration depending on the type, structure, degree of cross-linking and chemical treatment. Anionic collagen membranes are negatively charged at physiological pH due to selective hydrolysis of the carboxyamido groups of asparagine and glutamine amino acid residues present in the α -chains of tropocollagen, generating new calcium binding sites [12]. Alkaline treatment improves the piezoelectricity of collagen in relation to native collagen membranes [13]. Collagen membranes have excellent cell affinity and biocompatibility for tissue regeneration and membranes made from non-mineralized collagen have been used in GTR applications for periodontal defect repair [14].

* Corresponding author. Tel./fax: +55 85 32713141.
E-mail address: gerlybrito@hotmail.com (G.A.C. Brito).

Membranes made from non-mineralized collagen, however, are normally of low strength and are, therefore, difficult to manipulate. Furthermore, mineralized collagen is considered to provide better biocompatibility with animal and human tissue than pure collagen [15]. As a hard tissue implant material mineralized collagen also show a conductivity effect that enhances hard tissue (e.g. bone) growth. Finally, changing the content of calcium phosphate minerals could control the rate of bioreabsorption of mineralized collagen membranes [14].

In recent years biomimetic mineralized collagen materials, nano-apatite/collagen composites, have attracted considerable attention [16–19]. Nano-carbonated hydroxyapatite/collagen composite materials (nCHAC) facilitate reliable bone regeneration by inducing migration of undifferentiated cells into the graft recipient site, where they differentiate to osteoblasts and form new bone (i.e. stimulation of cellular transformation). The composites also supply a ready source of calcium for rapid mineralization. It has been reported that carboxyl group-containing organic polymers form apatite on their surfaces in simulated body fluid (SBF) if their carboxyl groups have been previously combined with calcium ions, because the carboxyl group induces apatite nucleation and releases calcium ions to accelerate this nucleation [20,21].

Several collagen cross-linking techniques have been applied to prolong membrane reabsorption and increase their biodegradability, such as ultraviolet radiation and treatment with glutaraldehyde, hexamethylenediisocyanate or diphenyl-phosphoryl-azide [5,10,22]. These membranes can be used in medical applications to repair periodontal defects, as membranes to cover bone defect surgery and as bone substitutes. They have found additional applications in skin wound repair and healing, skin sealing and as carriers for antibiotics, bone growth factors and skin growth factors, among others [14].

The mechanical, physical, chemical and biological properties of collagen scaffolds can be influenced by modification of the matrix structure by chemical treatment with glutaraldehyde (GA), which is a reference agent for the cross-linking reactions. The *in vivo* absorption of collagen biomaterials can be controlled by this cross-linking reaction. Some authors have used arrays of collagen cross-linked with GA in the growth of fibroblasts with high biological efficiency [23]. GA reacts with the amino groups of the side-chains of collagen molecules, creating a framework in the material that improves the mechanical and biological stability. Some problems related to GA cross-linking, such as polymerization of GA monomers in solution leading to heterogeneous cross-linking and cytotoxicity, have been overcome by continuous reaction with GA at low concentrations. This method may produce a material with the same pattern of degradability using smaller amounts of GA, thus avoiding cytotoxic effects. Progressive treatment with low concentrations of GA is believed to induce more homogeneous reactions in the collagen matrix [24].

This report aims to study the effect of GA cross-linking on mineralized polyanionic collagen (PAC) membranes by conducting a histological evaluation of the tissue response (biocompatibility) and by assessing the biodegradation of subcutaneous membrane implants in rats. The membranes were manufactured by LOCEM in the Physics Department of the Federal University of Ceará (Brazil) and were compared with a commercial collagen membrane obtained from demineralized bovine cortical bone (Genderm, Genius, Baumer S.A., Brazil).

2. Materials and methods

2.1. Membrane

In this study a collagen membrane of demineralized bovine cortical bone (Genderm, Genius, Baumer S.A., Brazil) was used as a control. Polyanionic collagen membranes from intestinal bovine

serosa (PAC) mineralized at 25 °C for 25 or 75 consecutive cycles with hydroxyapatite at pH 9.0 (PAC 25 and PAC 75) and mineralized membranes cross-linked with glutaraldehyde (PAC GA, PAC 25GA and PAC 75GA) were also used.

2.2. Preparation of polyanionic collagen membrane

The anionic collagen was prepared from intestinal bovine serosa by selective alkaline hydrolysis of the carboxamide side-chains of asparagine and glutamine amino acid residues present in the collagen molecules. To selectively hydrolyze amide groups 50 g of intestinal bovine serosa, in the wet state, were treated at 20 °C for 48 h with an alkaline solution (3 ml of solution per g of tissue) containing salts (chlorides and sulfates), alkaline bases (K^+ and Na^+) and alkaline earth metals (Ca^{2+}). The resulting materials were equilibrated with a solution containing Na_2SO_4 , NaCl, KCl and $CaSO_4$ (6 ml of solution per g of tissue) for a period of 12 h. The excess salts were removed as described earlier [25]. The materials were suspended in deionized water, the pH adjusted to 3.5 with pure acetic acid and the mixture homogenized in a blender. The concentration of polyanionic soluble collagen was 10 mg g^{-1} , as determined by hydroxyproline analysis [26]. The soluble anionic collagen was dialyzed against 0.13 M phosphate buffer, pH 7.4, and the resulting material was centrifuged at 5000 r.p.m. at 15 °C to form a collagen gel with a concentration of 30 mg g^{-1} . The anionic collagen gel was casted in acrylic molds, equilibrated in phosphate buffer (0.13 mol l^{-1}), pH 7.4, and dried in a laminar flow of air.

2.3. Mineralization method

Two groups of anionic collagen membranes ($6 \times 8 \text{ cm}$, 0.15 mm thick), repeatedly washed in deionized water, were treated at 25 °C for 0, 25 or 75 consecutive cycles of mineralization with hydroxyapatite at pH 9.0 (PAC, PAC 25 and PAC 75, respectively). Each cycle of 10 min consisted of treatment with calcium solution (200 mM $CaCl_2$, 0.02 M Tris-HCl) and phosphate solution (120 mM NaH_2PO_4/Na_2HPO_4), with water immersion in between each salt solution treatment to remove the excess not incorporated into the matrix. The samples were then dried in a laminar flow of air.

2.4. Cross-linking of mineralized films with glutaraldehyde

Membranes ($6 \times 6.5 \text{ cm}$) of PAC, PAC 25 and PAC 75 were treated at room temperature with progressive concentrations of 0.01% (1 h) and 0.05% (7 h) GA (in 0.13 mol l^{-1} phosphate buffer, pH 7.4). After fixation the samples were immersed in glycine solution (0.025 mol l^{-1} glycine, 0.05 mol l^{-1} borate, pH 9.2) for 10 min, washed in 0.13 mol l^{-1} phosphate buffer (pH 7.4), washed repeatedly with water and dried under a laminar flow of air for biological assay (PAC GA, PAC 25GA and PAC 75GA).

2.5. Animals

Thirty-six Wistar rats, weighing 180–200 g, from the Federal University of Ceará were housed in temperature-controlled rooms and received water and food *ad libitum*. Surgical procedures and animal treatments were conducted in accordance with the Guidelines for Institutional Animal Care and Use of the Federal University of Ceará, Brazil.

The animals were anesthetized by intraperitoneal injection of 0.5% Tribrome. The dorsal scapular and pelvic regions were subjected to trichotomy and aseptically with iodated alcohol. A straight incision (1 cm long) was made at seven sites on the dorsal surface in a latero-lateral direction. The connective tissue was dissected with blunt scissors in the caudal direction for placement of the

membranes (0.5 × 0.5 cm) soaked in isotonic 0.9% sodium chloride solution. An interrupted suture was performed (silk suture 4-0), followed by asepsis with iodated alcohol. The animals were killed 1, 7, 15 and 30 days after surgery.

2.6. Histopathological analysis

In each experiment samples of each membrane and the surrounding tissue were removed from each animal (six animal groups) for histopathological analysis (totaling 24 animals). The specimens were fixed in 10% buffered formalin for 24 h, dehydrated in ethanol, cleared with xylene and embedded in paraffin. Sections of 4 μm thickness were obtained for hematoxylin and eosin (H&E) staining and examination by light microscopy to evaluate inflammatory cell infiltration, the fibrosis capsule and biodegradation of the membranes.

2.6.1. Intensity of the inflammatory infiltrate

In order to evaluate the inflammatory infiltrate, polymorphonuclear and mononuclear cells were counted in five fields around the membrane on each slide for the six animal groups (magnification 1000×) and a statistical comparison performed.

2.6.2. Measurement of the fibrosis capsule

The sections from each group were photographed under a Leica microscope (40×), and the mean linear measurement of the fibrosis capsule (μm²) was obtained at three different locations on the edge and at three different locations on the lateral sides of each membrane using NIHImage software.

2.6.3. Biodegradation of the membranes

The percentage absorption was examined on days 1, 7, 15 and 30. To calculate this value the sections for each group were photographed under a Leica microscope (40×) and the total area of each membrane was measured (mm²) using NIHImage software. The calculated mean served as the unit for statistical analysis. The membrane area for each group was calculated as a percentage of the respective baseline (day 1) measurement according to the formula: mean area of membrane on 7, 15 and 30 days divided by the membrane mean area at baseline multiplied by 100. As at baseline the membrane had suffered no absorption (0% absorption), a correlation was made with the other groups.

2.7. Cytokine (TNF-α, IL-1β and IL-10) dosage in the membrane and the circumjacent subcutaneous tissue

A sample of the membrane and surrounding subcutaneous tissue was removed from the six animal groups on days 1 and 7 (totaling 12 animals) to evaluate the cytokine dosage. The specimens were stored at -70 °C until required for assay. The tissue collected was homogenized and processed as described by SaWeh-Garabedian et al. [27]. TNF-α, IL-1β and IL-10 concentrations were determined by ELISA, as described previously [28]. Briefly, microtiter plates were coated overnight at 4 °C with antibody against rat TNF-α, IL-1β or IL-10 (2 g ml⁻¹). After blocking the plates, the samples and standard were added at various dilutions in duplicate and incubated at 4 °C for 24 h. The plates were washed three times with buffer and then biotinylated sheep polyclonal anti-TNF-α, anti-IL-1β or anti-IL-10 [diluted 1:1000 with assay buffer containing 1% bovine serum albumin (BSA)] was added to the wells. After a further incubation at room temperature for 1 h, the plates were washed and 501 of avidin-horseradish peroxidase (diluted 1:5000) was added to the plates. An aliquot of 50 μl of the color reagent o-phenylenediamine (OPD) was added 15 min later and the plates were incubated in the dark at 37 °C for 15–20 min. The enzyme reaction was stopped with

H₂SO₄ and the absorbance measured at 490 nm. The measured values are expressed as picograms per milliliter (pg ml⁻¹).

2.8. Immunohistochemistry reaction for matrix metalloproteinases (MMP)

Immunohistochemistry for MMP was performed using the streptavidin-biotin-peroxidase method in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections (4 μm thick) mounted on poly-L-lysine-coated microscope slides. The sections were deparaffinized and rehydrated by treatment with xylene and graded alcohols. After antigen retrieval, endogenous peroxidase was blocked (15 min) with 3 vol% hydrogen peroxide and the slides were washed with phosphate-buffered saline (PBS). Sections were incubated overnight (4 °C) with primary rabbit polyclonal antibody MMP-1/8 (H-300) diluted 1:200 in PBS plus BSA (PBS-BSA). The slides were then incubated with biotinylated goat anti-rabbit antibody diluted 1:400 in PBS-BSA. After washing the slides were incubated with avidin-biotin-horseradish peroxidase conjugate (Strep ABC complex of Vectastain[®] ABC Reagent and peroxidase substrate solution) for 30 min, according to the Vectastain protocol. MMP was visualized with the chromophore 3,3'-diaminobenzidine (DAB). Negative control sections were processed simultaneously as described above, but with the first antibody replaced by 5% PBS-BSA. Slides were counterstained with Hary's hematoxylin, dehydrated in a graded alcohol series, cleared in xylene and covered with coverslips. Four slides for each group (four animal groups) were processed. The tissue surrounding the two edges of each membrane was photographed under a Leica microscope (400×) and analyzed using System Morfometric Analyze (SAMM), a computer program that captures the percentage brown staining density in order to quantify the degree of MMP staining.

2.9. Statistical analysis

Univariate analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test was used to compare mean observed values. A probability value of *P* < 0.05 was considered to indicate a significant difference. Both analyses were executed using Prism 3 software (Graph-Pad Software, USA).

3. Results

3.1. Intensity of the inflammatory infiltrate

3.1.1. Polymorphonuclear cells

On day 1 all groups showed an acute inflammatory reaction, but only the PAC group presented statistically significant increases in polymorphonuclear cells per field compared with the control group (**P* < 0.05). The cross-linked groups (PAC GA, PAC 25GA and PAC 75GA) showed reduced polymorphonuclear cell infiltration compared with PAC (**P* < 0.05). By day 7 the reaction had decreased in all groups, but the number of polymorphonuclear cells per field was significantly increased in the PAC 25 and PAC 75 groups, as compared with the control group (**P* < 0.05). At this time the PAC 75 group displayed a high number of these cells compared with the PAC group (**P* < 0.05). On day 15 polymorphonuclear cell infiltration in the PAC 25 group was still high compared with the control (**P* < 0.05) and other PAC groups (**P* < 0.05). By day 30 tissue infiltration by these cells had disappeared (Fig. 1A).

3.1.2. Mononuclear cells

On days 1 and 7 the numbers of mononuclear cells per field were low for all groups. After day 15 the numbers of mononuclear cells/field began to increase and on day 30 the PAC, PAC 25 and PAC

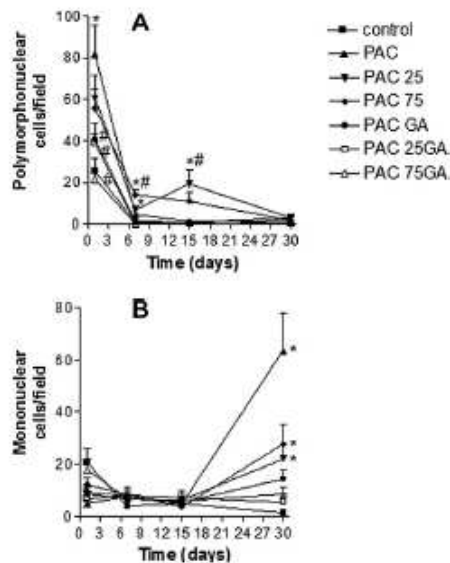


Fig. 1. Effect of subcutaneous implanted collagen membranes on leukocyte counts. Each point represents the mean \pm SEM of polymorphonuclear cells (A) and mononuclear cells (B) per field of six animals. *Significant difference from the control group ($P < 0.05$). #Significant difference compared with the PAC group ($P < 0.05$). Data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni tests.

75 groups revealed increased mononuclear cell infiltration ($*P < 0.05$), as compared with the control group. The PAC GA, PAC 25 GA and PAC 75 GA groups did not show significant mononuclear cell infiltration in comparison with the control group (Fig. 1B).

3.2. Measurement of the fibrosis capsule

The apical fibrosis capsule on day 7 was thicker in groups without GA (PAC, PAC 25 and PAC 75) compared with the control ($*P < 0.05$). On day 15 the control and PAC membranes had been absorbed and the capsule had disappeared. The capsules surrounding the PAC 25 and PAC 75 membranes had decreased in thickness, and this decrease was statistically different from the control ($*P < 0.05$). On day 30 the capsules in groups PAC GA, PAC 25GA and PAC 75GA had become thicker, and this was statistically different from the control group ($*P < 0.05$). The capsules of groups PAC 25 and PAC 75, although less thick than observed on day 7, were still statistically different from the control group ($*P < 0.05$).

The data for the lateral fibrosis capsules were similar to the apical data, except that on day 15 the capsules of the PAC 25 group were still increasing in thickness. On day 30 fibrosis around PAC 25, PAC 75, PAC GA, PAC 25GA and PAC 75GA was greater than $150 \mu\text{m}$ (Fig. 2).

3.3. Biodegradation of the membranes

After 15 days the control group membrane was completely absorbed. In some animals of the PAC groups only remnants of the membrane material could be detected after 30 days. The hydroxyapatite-coated membrane groups (PAC 25 and PAC 75), however, suffered intense biodegradation. Conversely, the hydroxyapatite-

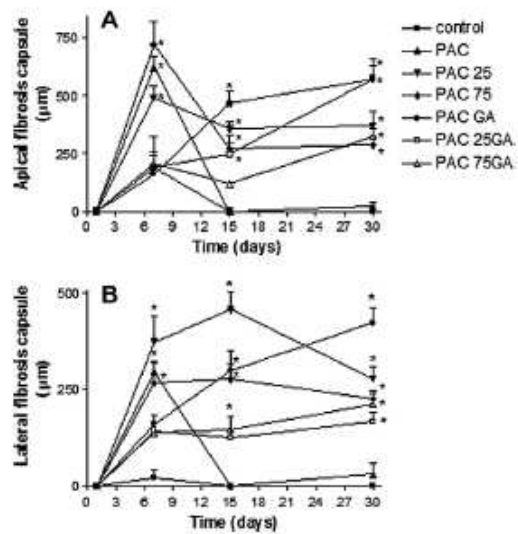


Fig. 2. Thickness of fibrosis capsules formed on the apical (A) and lateral (B) sides of the collagen membrane through linear measurement (mm^2) using the NIH image program. Each point represents the means \pm SEM of six animals. *Significant difference from the control group ($P < 0.05$). Data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni tests.

coated membranes/GA groups (PAC GA, PAC 25GA and PAC 75GA) remained intact throughout the 30 day period (Fig. 3).

Fig. 4 shows microscopic aspects of the membranes and surrounding subcutaneous tissue of rats after 30 days incubation. PAC showed complete membrane absorption. PAC 25 and PAC 75 showed partial membrane absorption. PAC GA, PAC 25GA and PAC 75GA showed membrane preservation and the presence of a fibrous capsule (white arrow).

3.4. Cytokine dosage

The pro-inflammatory cytokine $\text{TNF-}\alpha$ was high on day 1 in the PAC, PAC 25, PAC 75 and PAC 25GA groups, as compared with the control group ($*P < 0.05$). Additionally, the cross-linked groups (PAC GA, PAC 25GA and PAC 75GA) showed reduced levels of $\text{TNF-}\alpha$ in relation to the PAC group ($*P < 0.05$). On day 7 this cytokine was high in the PAC and PAC 75 groups, as compared with the

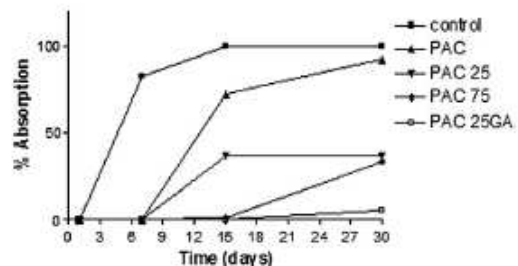


Fig. 3. Percentage absorption related to the area of collagen membrane in each group on the first day. The groups PAC GA and PAC 75GA did not show absorption.

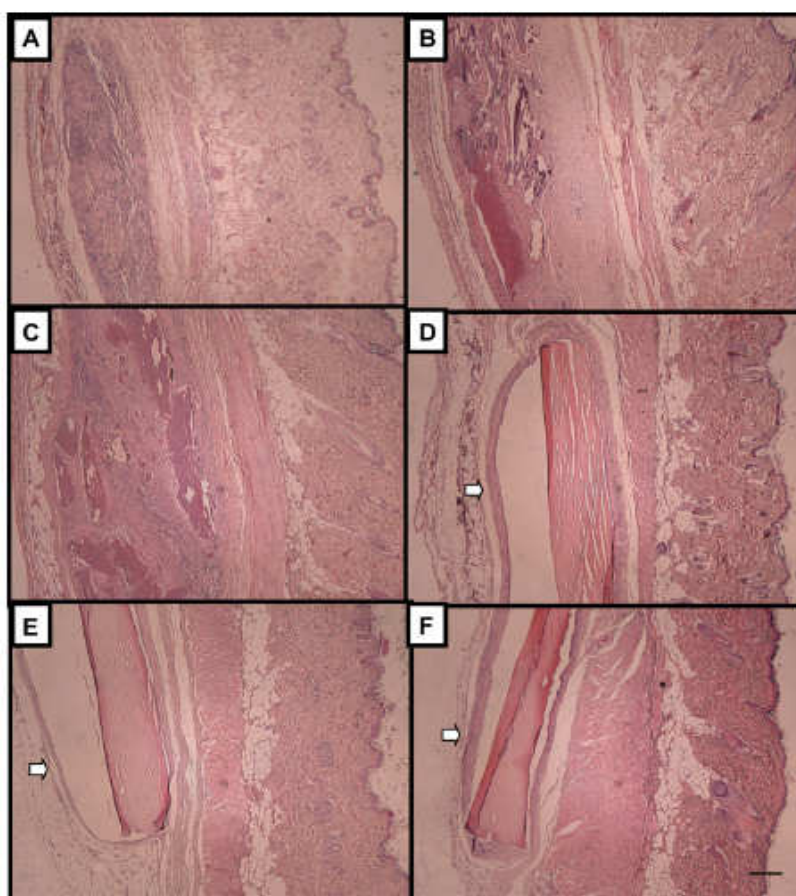


Fig. 4. Microscopic aspects of membranes (PAC) implanted in the subcutaneous tissue of rats. Thirty days after implantation the membrane and the surrounding tissue were removed and processed for H&E staining. The photomicrographs represent (A) PAC, (B) PAC 25, (C) PAC 75, (D) PAC GA, (E) PAC 25GA and (F) PAC 75GA. A white arrow shows the fibrosis capsule. Scale bar length 250 μm (40 \times magnification).

control ($^*P < 0.05$), while all other groups showed reduced levels of TNF- α .

The pro-inflammatory cytokine IL-1 β was high in the groups without cross-linking (PAC, PAC 25 and PAC 75) on days 1 and 7, while the cross-linked groups showed reduced levels of IL-1 β compared with the PAC group on day 1, however, only PAC 75GA displayed significantly reduced levels of IL-1 β on day 7.

The anti-inflammatory cytokine IL-10 was high on day 1 in all groups compared with the control ($^*P < 0.05$) and on day 7 it was high in groups with cross-linking compared with the control group ($^*P < 0.05$) and the PAC group ($^*P < 0.05$) (Fig. 5).

3.5. Immunohistochemistry reaction for metalloproteinase

All groups showed marked immunostaining, indicating significant production of MMP, without statistically significant differences among the groups (Table 1).

4. Discussion

In this study a commercial collagen membrane made of demineralized bovine cortical bone was used as the control group. Absorption of this membrane started very early and by day 15 it was completely absorbed. These data are in accordance with the literature showing that collagen barrier degradation can start as early as 4 to 28 days after placement [29,30].

One of the pivotal issues concerning GTR and GBR is how long the barrier should remain in place in order to protect the periodontal ligament cells from the growth of gingival epithelium [31]. Although a 10 day duration would seem long enough to avoid apical migration of the epithelium, if collagen barriers are completely absorbed before day 30 neocementum can be found in the healing area, but no new bone is produced [6]. Most membranes tested herein were mineralized, since scaffolds with an apatite or apatite/collagen composite coating are more suitable for osteoblast-like cell adhesion and proliferation [32].

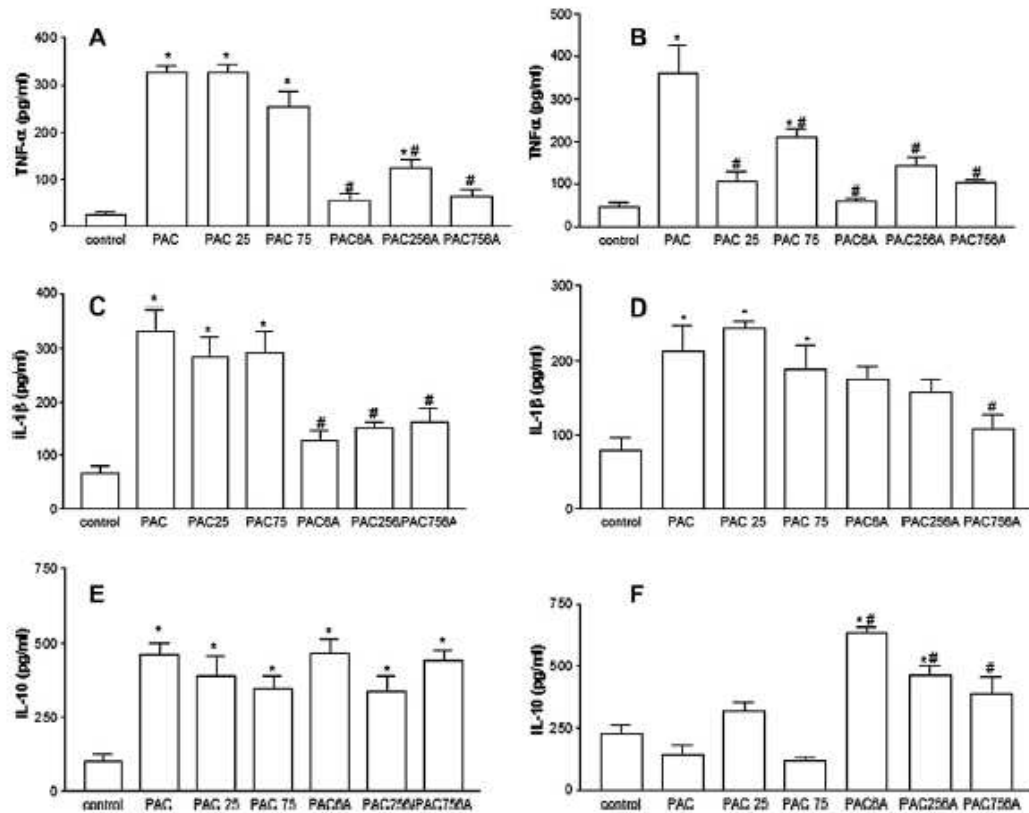


Fig. 5. Effect of cytokine dosage on the membrane and surrounding tissue. After killing a sample of the subcutaneous tissue was harvested for cytokines TNF- α (A,B), IL-1 β (C,D), IL-10 (E,F) on days 1 and 7. Bars represent the means \pm SEM. *Significant difference from the control group ($P < 0.05$). #Significant difference compared with the PAC group ($P < 0.05$). Data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni tests.

Table 1
Metalloproteinase immunohistochemistry in the tissue surrounding the membrane.

Membrane group	Density (%)
Control	8.14 \pm 6.11
PAC	6.93 \pm 4.48
PAC 25	6.42 \pm 5.27
PAC 75	5.40 \pm 0.68
PAC 8A	10.69 \pm 2.42
PAC 25 GA	14.57 \pm 4.62
PAC 75 GA	11.88 \pm 4.66

The percentage density of staining for metalloproteinases after 7 days was calculated using NijiImage software. Data represent means \pm SEMs.

It has been claimed that absorbable membranes used for GBR procedures must support new bone formation and maturation for at least 6 months [33,34]. In the present study the membrane groups without glutaraldehyde (PAC, PAC 25 and PAC 75) suffered biodegradation, but fragments were still present after 30 days. However, all cross-linked membranes were intact after 30 days and may be an option for use in GBR, in which a long period of time is necessary for bone formation. Most research has shown that in GTR the membrane must be intact for at least 30 days for bone

and periodontal ligament cells to fill the space. If the membrane dissolves or fragments before 4 weeks then it does not achieve this goal [35].

Our data show that the inflammatory responses to membranes without cross-linking were higher than those produced by the other membrane groups. This fact is in accordance with Lee et al. [4], who observed that numerous multinucleated cells and neutrophils were commonly found in connective tissue along the surface of the residual collagen membrane at 30 days. With a longer healing period the space occupied by the membrane and multinucleated cells/leukocytes was slowly replaced by connective tissue, bone and cementum. Based on these observations, a longer healing time may be needed for GTR collagen membranes to achieve optimal results [4].

All current biomaterials usually trigger a mild inflammatory response in the host. This response usually extends for a period of time longer than that observed in defect healing without membranes. A long lasting inflammatory reaction can cause a delay in the healing process. The electrical charge of the collagen membranes used herein could affect the behavior of cells and the distribution of components of the extracellular matrix. These anionic collagen matrices are promising materials for bone defect recovery

because of their biocompatibility and osteoconductivity, as well as their ability to start healing without the delays associated with other membranes [36].

The current study has shown that membranes without cross-linking (PAC, PAC 25 and PAC 75) caused intense inflammatory reactions when compared with the control membrane. It was found that some giant cells tried to phagocytose the membranes (data not shown), which was probably related to their fast degradation. GA cross-linking clearly reduced the inflammatory reaction, as is evident from the reduced leukocyte count observed in the histological analyses and by the cytokine dosage in the tissue surrounding the membrane. We did not find any foreign body reaction in the GA cross-linked groups (data not shown).

Cross-linking of collagen with GA involves the reaction of free amine groups of lysine or hydroxylysine amino acid residues of the polypeptide chains with the GA aldehyde groups [18]. In this study membrane cross-linking with GA was performed gradually with solutions of 0.01% (1 h) and 0.05% (7 h) GA, less than the GA concentration used in the literature [37]. This new methodology of reticulation was probably responsible for the reduced inflammatory reaction in our study. The use of 0.05% GA as the cross-linking reagent, to control the biodegradability of the collagen membranes, was based on the fact that it has been the reagent of choice to improve the mechanical properties and biocompatibility of many implantable collagen devices [38]. Anionic collagen membranes cross-linked with 0.05% GA displayed good biocompatibility with no adverse biological effects and controlled biodegradation was achieved as a function of the time of GA exposure. The biological behavior of the 8 h GA cross-linked membrane suggests that the anionic collagen membrane may be of potential use in GTR for periodontal tissue reconstruction and also in other collagen biomaterial applications where controlled biodegradability is required [37].

Our data also showed that cross-linked membranes had thicker fibrosis capsules as time progressed. This may be considered a positive finding as there was no inflammation around the membranes with reticulation, suggesting that they functioned as an inert material. Data in the literature has demonstrated that the cross-linked collagen membranes do not allow the penetration of connective tissue elements into the membrane surface and show no signs of integration into the surrounding tissues. The lack of adhesion between cross-linked collagen membranes and the adjacent connective tissue, as well as the lack of vascularization and tissue integration, may have resulted from the tendency of the cross-linked collagen membranes to split from the adjacent connective tissue [39] and may be an explanation for the fibrosis found around the cross-linked membrane in the present study.

Another advantage of the cross-linked collagen membranes was their capability to support healing, even when prematurely exposed to the contaminated oral environment. This finding was partially explained by the fact that, although prematurely exposed, cross-linked collagen membranes have the capacity to withstand bacterial collagenolytic degradation while facilitating soft tissue healing over the exposed membranes [40].

The MMPs are a family of peptidase enzymes that are responsible for the degradation of extracellular matrix components, including collagen. MMP1 is also designated interstitial collagenase, fibroblast collagenase and collagenase-1, and MMP-8 is also designated neutrophil collagenase, PMNL collagenase or collagenase-2 and degrades collagen types I, II and III. MMP-8 is expressed exclusively under inflammatory conditions. As immunostaining was high in all of the groups tested this finding revealed a predisposition of the host to degrade the membrane independently of its composition.

The interaction between bone healing events and polyanionic collagen matrices are still under investigation, which will hopefully explain many of the events observed in this study. The

cross-linked membranes have good strength for use in loaded areas and might have applicability in cases where the mechanical demands are high, such as in GBR and in minor oral surgery.

5. Conclusion

Our study reports the effect of progressive GA cross-linking of polyanionic collagen/apatite composite membranes by conducting a detailed histological evaluation of the tissue response and by assessing biodegradation of subcutaneous implants in rats. The inflammatory response was found to be more intense in membranes without cross-linking, while the fibrosis capsules were thicker in cross-linked membranes after 30 days. The membranes without cross-linking suffered intense biodegradation, while the membranes with cross-linking remained intact after 30 days. Progressive cross-linking with GA reduced the inflammatory response and prevented degradation of the membranes over the entire course of the observation period. The novelty of the present study lies in the ability of our cross-linking method to reduce degradation of the membranes combined with a low immune response, due to the low concentration of GA used. These membranes are thus an attractive option when the production of new bone depends on prolonged survival of a mechanical barrier.

Acknowledgements

The authors thank Maria Silvandira França Pinheiro, Department of Physiology and Pharmacology; and Maria do Socorro França Monte, Department of Morphology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Brazil, for technical assistance. This work was supported by Grant INCT 573928/2008-8 and Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP).

Appendix A. Figures with essential colour discrimination

Figure 4 in this article is difficult to interpret in black and white. The full colour image can be found in the on-line version, at doi: 10.1016/j.actbio.2010.04.012.

References

- [1] Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. *J Clin Periodontol* 1982;9:257–65.
- [2] Academy Report. Periodontal regeneration. *J Periodontol* 2005;76:1601–22.
- [3] Al-Hamdan K, Eber R, Sarment D, Kowalski C, Wang H-L. Guided tissue regeneration based-root coverage. Meta-analysis. *J Periodontol* 2003;74(10):1520–33.
- [4] Lee E-J, Meraw SJ, Oh T-J, Giannobile WV, Wang H-L. Comparative histologic analysis of coronally advanced flap with and without collagen membrane for root coverage. *J Periodontol* 2002;73(7):780–8.
- [5] Bunyaratavej P, Wang H-L. Collagen membranes: a review. *J Periodontol* 2001;72:215–29.
- [6] Pitaru S, Tal H, Soldinger M, No M. Collagen membranes prevent apical migration of epithelium and support new connective tissue attachment during periodontal wound healing in dogs. *J Periodontol Res* 1989;24:247–53.
- [7] Fleisher N, De Waal H, Bloom A. Regeneration of lost attachment apparatus in the dog using vicyl absorbable mesh (polylactin 910). *Int J Periodont Rest* 1988;8:45–55.
- [8] Gielkens PFM, Schortinghuis J, Jong GR, Raghoebar GM, Stegenga B, Bos RR. Vivosorb, Bio-Gide, and Gore-Tex as barrier membranes in rat mandibular defects: an evaluation by microradiography and micro-CT. *Clin Oral Impl Res* 2008;19:516–21.
- [9] Rao KP, Joseph T. Collagen graft copolymers and their biomedical applications. In: Nimmni ME, editor. *Collagen (Biotechnology)*, vol. III. Boca Raton, FL: CRC Press; 1988.
- [10] Minabe M, Kodama T, Kogou T, Tamura T, Hori T, Watanabe Y, et al. Different cross-linked types of collagen implanted in rat palatal gingiva. *J Periodontol* 1989;60:35–43.

- [11] Kasaj A, Reichert C, Götz H, Röhrig B, Smeets R, Willershausen B. In vitro evaluation of various bioabsorbable and nonresorbable barrier membranes for guided tissue regeneration. *Head Face Med* 2008;4:22.
- [12] Goisis G, Magrinador SVS, Martins VCA. Biomimetic mineralization of charged collagen matrices: in vitro and in vivo study. *Artif Organs* 2003;27(5):437–43.
- [13] Góes JC, Figueiró SD, Paiva JAC, Vasconcelos IF, Sombra ASB. On the piezoelectricity of anionic collagen films. *J Phy Chem Solids* 2002;63(3):465–70.
- [14] Liao S, Wang W, Uo M, Ohkawa S, Akasaka T, Tamura K, et al. A three-layered nano-carbonated hydroxyapatite/collagen/PLGA composite membrane for guided tissue regeneration. *Biomaterials* 2005;26:7564–71.
- [15] Silva CC, Pinheiro AG, Oliveira RS, Góes JC, Aranha N, Oliveira LR, et al. Properties and in vivo investigation of nanocrystalline hydroxyapatite obtained by mechanical alloying. *Mater Sci Eng* 2004;24(4):549–54.
- [16] Du C, Cui YZ, Zhu XD, de Groot K. Three-dimensional nano-HAp/collagen matrix loading with osteogenic cells in organ culture. *J Biomed Mater Res* 1999;44:407–15.
- [17] Du C, Cui YZ, Zhang W, Jeng QL, Zhu XD, de Groot K. Formation of calcium phosphate/collagen composites through mineralization of collagen matrix. *J Biomed Mater Res* 2000;50:518–27.
- [18] Chang MC, Ikoma T, Kikuchi M, Tanaka J. Preparation of a porous hydroxyapatite/collagen nanocomposite using glutaraldehyde as a crosslinkage agent. *J Mater Sci Lett* 2001;20:1199–201.
- [19] Kikuchi M, Itoh S, Ichinose S, Shinomiya K, Tanaka J. Self organization mechanism in a bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized in vitro and its biological reaction in vivo. *Biomaterials* 2001;22:1705–11.
- [20] Kawashita M, Nakao M, Minoda M, Kima H-M, Beppu T, Miyamoto T, et al. Apatite-forming ability of carboxyl group-containing polymer gels in a simulated body fluid. *Biomaterials* 2003;24:2477–84.
- [21] Góes JC, Figueiró SD, Oliveira AM, Macedo AAM, Silva CC, Ricardo NMPS, et al. Apatite coating on anionic and native collagen films by an alternate soaking process. *Acta Biomater* 2007;3:773–8.
- [22] Kodama T, Minabe M, Hori T, Watanabe Y. The effect of various concentrations of collagen barrier on periodontal wound healing. *J Periodontol* 1989;60:205–10.
- [23] Chen G, Sato T, Ohgushi H, Ushida T, Tateishi T, Tanaka J. Culturing of skin fibroblasts in a thin PLGA-collagen hybrid mesh. *Biomaterials* 2005;26(15):2559–66.
- [24] Goisis G, Braile DM, Carnevali NC, Ramirez VA. Thermal and morphological properties of glutaraldehyde crosslinked bovine pericardium followed by glutamic acid treatment. *Mater Res* 2009;12(1):113–9.
- [25] Goisis G, Moriaki CM. *BR 9.000.972.2*; March 1990.
- [26] Stegemann HH, Stalder K. Determination of hydroxyproline. *Clin Chim Acta* 1967;18:267–73.
- [27] SaWeh-Carabedian B, Poole S, Alchorne A, Winter J, Woolf CJ. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 1995;115:1265–75.
- [28] Cunha FQ, Boukili MA, Motta JB, Vargaftig BB, Ferreira SH. Blockade by fenspiride of endotoxin-induced neutrophil migration in the rat. *Eur J Pharmacol* 1993;238:47–52.
- [29] Zhao S, Piholt EM, Madsen JE, Donath K. Histological evaluation of different biodegradable and nonbiodegradable membranes implanted sub-cutaneously in rats. *J Craniomaxillofac Surg* 2000;28:116–22.
- [30] Owens KW, Yukna RA. Collagen membrane resorption in dogs: a comparative study. *Implant Dent* 2001;10:49–56.
- [31] Ighaut J, Aukhill I, Simpson D, et al. Progenitor cell kinetics during experimental guided tissue regeneration procedure. *J Periodontol Res* 1988;23:107–17.
- [32] Chen Y, Mak APT, Wang M, Li J, Wong MS. PLLA scaffolds with biomimetic apatite coating and biomimetic apatite/collagen composite coating to enhance osteoblast-like cells attachment and activity. *Surf Coat Technol* 2006;575–80.
- [33] Schenk RK. Bone regeneration: biologic basis. In: Buser D, Dahlin C, Schenk RK, editors. *Guided bone regeneration in implant dentistry*. Chicago, IL: Quintessence; 1994. p. 49–100.
- [34] Huttmacher DW, Kirsch A, Ackermann KI, Hürzeler MB. A tissue engineered cell occlusive device for hard tissue regeneration – a preliminary report. *Int J Periodont Rest* 2001;21:49–59.
- [35] Aukhill I, Simpson DM, Suggs C, et al. In vivo differentiation of progenitor cells of the periodontal ligament: an experimental study using physical barriers. *J Clin Periodontol* 1988;13:862–8.
- [36] Rocha LR, Goisis G, Rossi MA. Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. *Biomaterials* 2002;23:449–56.
- [37] Goisis G, Marcantônio Junior E, Marcantônio RMC, Lis FCC, Cancian DCJ, Carvalho WM. Biocompatibility studies of anionic collagen membranes with different degrees of glutaraldehyde cross-linking. *Biomaterials* 1999;20:27–34.
- [38] Boon ME, Ruijgrok JM, Vardaxi MJ. Collagen implants remain supple allowing fibroblast ingrowth. *Biomaterials* 1995;16:1089–93.
- [39] Tal H, Kozlovsky A, Artzi Z, Nemcovsky CE, Moses O. Cross-linked and non-cross-linked collagen barrier membranes disintegrate following surgical exposure to the oral environment: a histological study in the cat. *Clin Oral Implan Res* 2008;19:760–8.
- [40] Moses O, Pitaru S, Artzi Z, Nemcovsky CE. Healing of dehiscence-type defects in implants placed together with different barrier membranes: a comparative clinical study. *Clin Oral Implan Res* 2005;16:210–9.

ANEXO D - Artigo 2

Clinical Oral Implants Research - Manuscript Copy

CLINICAL ORAL IMPLANTS RESEARCH 

Guided bone regeneration produced by new mineralized and reticulated collagen membrane in critical-sized rat calvarial defects.

Journal:	<i>Clinical Oral Implants Research</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Research
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Veríssimo, Denusa; Federal University of Ceará, Department of Physiology and Pharmacology Leitão, Renata; Federal University of Ceará, Department of Morphology Figueiró, Sônia; Federal University of Ceará, Physics Department; Federal University of Ceará, Physics Department Goes, Júlio; Federal University of Ceará, Physics Department Lima, Vilma; Federal University of Ceará, Department of Physiology and Pharmacology Brito, Gerly Anne; Federal University of Ceará, Department of Morphology
Keywords:	Animal Experiments, Biomaterials, Guided tissue regeneration, Bone regeneration, Wound healing

SCHOLARONE™
Manuscripts

Clinical Oral Implants Research - Manuscript Copy

1
2
3 **Guided bone regeneration produced by new mineralized and reticulated**
4 **collagen membrane in critical-sized rat calvarial defects.**
5
6

7
8 D.M. Veríssimo¹, R.F.C. Leitão², S.D. Figueiró³, J.C. Góes³, V. Lima¹, G.A.C.
9 Brito².
10
11

12
13
14
15
16
17
18 ¹Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará,
19 Fortaleza, Brazil.
20

21
22
23 ²Department of Morphology, School of Medicine, Federal University of Ceará,
24 Fortaleza, Brazil.
25

26
27
28 ³Physics Department, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil.
29
30

31
32
33
34 * Corresponding author

35 Departamento de Fisiologia e Farmacologia

36 Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará

37 Rua Cel Nunes de Melo, 1127

38 CEP 60.430-270

39 Fortaleza, CE, Brazil

40 e-mail: denusa.verissimo@terra.com.br
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Abstract

Objective: This report aims to evaluate the bone regenerative effect of glutaraldehyde (GA) cross-linking on mineralized polyanionic collagen (PAC) membranes in critical-sized defects on rat calvarias.

Material and methods: Bone calvarial defects were made in Wistar rats and divided into five groups: sham group; control group; GA, 25GA and 75GA groups, which received one of three different PAC membranes mineralized by 0, 25 or 75 hydroxyapatite cycles and cross-linked by GA. Bone formation was evaluated based on digital radiography and computerized tomography. Histological analyses were performed 4 and 12 weeks after the surgical procedure to observe bone formation, membrane resorption and fibrous capsule. Measurement of myeloperoxidase (MPO) activity, tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin 1beta (IL-1 β) production were performed 24 hours after surgery.

Results: The percentage of new bone formation in GA, 25GA and 75GA groups was higher compared to control and sham groups. In GA and 25 GA groups, the membranes were still in place, involved by a thick fibrosis capsule, after 12 weeks. No significant difference was found among the groups regarding MPO activity and IL-1 β levels, although GA, 25GA and 75GA groups presented decreased levels of TNF- α in comparison to control group.

Conclusion: These new GA cross-linking membranes accelerated the bone healing of the calvarium defects, did not induce inflammation and were not resorbed during the analyzed period, so they may offer advantages in large bone defects where prolonged membrane barrier functions are desirable.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1. Introduction

For predictable osseointegration of dental implants and good aesthetics, the presence of sufficient bone is necessary. Bone deficiency is therefore considered a major problem, and an extensive number of treatment modalities for alveolar ridge augmentation have been used in an attempt to solve this problem. In guided bone regeneration, a barrier membrane prevents the in-growth of fibroblasts and provides a space for osteogenesis within the clot (Hollinger et al. 1999; Bunyaratavej & Wang 2001). Although different barrier membranes have been developed, the ideal barrier membrane is not yet available.

Collagen membranes have excellent cell affinity and biocompatibility for tissue regeneration (Liao et al. 2005). Membranes made from non-mineralized collagen, however, are normally of low strength and are thus difficult to manipulate. Furthermore, mineralized collagen is considered to provide better biocompatibility with animal and human tissue than pure collagen (Liao et al. 2005). As a hard tissue implant material, mineralized collagen also displays a conductivity effect that enhances bone growth. The rate of bioreabsorption in collagen membranes can be controlled by changing the content of calcium phosphate minerals (Liao et al. 2005). Mineralized collagen materials facilitate bone regeneration, inducing migration of undifferentiated cells into the graft recipient site, where they differentiate into osteoblasts and form new bone (i.e., stimulation of cellular transformation). The composites also supply a ready source of calcium for rapid mineralization (Du et al. 2000; Chang et al. 2001; Kikuchi et al. 2001). It has been reported that carboxyl group-containing organic polymers form apatite on their surfaces in simulated body fluid (SBF) if their

1
2
3 carboxyl groups have been previously combined with calcium ions because the
4
5 carboxyl group induces apatite nucleation and releases calcium ions to
6
7 accelerate this nucleation (Kawashita et al. 2003; Góes et al. 2007).
8

9
10 The mechanical, physical, chemical and biological properties of collagen
11 scaffolds can be influenced by modification of the matrix structure by chemical
12 treatment with glutaraldehyde (GA), which is a reference agent for the cross-
13 linking reactions. The in vivo absorption of collagen biomaterials can be
14 controlled by this cross-linking reaction. Some authors have used arrays of
15 collagen cross-linked with GA in the growth of fibroblasts with high biological
16 efficiency (Chen et al. 2005). GA reacts with the amino groups in the side
17 chains of collagen molecules, creating a framework in the material that
18 improves the mechanical and biological stability. Some problems related to GA
19 cross-linking, such as polymerization of GA monomers in solution leading to
20 heterogeneous cross-linking and cytotoxicity, have been overcome by
21 continuous reaction with GA at low concentrations. This method may produce a
22 material with the same pattern of degradability using smaller amounts of GA,
23 thus avoiding cytotoxic effects. Consistent with these reports, we recently
24 demonstrated that the subcutaneous implantation of mineralized polyanionic
25 collagen membranes cross-linked with GA reduced the inflammatory response
26 in rats and prevented membrane degradation when compared with membranes
27 that were not cross-linked (Veríssimo et al. 2010). In addition, progressive
28 treatment with low concentrations of GA is believed to induce more
29 homogeneous reactions in the collagen matrix (Goissis et al. 2009).
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52

53
54 The critical-size rat calvarium defect model has been used in several
55 investigations to evaluate guided bone regeneration (Schmitz & Hollinger 1986)
56
57
58
59
60

1
2
3 Bosch et al.1988; Verna et al. 2002) . In rats, 5 mm calvarial defects are
4 regarded as critical-size defects (CSD). This model is useful for studying bone
5 regeneration because it is relatively easy to manage and stage, and it has a low
6 risk of complications. The model is relevant in periodontal research because the
7 embryonic origin of calvaria is similar to that of the mandible. Without
8 intervention, the defect will be filled with a fibrous connective tissue rather than
9 with bone. The CSD n the rat calvarium has been recommended before
10 subjecting higher phylogenetic species to testing (Hollinger & Kleinschmidt
11 1990).
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

23 This report aims to study the effect of three different polyanionic collagen
24 membranes (PAC) mineralized by alternate soaking processes for either 0, 25
25 or 75 hydroxyapatite cycles and cross-linked by glutaraldehyde (GA) in the
26 healing of rat calvarial bone defects, by radiographic, tomographic and
27 histological evaluation as well as inflammatory parameters.
28
29
30
31
32
33
34
35

36 2. Materials and methods

37 2.1 Collagen Membrane

38
39
40 In the present study, polyanionic collagen membranes from intestinal
41 bovine serosa (PAC) were mineralized at 25°C for 0, 25 or 75 consecutive
42 cycles with hydroxyapatite at pH 9.0 and cross-linked with glutaraldehyde (GA,
43 25GA and 75GA, respectively). The preparation of these polyanionic collagen
44 membranes as well as the methods for the mineralization and cross-linking with
45 glutaraldehyde were described previously (Verissimo et al. 2010). The
46 membranes were manufactured by LOCEM in the Physics Department of the
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Federal University of Ceará (Brazil). A collagen membrane of demineralized
4 bovine cortical bone (Genderm, Genius, Baumer S.A., Brazil) was used as a
5 control.
6
7
8
9

10 11 12 13 14 **2.2 Animals**

15
16 One hundred and ninety Wistar rats (*Rattus norvegicus*, albinus, Wistar)
17 from the Federal University of Ceará, weighing 200-300 g, were housed in
18 temperature-controlled rooms and received water and food ad libitum. Surgical
19 procedures and animal treatments were conducted in accordance with the
20 Guidelines for Institutional Animal Care and Use of the Federal University of
21 Ceará, Brazil. The rats were housed in a room with a 12 h–12 h light–dark cycle
22 at a temperature between 22 and 24°C. They were randomly assigned to one of
23 five experimental treatment groups:
24
25
26
27
28
29
30
31
32

- 33
34 I- **Sham**: the surgical defects were not covered by a collagen membrane.
35
36 II- **Control**: the surgical defects were covered by a commercial collagen
37 membrane (Genderm, Baumer, Brazil).
38
39 III- **GA**: the surgical defects were covered by a polyanionic collagen
40 membrane (PAC) cross-linked with glutaraldehyde, without
41 impregnation with hydroxyapatite.
42
43 IV- **25GA**: the surgical defects were covered by a polyanionic collagen
44 membrane (PAC) cross-linked with glutaraldehyde, impregnated with
45 25 cycles of hydroxyapatite.
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

V- 75GA: the surgical defects were covered by a polyanionic collagen membrane (PAC) cross-linked with glutaraldehyde, impregnated with 75 cycles of hydroxyapatite.

The animals were anesthetized by intraperitoneal injection of 0.5% Tribrome. The overlying skin was shaved and disinfected with iodated alcohol. A semilunar incision was made in the scalp in the posterior region of the calvarium, allowing reflection of the skin, subcutaneous tissue and periosteum in an anterior direction, exposing the parietal bones. A 5,25 mm diameter trephine was used in a slow-speed micromotor under constant saline irrigation to create a full thickness bone defect, including the sagittal suture. The surgical defect, in all groups except the sham group, was covered with a disc (8 mm in diameter) of one of the control or PAC membranes. The soft tissues were then repositioned and sutured to achieve primary closure (4.0, Catgut). Each group of animals was euthanized with an overdose of Cloral Hydrate at 24 hours (n=6 per group), 4 weeks (n=6 per group), 8 weeks (n=8 per group) or 12 weeks (n=12 per group) after the surgical procedure (totaling 160 animals). The areas of the original surgical defect and the surrounding tissues were removed *en bloc* and were fixed in 10% neutral formalin (24 hours). After digital radiography and computed tomography were performed, the blocks were rinsed with water and decalcified in 10% ethylenediaminetetraacetic acid solution. After decalcification, the blocks were processed and embedded in paraffin. Serial sections that were 4 µm in thickness were cut in a longitudinal direction starting near the center of the original surgical defect. The sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) for analysis by light microscopy.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

The animals in the sham group were sacrificed 24 hours, 4, 8 or 12 weeks after the surgery. The animals sacrificed 24 hours after the surgical procedure served as a reference for the evaluation of bone formation, providing baseline values of the bone defect. These animals are referred to as the baseline group.

2.3 Evaluation of New Bone Formation

2.3.1 Digital Radiography Image

Digital radiographs of all specimens were taken using a digital dental X-ray apparatus (Spectro 70X Seletronic, Dabi Atlante, São Paulo, SP, Brazil) and a digital sensor, using the following parameters: 8 mA, 70 kVp, focus e object distance of 8 cm, and exposure time of 0.1 s. The digital radiographic images of the specimens were then analyzed with the NIHImageJ software. The radiolucent square area (pixel/mm) for each animal was measured, and each group mean area was calculated (pixel/mm).

The radiolucent mean area of each group was then computed as a percentage of the baseline's measurements, according to a formula that was previously described (Moses et al. 2008): mean of radiolucent area of each group (4, 8 or 12 weeks) multiplied by 100, divided by the baseline radiolucent mean area. To calculate the percentage of the area of new-bone formation, the obtained result was subtracted from 100, because the baseline radiolucent area is equivalent to

1
2
3 100%. The radiolucent area is inversely correlated with the new bone formed
4 and is expressed as a fraction of the original area.
5
6

7 8 9 **2.3.2. Computed Tomography Image**

10 Computed tomography was taken using the CT Scanner PreXion 3D (PreXion
11 Co., Ltd. Tokyo, Japan) (90 kV / 4 mA, 608 x 616, 200 μm resolution), and the
12 best slice of each specimen obtained was selected to calculate the radiolucent
13 area (mm^2) using the NIHImageJ software. The radiolucent mean area of each
14 group was then determined 4 and 12 weeks after the surgery to compare the
15 amount of mineralized tissue produced in response to each type of tested
16 membrane, because the radiolucent area is inversely related to bone formation.
17 The baseline corresponds to the radiolucent mean area calculated 24 hours
18 after the surgical procedures and serves as a reference for the original bone
19 defect.
20
21

22 In addition, 12 weeks after the surgery, the radiographic density of an area of 35
23 mm^2 , defined as a region of interest (ROI) and corresponding to the bone
24 defect, was measured and expressed as grey levels. The mean value of the
25 radiographic density obtained for each group was used for statistical analysis.
26 The baseline corresponds to the ROI of the sham group measured 24 hours
27 after surgery.
28

29 Radiographic density is the measure of the overall darkening of the image.
30 Density is a logarithmic unit that describes the ratio between light hitting the film
31 and light being transmitted through the film. A higher radiographic density
32 results in more opaque areas on the film, and a lower density results in more
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 transparent areas on the film. Thus, it can be concluded that the bone formation
4
5 areas are correlated with increased radiographic density.
6
7

8 9 **2.4 Histological Analysis**

10 Two histological sections from each animal, representing approximately
11 the center of the original surgical defect, were selected for a blind histological
12 evaluation of the resorption suffered by the membranes as well as the presence
13 of a fibrosis capsule involving these membranes. For this, the images of the
14 histological sections were captured by a digital camera connected to a light
15 microscope with an original magnification of 40X. The animals in which
16 membrane displacement was observed were excluded from all of the analyses,
17 including digital radiography and computed tomography.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

32 **2.5 Myeloperoxidase (MPO) activity in tissue surrounding the membranes**

33 MPO activity, a marker for neutrophils in inflamed tissue, was measured using a
34 modified version of the method described by Bradley et al. (1982). A sample of
35 the tissue was removed from the animals 24 hours after the surgical procedure
36 for analysis of MPO activity (totaling 30 animals). The specimen was stored at -
37 70°C until it was required for the assay. The tissue was weighed and triturated
38 using a Polytron Ultraturrax in an ice-cold buffer solution
39 (hexadecyltrimethylammonium bromide-HTAB), and the homogenate was
40 centrifuged at 4°C for 15 min (4,200 rpm). The supernatant was collected for
41 analyses in the enzyme-linked immunosorbance assay (ELISA), and values
42 were expressed as units of MPO per mg of tissue.
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

2.7 Cytokine (TNF- α , IL-1 β) dosage in the tissue surrounding the membranes

A sample of the surrounding tissue was removed from the five groups after 24 hours (from the same 30 animals used to determine the MPO activity) to evaluate the cytokine dosage. The specimens were stored at -70 °C until they required for the assay. The collected tissue was homogenized and processed as described by SaWeh-Garabedian et al. (1995). TNF- α and IL-1 β concentrations were determined by ELISA, as described previously (Cunha et al. 1993). Briefly, microtiter plates were coated overnight at 4 °C with antibodies against rat TNF- α and IL-1 β (2 μ g/ml). After blocking the plates, the samples and standard were added at various dilutions in duplicate and incubated at 4 °C for 24 h. The plates were washed three times with buffer, and then, biotinylated sheep polyclonal anti-TNF- α and anti-IL-1 β [diluted 1:1000 with assay buffer containing 1% bovine serum albumin (BSA)] were added to the wells. After further incubation at room temperature for 1 h, the plates were washed, and 50 μ l of avidin– horseradish peroxidase (diluted 1:5000) was added to the plates. An aliquot of 50 μ l of the color reagent o-phenylenediamine (OPD) was added 15 min later, and the plates were incubated in the dark at 37 °C for 15–20 min. The enzyme reaction was terminated with H₂SO₄, and the absorbance was measured at 490 nm. The measured values were expressed as picograms per milliliter (pg/ml).

Statistical Analysis

Univariate analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test were used to compare the mean observed values. P<0.05 was considered to

1
2
3 indicate a significant difference. Both analyses were executed using the Prism3
4
5 software (Graph-Pad Software, USA).
6
7

8 9 **3. Results**

10 **3.1 Evaluation of new bone formation**

11
12
13 **3.1.1 Digital Radiography Image:** Four weeks after the surgical procedure, the
14
15 GA, 25GA and 75GA groups exhibited a smaller radiolucent area that was
16
17 statistically different compared with the baseline group (radiolucent area 24
18
19 hours after the surgical procedure) (* $p < 0.05$) (Figure 1A). Twelve weeks after
20
21 the surgical procedure, the experimental groups GA and 25GA exhibited
22
23 decreased radiolucent areas that were statistically different compared to the
24
25 baseline group (Figure 1B).
26
27
28
29
30
31

32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

Figure 2 shows the percentage of new bone formation 4, 8 and 12 weeks after the surgical procedure. At 4 weeks, the percentage of new bone formation noted in all experimental groups (GA, 25GA and 75GA) was approximately 40%, which is higher than that found in both the control and sham groups (approximately 20%). Analyses of bone formation performed 8 and 12 weeks after the surgery showed similar results. A significant increase in the bone formation was observed in all experimental groups; the increase was estimated to be 40 to 50%, compared to the sham group, for which the bone formation remained close to 20%. The GA group showed the highest percentage of new bone formation during the 12-week observation period, at approximately 50% (Figure 2).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

3.1.2 Computed Tomography

Four weeks after the surgical procedures, the GA, 25GA and 75GA groups exhibited a significant smaller radioluscent area when compared to the baseline group (* p <0.05) (Figure 3A). Twelve weeks after the procedure, only the GA and 25GA groups exhibited significant differences compared to the baseline group (*p<0.05) (Figure 3B).

Figure 4 shows the radiographic density 12 weeks after implantation of the membranes. It was observed that the GA, 25GA, 75GA and control groups had similar densities and exhibited significant differences compared to the sham group (**p<0.05).

Figure 5 shows the images displayed by digital radiography and computed tomography 12 weeks after the surgery procedure. The reduction of the radiolucent areas in images C and D can be clearly observed by digital radiography, and those in C₁ and D₁ can be observed by computed tomography, which yields a higher definition image of the surgical wound than does digital radiography.

5.3 Histological analysis

The histological analyses of the area corresponding to the surgical defect performed 4 weeks after the procedure revealed a marked resorption of the membranes in the control group (Fig. 6B). In the experimental groups GA and 25GA, the membranes have remained intact (Fig. 6C and 6D, respectively), while the membranes in the 75GA group showed signs of resorption (Fig. 6E). Twelve weeks after the surgery, the membranes in the control group had been

1
2
3 completely resorbed (Fig. 7B), whereas the membranes in the 75GA group
4
5 were in the advanced state of resorption (Fig. 7E). The membranes in the GA
6
7 and 25GA groups were preserved (Fig. 7C and 7D, respectively).
8
9

10
11
12 The histological evaluation also revealed a fibrous capsule surrounding the
13
14 membranes of the GA and 25GA groups, observed 4 weeks (Fig. 6C and 6D,
15
16 respectively) and 12 weeks (Fig. 7C and 7D, respectively) after the surgical
17
18 procedures. There were no fibrous capsules in the control group in any of the
19
20 observation periods (Fig. 6B and 7B). It was also observed in the 75GA group
21
22 that the fibrous capsule tends to disappear as the membranes are resorbed
23
24 (Fig. 6E and 7E).
25
26

27
28
29 Histological evaluation showed new bone formation in all groups (Fig. 6 and 7).
30
31
32

33 34 35 **5.5 Myeloperoxidase (MPO) activity in the tissue surrounding the** 36 37 **membranes**

38
39 No significant differences were found among the groups regarding MPO activity,
40
41 which was performed 24 hours after the surgery (Fig. 8A).
42
43
44
45

46 47 48 **5.6 Cytokine (TNF- α , IL-1 β) dosage in the tissue surrounding the** 49 50 **membranes**

51
52 No significant differences were noted among the experimental groups regarding
53
54 the dosage of the proinflammatory cytokine IL-1 β ; dosages were assessed 24
55
56 hours after the surgery (Fig. 8B)
57
58
59
60

1
2
3 A marked decrease in TNF levels among the GA, 25GA and 75GA groups were
4
5 observed 24 hours after the surgery when compared with the control group
6
7 (p<0.05) (Fig. 8C).
8

9 10 **4. DISCUSSION**

11
12 The present study clearly demonstrates the bone healing efficacy of three
13
14 different collagen membranes. These membranes were mineralized by
15
16 alternative soaking processes for 0, 25 or 75 hydroxyapatite cycles and cross-
17
18 linked by glutaraldehyde. Studies were performed using the critical-size rat
19
20 calvarium defect model. This experimental model for studying bone
21
22 regeneration is stable and relatively easy to manage, and it has a low risk of
23
24 complications (Bosch et al. 1998). The size of the bone calvarium defects (5.25
25
26 mm) was in agreement with previous studies of critical-size defects in rats
27
28 (Mardas et al. 2002; Furlaneto et al. 2007; Kozlovsky et al. 2009; Potijanyakul et
29
30 al. 2010). Bone formation was assessed by digital radiograph images and
31
32 computed tomography, which produced very similar data. Because bone
33
34 formation is a three-dimensional (3D) process, techniques that offer 3D
35
36 measurements would be more desirable to evaluate bone formation during the
37
38 wound healing process than assessments based on two-dimensional (2D)
39
40 images, such as digital radiographs and histological slides (Yeom et al. 2008).
41
42 Computed tomography produces a high-resolution image, is quick, delivers only
43
44 a low effective dose of radiation and can produce a clear image of bones in
45
46 small living animals (Pryor et al. 2006). In fact, we can see that images obtained
47
48 by computed tomography show the edges of the bone defect more clearly and
49
50 allow us to choose the best slice for carrying out the measurements. Although
51
52 the results obtained with digital radiography and computed tomography are very
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 similar, in all periods, computed tomography is more sensitive than digital
4 radiography in the evaluation of differences among the groups.
5
6

7 The GA and 25GA groups showed the best results at 12 weeks after the
8 surgery, with significant differences compared to the baseline group, which
9 represents the original bone defect. However, a complete closure of the
10 calvarial defect was not observed in this study. The amount of new bone
11 formation in the GA, 25GA and 75GA was around 40 to 50% of the original
12 defect, at 12 weeks after surgery. Defects in compact bone (Type I quality) have
13 shown reduced bone fill when compared to defects in more cancellous types of
14 bone (Zitzmann et al. 1999). Because the cortical bone of the rat cranium may
15 be considered a Type I bone, a decrease in bone regeneration when compared
16 to a mandibular bone defect that also involves cancellous bone is expected.
17 The geometry of the defect, in particular, the relationship between the defect
18 depth and width, affects the potential of the adjacent bone walls to populate the
19 defect area with committed cells and to accomplish a complete defect fill
20 (Dupoirieux et al. 2001). In this respect, the shallow geometry of a calvarial
21 defect requires superior mechanical properties of a barrier membrane to
22 prevent collapse and subsequent impairment of bone regeneration in the defect
23 (Dupoirieux et al. 2001).
24
25

26 Although the literature reports that nano-carbonated hydroxyapatite/collagen
27 composite materials facilitate reliable bone regeneration, our data do not show
28 statistical differences at any observation time in bone formation among the
29 groups that received membranes impregnated with hydroxyapatite (25GA and
30 75GA groups) and the GA group, which consisted of animals that received non-
31 mineralized membranes. Hydroxyapatite did not substantially enhance the
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

healing of calvarial defects in the current study. We speculate that the process of crosslinking with glutaraldehyde must have promoted a closing of the membrane fiber, thus preventing the release of these crystals into the site.

Progressive treatment with low concentrations of GA is believed to induce more homogeneous reactions in the collagen matrix, facilitating the release of crystals.

The histological analyses revealed a thick fibrous capsule surrounding the membranes of the GA and 25GA groups, which remained intact, with no significant reabsorption during all the observations periods. Among the cross-linking membranes tested, only the 75GA did not remain intact, instead showing signs of resorption. The preservation of the membrane, secondary to formation of the fibrous capsule, is important for bone regeneration because the GA and 25GA groups displayed better outcomes of bone formation than 75GA.

These results are consistent with our previous data, obtained from subcutaneous membrane implants in rats, which demonstrated that cross-linking with GA prevents degradation of the membranes over the entire course of the observation period (Veríssimo et al. 2010). In the present study, unlike the previously mentioned study, the commercial collagen membrane of demineralized bovine cortical bone, which was used as a control, was still present 4 weeks after the implantation, despite showing intense signs of biodegradation. Twelve weeks later, that membrane was completely resorbed. This finding was expected because the resorption of commercially available collagen membranes has been reported to occur within the first 2 months after treatment (Schliephake et al. 2004). In the subcutaneous tissue of rats, the absorption of this commercial collagen membrane begins very early and is

1
2
3 completely absorbed by day 15 (Verissimo et al. 2010) . The difference in the
4
5 resorption time of the commercial membrane observed in these two studies
6
7 may be due to the reduced vascular tissue found in the skull compared with the
8
9 subcutaneous tissue of the dorsal region of the animals (Schmitz & Hollinger
10
11 1986) .

12
13
14 The literature has suggested that the difference in the degradation pattern may
15
16 have clinical implications. In guided bone regeneration, a common procedure in
17
18 dental implant surgery, barrier membranes are used to exclude epithelial and
19
20 connective tissue and to allow the proliferation of the bone progenitor cells into
21
22 the isolated area (Nyman et al. 1987; Greenstein & Caton 1993; Schlegel et al.
23
24 1997; Moses et al. 2008). In this case, bioabsorbable and non-absorbable
25
26 membranes are effective (Nyman et al. 1987; Patino et al. 2002; Moses et al.
27
28 2005). However, non-absorbable membranes, mostly composed of
29
30 polytetrafluoroethylene, require a second surgical procedure for their removal
31
32 (Simion et al. 1994; Nowzari & Slots 1995; Simion et al. 1997; Nowzari et al.
33
34 1998; Moses et al. 2008). Therefore, bioabsorbable membranes with
35
36 comparable clinical outcomes have become popular in bone-regeneration
37
38 procedures (Simion et al. 1997; Moses et al. 2005). Successful regeneration is
39
40 possible if soft tissue is excluded and space for bone growth is maintained
41
42 throughout the healing time. This can vary between 3 and 12 months,
43
44 depending on the dimensions of the bone defect (Nyman 1987; Schlegel 1997;
45
46 Hammerle et al.1998). Premature membrane resorption leads to less-than-
47
48 optimal results (Moses et al. 2008). The membranes should be chosen
49
50 according to the clinical demands of each case. Thus, in large, non-self-
51
52 contained bone defects, where prolonged membrane barrier functions are
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 desirable, certain cross-linked membranes may offer advantages. In this
4
5 context, the experimental GA cross-linking membranes are an attractive option
6
7 when the production of new bone depends on the prolonged survival of a
8
9 mechanical barrier.

10
11 The indication of those experimental membranes is reinforced by the current
12
13 results related to the evaluated inflammatory parameters, which indicate that
14
15 those membranes do not trigger a significant inflammatory reaction. This is
16
17 evaluated by myeloperoxidase activity, a marker for neutrophils in inflamed
18
19 tissue, and by the dosage of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α in
20
21 circumjacent subcutaneous calvarium tissue. Moreover, the histological
22
23 evaluation of GA, 25GA and 75GA groups showed no inflammatory cells or
24
25 osteoclasts at the edges of the wound in all evaluated periods. Mild
26
27 inflammation may stimulate osteoclastic resorption because osteoclasts
28
29 respond to inflammatory mediators such as IL-1 and TNF- α (Kobayashi et al.
30
31 2000). Consistent with these data, we have previously demonstrated that GA
32
33 cross-linking membranes reduce the inflammatory response in the rat
34
35 subcutaneous implant model (Veríssimo et al. 2010).
36
37
38
39
40
41

42 43 **5. CONCLUSION**

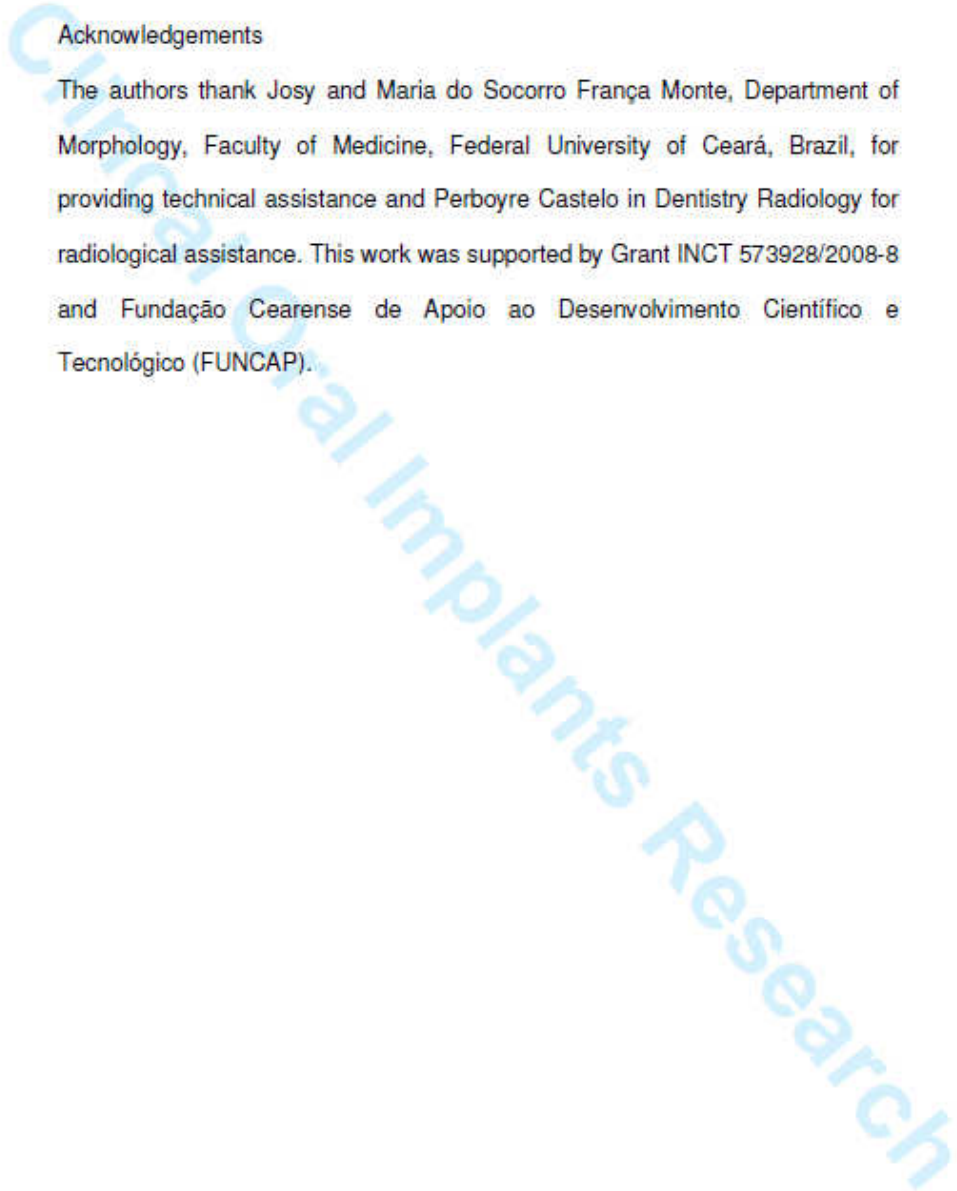
44
45 According to our results, the GA cross-linking membranes were more effective
46
47 than the commercial collagen membrane at regenerating bone in injured rat
48
49 calvarias because an increase in new bone formation was clearly observed in
50
51 the GA, 25GA and 75GA groups. The impregnation of the collagen membranes
52
53 with hydroxyapatite does not positively affect the amount of new bone
54
55 regeneration in the current study. In view of this, the GA cross-linking
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

membranes may offer advantages in large bone defects where prolonged membrane barrier functions are desirable.

Acknowledgements

The authors thank Josy and Maria do Socorro França Monte, Department of Morphology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Brazil, for providing technical assistance and Perboyre Castelo in Dentistry Radiology for radiological assistance. This work was supported by Grant INCT 573928/2008-8 and Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP).



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

References

- Bosch, C., Melsen, B. & Vargervik, K. (1998) Importance of the critical-size bone defect in testing bone regeneration. *Journal of Craniofacial Surgery* 9:310-316.
- Bradley, P.P., Christensen, R.D. & Rothstein, G. (1982) Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. *Blood* 60:618-622.
- Bunyaratavej, P. & Wang, H.L. (2001) Collagen membranes: a review. *Journal of Periodontology* 72:215-229.
- Chang, M.C., Ikoma, T., Kikuchi, M. & Tanaka, J. (2001) Preparation of a porous hydroxyapatite/collagen nanocomposite using glutaraldehyde as a crosslinkage agent. *Journal of Materials Science Letters* 20:1199-1201.
- Chen, G., Sato, T., Ohgushi, H., Ushida, T., Tateishi, T. & Tanaka, J. (2005) Culturing of skin fibroblasts in a thin PLGA-collagen hybrid mesh. *Biomaterials* 26: 2559-2566.
- Cunha, F.Q., Boukili, M.A., Motta, J.I.B., Vargaftig, B.B. & Ferreira, S.H. (1993) Blockade by fenspiride of endotoxin-induced neutrophil migration in the rat. *European Journal of Pharmacology* 238:47-52.
- Du, C., Cui, F.Z., Zhang, W., Feng, Q.L., Zhu, X.D. & de Groot, K. (2000) Formation of calcium phosphate/collagen composites through mineralization of collagen matrix. *Journal of Biomedical Materials Research* 50:518-527.
- Dupoirieux, L., Pourquier, D., Picot, M.C. & Neves, M. (2001) Comparative study of three different membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 30:58-61.
- Furlaneto, F.A., Nagata, M.J., Fucini, S.E., Deliberador, T.M., Okamoto, T. & Messori, M.R. (2007) Bone healing in critical size defects treated with bioactive glass/calcium sulfate: a histologic and histometric study in rat calvaria. *Clinical Oral Implants Research* 18:311-318.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
60
- Góes, J.C., Figueiró, S.D., Oliveira, A.M., Macedo, A.A.M., Silva, C.C., Ricardo, N.M.P.S. & Sombra, A.S.B. (2007) Apatite coating on anionic and native collagen films by an alternate soaking process. *Acta Biomaterialia* 3:773-778.
- Goissis, G., Braile, D.M., Carnevalli, N.C. & Ramirez, V.A. (2009) Thermal and morphological properties of glutaraldehyde crosslinked bovine pericardium followed by glutamic acid treatment. *Materials Research* 12:113-119.
- Greenstein, G. & Caton J.G. (1993) Biodegradable barriers and guided tissue regeneration. *Periodontology 2000* 1: 36-45.
- Hammerle, C.H., Chiantella, G.C., Karring, T. & Lang, N.P. (1998) The effect of deproteinized bovine bone mineral on bone regeneration around titanium dental implants. *Clinical Oral Implants Research* 9:151-162.
- Hollinger, J.O, Buck, D.C & Bruder, S.P (1999) Biology of bone healing: its impact on clinical therapy. In: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE, eds. *Tissue Engineering. Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics*. 1st edition, 17-53, Chicago: Quintessence.
- Hollinger, J.O. & Kleinschmidt, J.C. (1990) The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *Journal of Craniofacial Surgery* 1: 60-68.
- Kawashita, M., Nakao, M., Minoda, M., Kima, H-M., Beppu, T., Miyamoto, T., Kokubo, T. & Nakamura, T. (2003) Apatite-forming ability of carboxyl group-containing polymer gels in a simulated body fluid. *Biomaterials* 24:2477-2484.
- Kikuchi, M., Itoh, S., Ichinose, S., Shinomiya, K. & Tanaka, J. (2001) Self organization mechanism in a bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized in vitro and its biological reaction in vivo. *Biomaterials* 22:1705-1711.
- Kobayashi, K., Takahashi, N., Jimi, E., Udagawa, N., Takami, M., Kotake, S., Nakagawa, N., Kinoshita, M., Yamaguchi, K., Shima, N., Yasuda, H., Morinaga, T., Higashino, K., Martin J.T. & Suda, T. (2000) Tumor necrosis factor α stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *The Journal of Experimental Medicine* 191:275-285.
- Kozlovsky, A., Aboodi, G., Moses, O., Tal, H., Artzi, Z., Weinreb, M. & Nemcovsky, C.E. (2009) Bio-degradation of a resorbable collagen membrane

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

(Bio-Gides) applied in a double-layer technique in rats. *Clinical Oral Implants Research* 20:1116-1123.

Liao, S., Wang, W., Uo, M., Ohkawa, S., Akasaka, T., Tamura, K. Cui, F. & Watari, F. (2005) A three-layered nano-carbonated hydroxyapatite/collagen/PLGA composite membrane for guided tissue regeneration. *Biomaterials* 26:7564-7571.

Mardas, N., Kostopoulos, L. & Karring, T. (2002) Bone and suture regeneration in calvarial defects by e-PTFE-membranes and demineralized bone matrix and the impact on calvarial growth: an experimental study in the rat. *Journal of Craniofacial Surgery* 13:453-464.

Moses, O., Pitaru, S., Artzi, Z. & Nemcovsky, C.E. (2005) Healing of dehiscence-type defect in implant placed together with different barrier membranes: A comparative clinical study. *Clinical Oral Implants Research* 16:210-219.

Moses, O., Vitrial, D., Aboodi, G., Sculean A., Tal, H., Kozlovsky, A., Artzi, Z., Weinreb, M. & Nemcovsky, C.E. (2008) Biodegradation of Three Different Collagen Membranes in the Rat Calvarium: A Comparative Study. *Journal of Periodontology* 905-911.

Nowzari, H. & Slots, J. (1995) Microscopic and clinical study of polytetrafluoroethylene membranes for guided bone regeneration around implants. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants* 10:67-73.

Nowzari, J., Engebretson, S.P., Donath, K. & Weber, H.P. (1998) Guided bone regeneration utilizing expanded polytetrafluoroethylene membranes in combination with sub-merged and non submerged dental implants in beagle dogs. *Journal of Periodontology* 69:528-535.

Nyman, S., Gottlow, J., Lindhe, J., Karring, T. & Wennstrom, J. (1987) New attachment formation by guided tissue regeneration. *Journal of Periodontal Research* 22:252-254.

Patino, M.G., Neiders, M.E., Andreana, S., Noble, B. & Cohen, R.E. (2002) Collagen as an implantable material in medicine and dentistry. *Journal of Oral Implantology* 28:220- 225.

Potijanyakul, P., Sattayasansakul, W., Pongpanich, S., Leepong, N. & Kintarak, S. (2010) Effects of Enamel Matrix Derivative on Bioactive Glass in Rat Calvarium Defects. *Journal of Oral Implantology* 195-205.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Pryor, M.E., Susin, C. & Wikesjö, U.M. (2006) Validity of radiographic evaluations of bone formation in a rat calvaria osteotomy defect model. *Journal of Clinical Periodontology* 33:455-460.

SaWeh-Garabedian, B., Poole, S., Allchorne, A., Winter, J. & Woolf, C.J. (1995) Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. *Brazilian Journal of Pharmacology* 115:1265-1275.

Schlegel, A.K., Mohler, H., Busch, F. & Mehl, A. (1997) Preclinical and clinical studies of a collagen membrane (BioGide). *Biomaterials* 18:535-538.

Schliephake, H., Tavassol, F., Gehnsky, M., Dard, M. & Sewing, A. (2004) Use of a mineralized collagen membrane to enhance repair of calvarial defects in rats. *Clinical Oral Implants Research* 15:112-118.

Schmitz, J.P. & Hollinger, J.O. (1986) The critical size defect as an experimental model for craniomandibular nonunions. *Clinical Orthopedics and Related Research* 205:299-308.

Simion, M., Masitano, U. & Salvato, A. (1997) Treatment of dehiscences and fenestration around dental implants using resorbable and non-resorbable membranes associated with bone autografts: A comparative clinical study. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants* 12:159-167.

Simion, M., Trisi, P., Maglione, M. & Piattelli, A. (1994) A preliminary report on a method for studying the permeability of expanded polytetrafluoroethylene membrane to bacteria in vitro: A scanning electron microscopic and histological study. *Journal of Periodontology* 65:755-761.

Veríssimo, D.M., Leitão, R.F.C., Ribeiro, R.A., Figueiró, S.D., Sombra, A.S.B., Góes, J.C. & Brito, G.A.C. (2010) Polyanionic collagen membranes for guided tissue regeneration: Effect of progressive glutaraldehyde cross-linking on biocompatibility and degradation. *Acta Biomaterialia* 4011-4018.

Verna, C., Bosch, C., Dalstra, M., Wikesjö, U.M.E. & Trombelli, L. (2002) Healing patterns in calvarial bone defects following guided bone regeneration in rats: A microCT analysis. *Journal of Clinical Periodontology* 29:865-887.

Yeom, H.R., Blanchard, S., Kim, S.J., Zunt, S. & Chu, T.M.G. (2008) Correlation between micro-computed tomography and histomorphometry for assessment of new bone formation in a calvarial experimental model. *Journal of Craniofacial Surgery* 19:446-452.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Zitzmann, N.U., Schärer, P. & Marinello, G.P. (1999) Factors influencing the success of GBR. Smoking, timing of implant placement, implant location, bone quality and provisional restoration. *Journal of Clinical Periodontology* 26:673-682.

Clinical Oral Implants Research

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Legends

Figure 1. Radiolucent area measured by digital radiography 4 (A) and 12 (B) weeks after the surgical procedure. The mean value of the radiographic radiolucent area was measured and calculated by comparing the amount of mineralized tissue produced in response to each membrane group. Bars represent the mean value \pm standard error of the mean (SEM). * $P < 0.05$ represents significant differences compared with the baseline group (24 hours after the surgical procedure). Data were analyzed by ANOVA and the Bonferroni test.

Figure 2. Percentage of new bone formation after the surgical procedure during the evaluated period. The radiolucent area for each group was calculated as a percentage of the respective baseline area (24 hours) measurement according to the following formula: mean of the radiolucent area of each group 4, 8 and 12 weeks after the surgical procedure multiplied by 100, divided by the radiolucent mean area of the baseline group. Subsequently, the percentage of new-bone formation area was calculated and compared. The radiolucent area of the baseline group is equivalent to 100%, and the result was reduced by 100 to correspond to the new-bone formation data.

Figure 3. Radiolucent area measured by computed tomography 4 (A) and radiolucent area was measured and calculated by comparing the amount of mineralized tissue produced in response to each group. Bars represent the mean value \pm standard error of the mean (SEM). * $P < 0.05$ represents significant differences compared with the baseline group (24 hours after the surgical procedure). Data were analyzed by ANOVA and the Bonferroni test.

Figure 4. Radiographic density 12 weeks after the surgical procedure. The mean value of the radiographic density was measured and calculated by comparing the amount of mineralized tissue produced in response to each used membrane. Bars represent the mean value \pm standard error of the mean (SEM).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

**P<0.05 represents significant differences compared with the sham group.
Data were analyzed by ANOVA and the Bonferroni test.

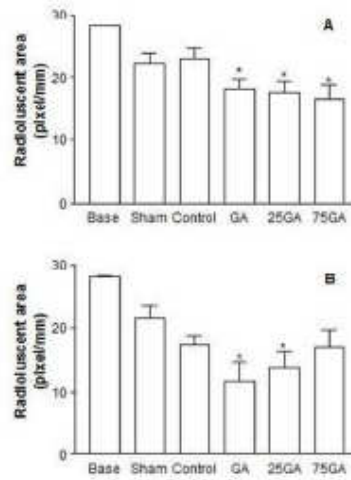
Figure 5. Images displayed by digital radiography and computed tomography 12 weeks after the surgery procedure. The images correspond to: A) Sham group, B) Control group, C) GA group, D) 25GA group and E) 75GA group. Images A, B, C, D and E correspond to digital radiography, and images A1, B1, C1, D1 and E1 correspond to computed tomography scans.

Figure 6. Microscopic aspects of the rat tissues after 5.25 mm critical-sized cranial defects. Four weeks after the surgical procedure, the calvaria, the membrane and the surrounding tissue were removed and processed for hematoxylin and eosin staining. The photomicrographies represent (A) Sham, (B) Control, (C) GA, (D) 25GA, (E) 75GA and (F) Unoperated animals. The black arrows represent newly formed bone. Scale bar length, 250 μm (X40 magnification).

Figure 7. Microscopic aspects of the rat tissues after 5.25 mm critical-sized cranial defects. Twelve weeks after the surgical procedure, the calvaria, the membrane and the surrounding tissue were removed and processed for hematoxylin and eosin staining. The photomicrographies represent (A) Sham, (B) Control, (C) GA, (D) 25GA, (E) 75GA and (F) Unoperated animals. Black arrows represent newly formed bone. Scale bar length, 250 μm (X40 magnification).

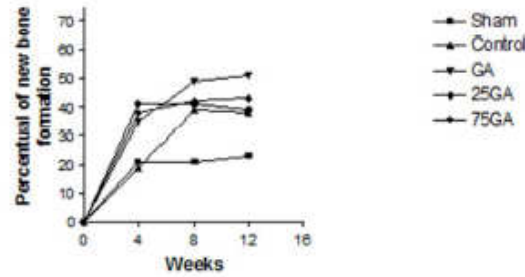
Figure 8. Myeloperoxidase (MPO) activity and cytokine dosage in the surrounding tissue over the critical-sized defect of rats. After animals were sacrificed, a sample of the tissue over the defect was harvested for the MPO activity assay (9A) and for analysis of cytokines TNF- α (9B) and IL-1 β (9C) levels 24 hours after the surgical procedure. Bars represent the mean value \pm standard error of the mean (SEM). #P<0.05 represents significant differences compared with the control group. Data were analyzed with ANOVA and the Bonferroni test.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



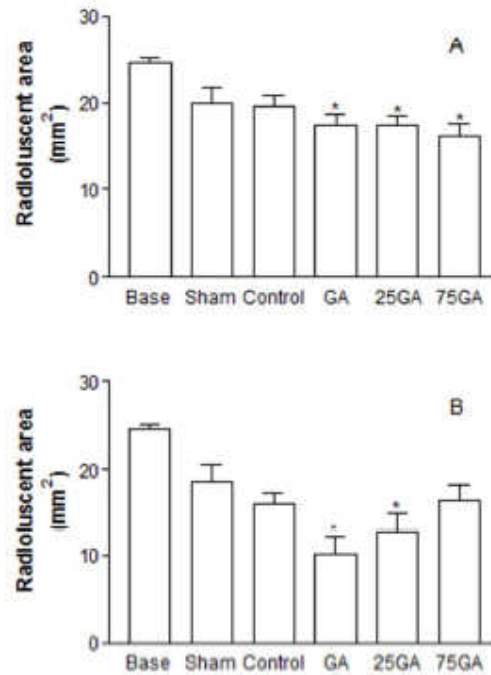
Radiolucent area measured by digital radiography 4 (A) and 12 (B) weeks after the surgical procedure. The mean value of the radiographic radiolucent area was measured and calculated by comparing the amount of mineralized tissue produced in response to each membrane group. Bars represent the mean value \pm standard error of the mean (SEM). * $P < 0.05$ represents significant differences compared with the baseline group (24 hours after the surgical procedure). Data were analyzed by ANOVA and the Bonferroni test. 254x190mm (96 x 96 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



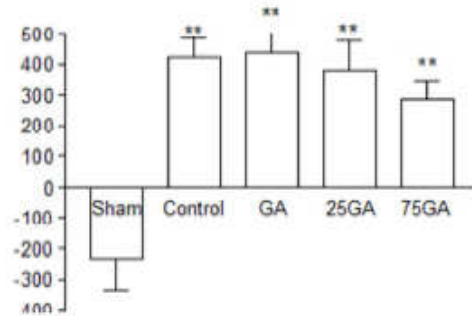
Percentage of new bone formation after the surgical procedure during the evaluated period. The radiolucent area for each group was calculated as a percentage of the respective baseline area (24 hours) measurement according to the following formula: mean of the radiolucent area of each group 4, 8 and 12 weeks after the surgical procedure multiplied by 100, divided by the radiolucent mean area of the baseline group. Subsequently, the percentage of new-bone formation area was calculated and compared. The radiolucent area of the baseline group is equivalent to 100%, and the result was reduced by 100 to correspond to the new-bone formation data.
99x66mm (96 x 96 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Radioluscent area measured by computed tomography 4 (A) and 12 (B) weeks after the surgical procedure. The mean value of the radiographic radioluscent area was measured and calculated by comparing the amount of mineralized tissue produced in response to each group. Bars represent the mean value \pm standard error of the mean (SEM). * $P < 0.05$ represents significant differences compared with the baseline group (24 hours after the surgical procedure). Data were analyzed by ANOVA and the Bonferroni test.
104x130mm (96 x 96 DPI)

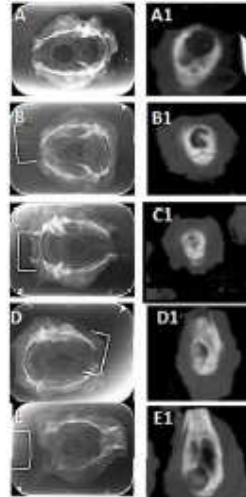
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Radiographic density 12 weeks after the surgical procedure. The mean value of the radiographic density was measured and calculated by comparing the amount of mineralized tissue produced in response to each used membrane. Bars represent the mean value \pm standard error of the mean (SEM). ** $P < 0.05$ represents significant differences compared with the sham group. Data were analyzed by ANOVA and the Bonferroni test.

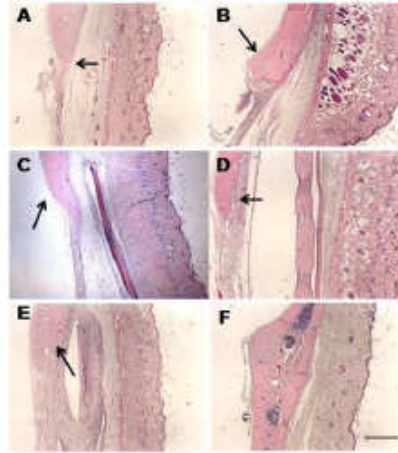
98x83mm (96 x 96 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



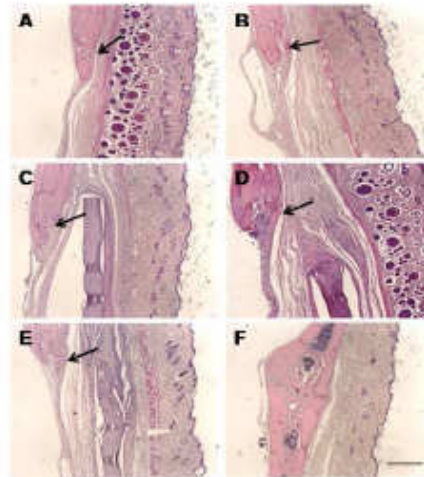
Images displayed by digital radiography and computed tomography 12 weeks after the surgery procedure. The images correspond to: A) Sham group, B) Control group, C) GA group, D) 25GA group and E) 75GA group. Images A, B, C, D and E correspond to digital radiography, and images A1, B1, C1, D1 and E1 correspond to computed tomography scans.
254x190mm (96 x 96 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



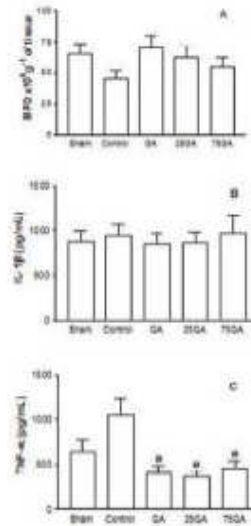
Microscopic aspects of the rat tissues after 5.25 mm critical-sized cranial defects. Four weeks after the surgical procedure, the calvaria, the membrane and the surrounding tissue were removed and processed for hematoxylin and eosin staining. The photomicrographs represent (A) Sham, (B) Control, (C) GA, (D) 25GA, (E) 75GA and (F) Unoperated animals. The black arrows represent newly formed bone. Scale bar length, 250 μ m (X40 magnification).
254x190mm (96 x 96 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Microscopic aspects of the rat tissues after 5.25 mm critical-sized cranial defects. Twelve weeks after the surgical procedure, the calvaria, the membrane and the surrounding tissue were removed and processed for hematoxylin and eosin staining. The photomicrographs represent (A) Sham, (B) Control, (C) GA, (D) 25GA, (E) 75GA and (F) Unoperated animals. Black arrows represent newly formed bone. Scale bar length, 250 μ m (X40 magnification).
254x190mm (96 x 96 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Myeloperoxidase (MPO) activity and cytokine dosage in the surrounding tissue over the critical-sized defect of rats. After animals were sacrificed, a sample of the tissue over the defect was harvested for the MPO activity assay (9A) and for analysis of cytokines TNF- α (9B) and IL-1 β (9C) levels 24 hours after the surgical procedure. Bars represent the mean value \pm standard error of the mean (SEM). #P<0.05 represents significant differences compared with the control group. Data were analyzed with ANOVA and the Bonferroni test.

254x190mm (96 x 96 DPI)