

Cicatrização de defeitos periostais na calvária entre dois tipos de membranas produzidas por meio de bioengenharia: estudo em coelhos

Healing pattern of periosteal defects in calvary between two types of membranes produced through bioengineering: Study in rabbits

Josemael de Oliveira Ribas-Filho¹, Elora Sampaio Lourenço², Fernanda Piraja Figueiredo³, Oscar Capistrano dos Santos², Sandra Oliveira de Araújo³, Igor Lima Maldonado⁴, Allan Fernando Giovanini¹

RESUMO

Introdução: Simultaneamente ao desenvolvimento de novos biomateriais, abundantes modalidades cirúrgicas têm sido propostas, com a finalidade de promover adequada regeneração de defeitos ósseos, sem proporcionar fenestrações ou deiscências. Entre as técnicas regenerativas atualmente aceitas para este propósito, destaca-se a regeneração tecidual guiada.

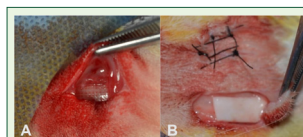
Objetivo: Avaliar o padrão de cicatrização e a resposta histológica do organismo frente à inserção de uma membrana a base de gelatina tipo A (Marquette), e compará-la com membrana comercial.

Métodos: Foram selecionadas 15 coelhas adultas. Na região parietal da calvária foram realizados retalhos para criação de uma bolsa supraparietal e implantação de 2 tipos de membranas reabsorvíveis: membrana Marquette e membrana Bio-Gide®. Após o procedimento cirúrgico os animais foram alocados em 3 grupos randomicamente selecionados (n = 5) para o período de eutanásia, que ocorreu em 2, 4 e 6 semanas pós-operatórias. Posteriormente, as áreas da calvária foram removidas e coradas por H&E e analisadas para averiguar formação de periosteio, infiltrado inflamatório na área de inserção de membrana, degradação/reabsorção da membrana, e fibrose perimembranar.

Resultados: Ao redor da membrana Bio-Gide® ocorreu discreta infiltração inflamatória e a membrana sofreu reabsorção ao decorrer do período pós-operatório com reconstrução de periosteio prevalentemente de caráter fibroso. A membrana Marquette também não desencadeou importante reação inflamatória. Contudo, não foi verificada reabsorção significativa durante o período, e também ocorreu significativa formação de cápsula fibrosa cerceando toda área membranar.

Conclusão: A membrana Marquette produz reação de isolamento tecidual, minimizando a formação periosteal ao mesmo tempo que não proporciona sua degradação.

PALAVRAS-CHAVE: Regeneração óssea guiada. Biomateriais. Reação tecidual. Biocompatibilidade tecidual.



A) membrana Marquette; B) membrana Bio-Gide

Mensagem Central

Simultaneamente ao desenvolvimento de novos biomateriais, abundantes modalidades cirúrgicas têm sido propostas, com a finalidade de promover adequada regeneração de defeitos ósseos, sem proporcionar fenestrações ou deiscências. Entre as técnicas regenerativas atualmente aceitas para este propósito, destaca-se a regeneração tecidual guiada. Assim, este estudo tem a finalidade de avaliar o padrão de cicatrização e a resposta histológica do organismo frente à inserção de uma membrana a base de gelatina tipo A, e compará-la com membrana comercial.

Perspectiva

Membrana a base de gelatina tipo A não se mostrou superior no ponto de vista de biocompatibilidade e de absorção. Fator que pode estar associado a este resultado é a arquitetura do scaffold, pois o tamanho e a direção das suas porosidades afetam diretamente a migração e interação celular da região devido à particularidade que cada tecido possui, como os tipos de células, pH ou suprimento sanguíneo.

ABSTRACT

Introduction: Simultaneously with the development of new biomaterials, numerous surgical modalities have been proposed, with the aim of promoting adequate regeneration of bone defects, without providing fenestrations or dehiscence. Among the regenerative techniques currently accepted for this purpose, guided tissue regeneration stands out.

Objective: To evaluate the healing pattern and the histological response of the organism to the insertion of a type A gelatin-based membrane, and to compare it with a commercial membrane.

Method: Fifteen adult rabbits were selected. In the parietal region of the calvaria, flaps were performed to create a suprapariosteal pouch and implantation of 2 types of resorbable membranes: Marquette and Bio-Gide® membranes. After the surgical procedure, the animals were allocated into 3 randomly selected groups (n = 5) for the period of euthanasia, which occurred at 2, 4 and 6 postoperative weeks. Subsequently, the calvaria areas were removed and stained by H&E and analyzed for periosteum formation, inflammatory infiltrate in the area of membrane insertion, membrane degradation/resorption, and perimembrane fibrosis.

Result: A slight inflammatory infiltration occurred around the Bio-Gide® membrane and it underwent resorption during the postoperative period with periosteum reconstruction, predominantly of a fibrous nature. The Marquette membrane also did not trigger an important inflammatory reaction. However, there was no significant resorption during the period; there was also significant formation of fibrous capsule surrounding the entire membrane area.

Conclusion: The Marquette membrane produces tissue isolation reaction, minimizing periosteal formation while not providing its degradation.

KEYWORDS: Guided bone regeneration. Biomaterials. Tissue reaction. Tissue biocompatibility.

¹Instituto Presbiteriano Mackenzie, São Paulo, SP, Brasil;

²Hospital Jesus Pequeno, Bezerros, PE, Brasil;

³Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil;

⁴Universidade De Tours, Tours, França.

Conflito de interesse: Nenhum | Financiamento: Em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de financiamento 001 | Recebido em: 17/07/2024 | Aceito em: 22/10/2024 | Correspondência: josemaelfilho@gmail.com | Editor Associada: Carmen Australia Paredes Marcondes Ribas

Como citar:

Ribas-Filho JO, Lourenço ES, Figueiredo F, dos Santos OC, de Araújo SO, Maldonado IL, Giovanini AF. Cicatrização de defeitos periostais na calvária entre dois tipos de membranas produzidas por meio de bioengenharia: estudo em coelhos. BioSCIENCE. 2024;82:e0068

INTRODUÇÃO

A bioengenharia tecidual, constitui a área da medicina regenerativa que visa o desenvolvimento, produção e o aperfeiçoamento de novos biomateriais que possam incitar diferenciação e a atividade hemostática celular e tissular regenerativa. É parte integrante da medicina regenerativa que o processo reparativo ocorra de forma mais rápida, ao mesmo tempo que não incitem reação imunitária ou degradação dos tecidos circunjacentes.¹

Todas as propriedades citadas sobre a bioengenharia tecidual, tem como objetivo principal, constituir abordagem terapêutica essencial na prática cirúrgica que propõe solucionar consequências cirúrgicas de deformidades de alguns órgãos e loci teciduais perdidos por traumas, cistos ou ressecções tumorais.²

Particularmente no que tange à ortopedia e cirurgia bucomaxilofacial, diversos biomateriais são avaliados à fim de permitir que células osteoprogenitoras possam se proliferar e migrar para a região do defeito ósseo ao mesmo tempo em que protejam os loci ósseo contra a migração de contingente celular não osteogênico, minimizando complicações reparadoras, como, por exemplo, deiscências e fenestrações ósseas. Esse efeito é conhecido por regeneração óssea guiada (ROG).^{3,4}

Assim, inúmeros biomateriais vêm sendo testados para a ROG e alguns aplicados frequentemente na terapêutica dos distúrbios que levam à perda óssea. Dentre eles, as membranas confeccionadas a partir de politetrafluoretileno expandido (e-PTFE), parece exibir boa propriedade biológica quanto à proteção à migração local de células não osteogênicas ao local a ser regenerado, e apresenta, também, facilidade de manipulação clínica. Todavia, apresentam a obrigatoriedade de segunda intervenção cirúrgica para sua remoção do leito cirúrgico receptor, condição que proporciona maior morbidade ao paciente. Por essa razão, biomateriais poliméricos que sejam absorvíveis pelo tecido receptor sem perder a propriedade de ROG, vem sendo desenvolvido e testado principalmente em modelos animais.⁵

Entre esses materiais com propriedades reabsorptivas, as membranas confeccionadas a base de colágeno parecem possuir, em tese, ampla aceitação para uso clínico; contudo, apresentam como desvantagem a sua origem heteróloga, sendo obtidas, invariavelmente a partir de tecido dérmico de suínos, motivo pelo qual podem proporcionar resposta inflamatória exacerbada e reação à corpo estranho do organismo hospedeiro.⁶ Nesse contexto, processamentos que gerem o aprimoramento físico e químico de membranas de colágeno tornam-se grande desafio e podem ser considerados como processo chave na bioengenharia das ROG.^{7,8}

Assim, este estudo teve por objetivo desenvolver um biomaterial gelatinoso produzido a partir de membrana de colágeno suíno modificado quimicamente e confeccionado através de impressão 3D. Ainda, objetivou-se avaliar histologicamente

suas propriedades, funcionais quanto à barreira física, biocompatibilidade e atividade peristal perimembranar, RTO comparando-a a uma membrana colagenosa comercial.

MÉTODO

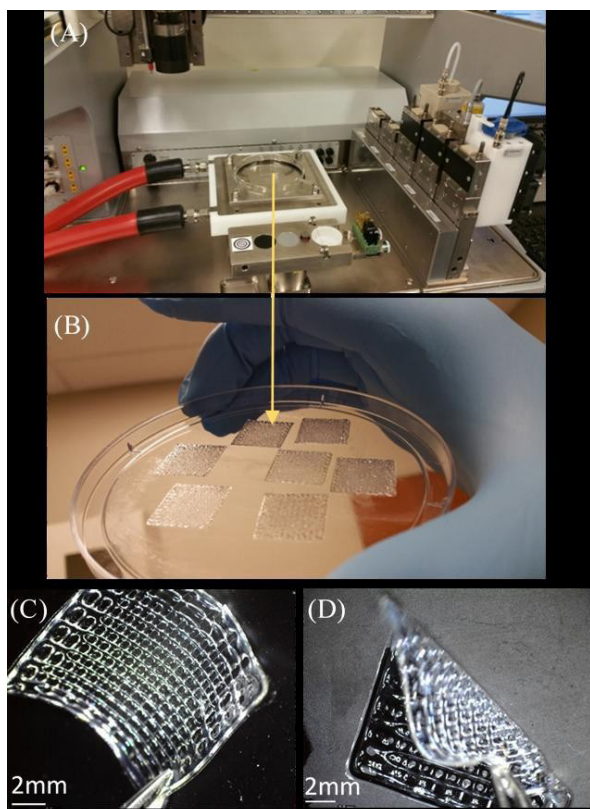
Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná, Curitiba, PR, Brasil no. CAAE 1782/2017.

Foram selecionadas 15 coelhas brancas da raça Nova Zelândia, com idade entre 180-300 dias, sem doenças prévias e com peso entre 2800-3500 g. Os animais foram acondicionados em biotério durante toda a duração do experimento e tratados conforme os preceitos de ética no estudo dos animais.

A membrana a ser testada foi produzida pela Faculdade de Odontologia da Universidade de Marquette, na cidade de Milwaukee, Estados Unidos e desenvolvida pelos Instituto de Engenharia Biomédica, do Departamento de Ciências da Engenharia, Universidade de Oxford e Faculdade de Odontologia da Universidade de Marquette, na cidade de Milwaukee. Tayebi et al.⁹ foram os que a idealizaram e construíram a membrana denominada aqui de "Marquette" (Figura 1). A membrana confeccionada a base de gelatina tipo A foi proveniente da derme suína espessa, e teve como manufatura a sementeira através de encapsulação de células, produzindo protótipos de scaffolds carregados, processo este que pôde ser alcançado utilizando gelatina metacrilada (gelMA) e ligação cruzada por proteínas enzimáticas. Desta forma a membrana de gelatina final foi estruturada de forma a ser multilamelar e que cada lâmina desta estrutura final apresentasse porosidades multidirecionais à fim de que criasse um "scaffold" que facilitasse a migração celular de forma multidirecional. A hipótese dessa propriedade morfológica da membrana visou criar estrutura organizada em forma de scaffold a fim de permitir o crescimento e migração simultânea de diferentes tipos celulares em cada face membranar.

Ainda, após a solidificação do scaffold original o material foi submetido à criação de ligações cruzadas covalentes, van der Waals e dipolo-dipolo induzidas por imersão em 12 mg/ml de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e 1,5 mg/ml N-hidroxissuccinimida (NHS) em 90% solução de etanol por 4 h. Para remover o agente tóxico do residual do processo de reticulação, os scaffolds foram embebidos por 3 h consecutivas em 1 L de água deionizada, a qual foi trocada a cada hora. Após este processo, a desidratação foi realizada usando cadeia ascendente de etanol 50, 70 e 90% e armazenados em solução com 90% etanol em freezer a -20°C até o momento do seu uso clínico, quando foram reidratados em cadeia descendente de etanol e cuidadosamente lavados em água deionizada.

A membrana Bio-Gide® foi escolhida como membrana controle devido sua vasta literatura associada à ROG e por já estar liberada para comercialização a vários anos.



Fonte: Tayebi et al.9

FIGURA 1 — Processo de fabricação da membrana Marquette: A) impressora 3D; B) imagens macroscópicas dos "scaffolds" fabricados impressos em 3D imediatamente após a impressão; C e D) após a reticulação

Procedimento cirúrgico

Ele foi realizado por um único cirurgião para minimizar os efeitos de viés operador dependente. Os animais foram anestesiados por meio da administração de solução estéril de cloridrato de cetamina 5% via intramuscular na proporção de 60 mg/kg e relaxante muscular cloridrato xilazina 2% via intramuscular na proporção de 10 mg/kg. Após a anestesia, foi realizada tricotomia na área de interesse cirúrgico, antisepsia com iodopolividona a 10% (PVPI) degermante e tópico.

Dois retalhos trapezoidais superficiais foram criados para acesso na calvária utilizando lâmina de bisturi no. 11 com aproximadamente 1 cm de aresta ao longo da calvária. Manteve-se a base de maior comprimento para possibilitar melhor a vascularização dos retalhos.

Com auxílio de régua milimetrada áreas parietais foram demarcadas, delineadas e medindo 4,0 mm². Nas áreas previamente demarcadas, foram criadas defeitos superficiais, denominados de bolsas supraparietais em cada região parietal (direita e esquerda de cada animal), através da divulsão dos tecidos superficiais do perióstio com tesoura (Figura 2A). As bolsas, à direita, foram preenchidas com membrana Marquette (Figura 2B) e à esquerda com Bio-Gide (Figura 2C), e a sutura realizada em plano único com náilon 4-0.

Após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram transferidos para a sala de recuperação de procedimentos operatórios e, em seguida, mantidos no biotério nas mesmas condições do pré-operatório. Para

fins de analgesia, foi administrado cloridrato de tramadol na dose de 5 mg/kg durante 7 dias, via intramuscular. Para fins de profilaxia antimicrobiana, foi administrado amoxicilina tri-hidratada na proporção de 20 mg/kg em dose única.

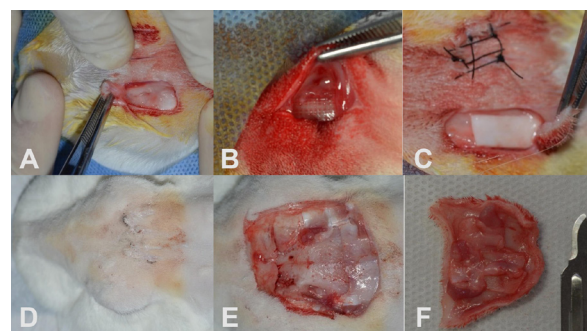


FIGURA 2 — A) Retalho na calvária e divulsão dos tecidos; B) membrana Marquette; C) membrana Bio-Gide; D) aspecto da cicatrização em 6 semanas; E) remoção da peça anatômica; F) peça anatômica no momento da eutanásia

As eutanásias foram realizadas randomicamente (n = 5) nos períodos de 2, 4 e 6 semanas pós-operatórias, através da administração de pentobarbital 100 mg/kg via intravenosa. Constatado o óbito, a região de interesse foi removida e acondicionada em solução de formalina 10% e encaminhados ao estudo histológico.

Procedimentos histológicos e histomorfométricos

Após eutanásia, a porção do crânio contendo a pele e as áreas com membrana foram cuidadosamente removidas, deixando o perióstio intacto e cobrindo os fragmentos de membrana situados nos defeitos da calvária (Figuras 2E e 2F). Das amostras foram obtidos cortes seriados longitudinais a sutura sagital, e de cada fragmento embocado, foram obtidos 4 cortes seriados de 5 mm, estendidos em lâmina de vidro e corados com H&E.

Análise das peças

A análise histológica foi realizada por microscopia convencional e de luz para medir o diâmetro das peças e averiguar presença de área de membrana remanescente e de fibrose perimembranar, grau de fibrose. Para delineamento da mensuração, um único histologista que não conhecia previamente o grupo a que pertencia cada espécime observado, realizou a avaliação microscópica e as medidas histopatológicas de cada espécime. Todas as imagens foram obtidas com câmera digital com resolução de 300 dpi acoplada a microscópio de luz com aumento original de $\times 40$. Produziu-se assim imagem virtual de 110,12 $\times$ 76,17 cm. Imagem digital composta de toda a área foi contada manualmente. Para tanto, com auxílio do software Image J (US National Institutes of Health) delineou-se o perímetro externo e interno da membrana, contabilizou a fibrose presentes em toda a área de interesse. Imagem de lâmina de 1000 μ m foi usada para calibrar todas as mensurações. Média das 3 medições para cada parâmetro foi calculada para cada amostra.

Dados, como infiltrado neutrofílico (agudo) e mononuclear (crônico), foram quantificados por escores

determinados com base nas células contabilizados na área perimembranar da seguinte forma: negativo = de 0-1%; positivo += entre 1-25%; positivo ++= entre 25-50%; e positivo +++= maior que 50%.

Análise estatística

Cada parâmetro foi avaliado dentro do período de monitoramento. A análise de Shapiro-Wilk foi utilizada para determinar a normalidade, seguida do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para averiguar diferenças significativas entre os grupos. Valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Nenhum dos animais que fizeram parte deste estudo apresentaram deiscência dos pontos em pós-operatório. Como não havia exposição das membranas, todos os espécimes foram considerados viáveis para avaliação. As feridas e os animais foram tratados até o momento de eutanásia, as quais ocorreram em 2, 4 e 6 semanas do pós-operatório.

Análise histológica

Membrana Marquette

Em 2 semanas foi verificado fragmento de pele com derme reticular e derme papilar com aspectos normais, composto por tecido fibroconjuntivo denso, pelos quais permeavam glândulas sebáceas e folículos pilosos. Na derme reticular profunda verificou-se a presença da membrana exógena íntegra, sem áreas sugestivas de degradação e invasão de tecido conjuntivo no interior da membrana. Periféricamente identificou-se discreta área de periósteo de aspecto fibroso, e áreas focais de processo inflamatório crônico de aspecto linfoplasmocitário periféricamente. Não foi observada áreas de células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho, e a fibrose perimembranar foi discreta (Figura 3).

Em 4 semanas pós-operatório, notou-se que o quadro histológico apresentavam características histológicas similares que foi observado em 2 semanas. No entanto, A derme reticular apresentava maior área de fibrose, com tecido fibroconjuntivo denso, multidirecional/caótico condizente com área de fibrose cicatricial. A fibrose cicatricial observada também coincidia com áreas de perda de tecido glandular, em especial de as de padrão sudoríparo, e folículos pilosos. Na derme reticular profunda, a matriz membranosa foi evidente. A membrana ainda se apresenta compacta, desprovida de tecido conjuntivo intramembranar ou áreas de penetração de tecido conjuntivo. Ainda, regiões intramembranares compatíveis com angiogênese ou presença de sítios de reabsorção não foram detectadas. Notava-se periféricamente, tecido conjuntivo denso, com quadro de fibrose (Figura 3B), e área discreta de periósteo fibroso, composto por poucas células fusiformes, compatível com fibroblastos.

Em 6 semanas a matriz membranosa permanecia evidente, íntegra, compacta com ausências de áreas sugestivas de reabsorção, migração de tecido conjuntivo ao interior membranar ou áreas de angiogênese. Periféricamente, tecido firoconjuntivo denso, aumento

de área de fibrose, composto por intensa deposição de colágeno com poucas células fusiformes (Figura 3C).

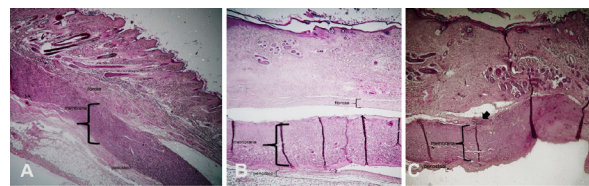


FIGURA 3 — Aspecto histológico pós-operatório da membrana Marquette e tecido conjuntivo em: A) 2 semanas (seta aponta foco discreto de processo inflamatório perimembranar); B) 4 semanas, com cápsula de tecido conjuntivo destacada como fibrose; C) 6 semanas, com cápsula de tecido conjuntivo destacada como fibrose

Membrana Bio-Gide

Na 2ª. semana de análise foi verificado fragmento de pele com derme reticular e derme papilar com aspecto normais. A derme foi composta por tecido fibroconjuntivo denso, pelos quais permeavam glândulas sebáceas e folículos pilosos sem alterações histológicas. Na derme profunda identificou-se membrana exógena íntegra, sem áreas sugestivas de degradação membranar e invasão de tecido conjuntivo no interior da membrana. Periféricamente identificava-se discreta área de periósteo de aspecto fibroso e áreas focais de processo inflamatório crônico de aspecto linfoplasmocitário periféricamente. Não foi observada áreas de células gigantes multinucleadas e a fibrose perimembranar foi moderada (Figura 4A).

Na 4ª. semana, o aspecto histológico revelou fragmento de pele com derme reticular e derme papilar com aspecto usuais, composto por tecido conjuntivo pelos quais permeavam glândulas sebáceas e folículos pilosos. Na derme profunda verificava-se membrana exógena com evidentes áreas de reabsorção (seta negra), ainda com remanescente de membrana em dissolução no interior de áreas sugestivas de degradação (seta azul). Evidenciava-se invasão de tecido conjuntivo entre as áreas, sítios de reabsorção de membrana, pelo qual verificou-se local de tecido de granulação de aspecto discreto e área de remodelação em periósteo fibroso foi verificado (Figura 4B).

Na 6ª. semana o aspecto histológico demonstrou que a derme reticular e a derme papilar mostravam-se com aspecto fibróticos, compostas por tecido conjuntivo denso não modelado de aspecto cicatricial. Na derme profunda verificava-se remanescente de membrana Bio-Gide com intensa área de reabsorção (seta negra), pela qual circundavam tecido conjuntivo com angiogênese e presença de células gigantes tipo corpo estranho. Na face profunda do remanescente da membrana, verificava-se tecido sugestivo de periósteo, com reorganização em porção fibrosa e áreas sugestivas de periósteo osteogênico.

Avaliação quantitativa (Tabelas 1 e 2)

Para análise quantitativa os parâmetros área de membrana remanescente e áreas de fibrose periosteal foram mensuradas em mm².

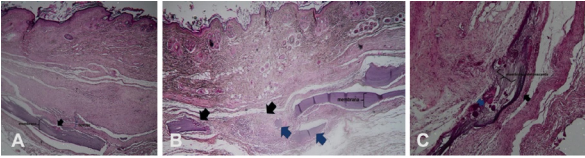


FIGURA 4 — Membrana Bio-Gide: A) demonstra segmento de pele, onde na derme profunda identifica-se membrana com áreas de reabsorção (seta) e fibrose circunjacente em 2 semanas; B) verificam-se áreas de reabsorção evidente (setas negras) e remanescente membrana (seta azul) em 4 semanas; C) remanescente de membrana verificando-se áreas de reabsorção e reentrância de tecido conjuntivo nas áreas de degradação do Bio-Gide (seta azul), e área de periósteo osteogênico, revelados por seta negra em 6 semanas.

TABELA 1 — Mediana da área em mm², valores mínimos e máximos, da presença de membrana e fibrose

	Período	Membrana		p
		Marquette	Bio-Gide	
Área de membrana	2 semanas	4,03 (4,01 – 4,07)	5,03 (5,12 – 5,00)	p=0,06
	4 semanas	3,41 (3,28 – 3,63)	5,01 (5,32 – 4,89)	p=0,02
	6 semanas	1,26 (1,42 – 0,96)	4,93 (5,02 – 4,79)	p=0,0004
Fibrose	2 semanas	1,26 (1,11 – 1,42)	1,13 (1,08 – 1,32)	p=0,09
	4 semanas	3,26 (3,08 – 3,39)	1,45 (1,08 – 1,32)	p=0,006
	6 semanas	4,61 (4,44 – 4,69)	2,18 (2,15 – 2,31)	p=0,002

TABELA 2 — Revela escore do processo inflamatório na área perimembranar

	Período	Membrana	
		Marquette	Bio-Gide
Processo inflamatório agudo (neutrófilico)	2 semanas	-	+
	4 semanas	-	-
	6 semanas	-	-
Processo inflamatório crônico	2 semanas	+	+
	4 semanas	-	++
	6 semanas	-	++

DISCUSSÃO

Nos procedimentos de RTG utilizam-se diversas membranas, como por exemplo as de base de colágeno,¹⁰ com o intuito de impedir a migração de células epiteliais e derivadas do tecido conjuntivas para o interior do defeito, permitindo assim que células com potencial regenerativo, provenientes da área que cerceiam o periósteo e células endósteas, repovoe a região. Entretanto, para que uma membrana possa ser aplicada em RTG e obtenha sucesso, ela deve permitir a adesão, migração, proliferação e diferenciação celular, além de não proporcionar efeitos deletérios às células com as quais entrará em contato.¹¹

Assim, para iniciar o processo de regeneração, o conteúdo celular, primeiramente, deve se aderir ao substrato membranar, para que em seguida ocorram os eventos de proliferação e diferenciação celular.¹² Evidências na literatura demonstram que a adesão celular sobre a superfície dos biomateriais é mediada por proteínas adsorvidas em sua superfície.^{13,14} Esta absorção, por sua vez, está relacionada à química, à topografia, e a energia de superfície do material.¹⁵

Conforme já relatado anteriormente, a proposta deste trabalho foi avaliar a integração de uma membrana teste produzida através de bioimpressão 3D com os tecidos biológicos adjacentes e propor a sua utilização dentro da RTG. Segundo a literatura consultada, as vantagens deste biomaterial seriam a maior facilidade de produção em série com custo menor e maior disponibilidade de confecção em diferentes formatos.^{9,16-18}

Os resultados desejados seriam a eficácia clínica e biocompatibilidade tão boa quanto àquela conseguida pelas outras membranas já disponíveis no mercado e cuja utilização em RTG já é descrita na literatura. A reação de corpo estranho é algo que normalmente ocorre no emprego de membranas ou demais materiais no meio biológico, sendo o grau de resposta dependente do tipo de material, quantidade e do modo de fabricação.^{19,20}

Quando se comparam as 2 membranas estudadas após 2 semanas, já é possível observar certo grau de reabsorção da membrana Bio-Gide, e praticamente nenhuma alteração na Marquette foi identificada.

Evidências substanciais parecem ser delineadas em 4 semanas quando se compara a Bio-Gide e a Marquette. Na Marquette foi identificado exuberante tecido fibroconjuntivo denso, caracterizado como fibrose e evidente encapsulamento de toda a área de membrana, sem evidente degradação da mesma, situação que permaneceu sine qua non a avaliação histológica no período de 6 semanas pós-operatórias.

Estes resultados podem ser considerados como esperados, uma vez que encapsulamento e a resposta de corpo estranho sempre ocorrem, variando os graus de intensidade. A membrana teste (Marquette) mostrou-se ser de material menos reabsorvível quando comparado à de controle. É relevante ressaltar que o processo de degradação é processo complexo. Grizzi, Garreau e Vert²¹ usando diferentes placas de polímero polilactídeo amorfo, observaram que o processo de degradação membranar ocorre de forma heterogênea, e agrega a informação de que a adsorção do polímero ocorre centrifugamente, i.e., ocorre de forma mais intensa no centro quando comparado à superfície, quando em contato com o meio aquoso, em tecido mesenquimais, como ocorreu no presente estudo. O padrão químico da degradação inicia-se por meio de hidrólise e consequentemente clivagem das ligações ésteres, induzindo decréscimo da massa molar membranar diminuindo a estequiometria e volume da membrana inserida.

Lam et al.²² confirmaram essa hipótese ao mostrarem que membranas não porosas de poliglicanos degradam mais rapidamente do que as porosas, pois no caso das membranas não porosas o efeito autocatalítico é favorecido enquanto para nas porosas ocorre a facilidade na dissolução dos produtos intrínsecos à membrana. É provável que a degradação ocorra na superfície devido ao gradiente de absorção de água, mas pode se dissolver mais facilmente no centro quando comparado com os locais distantes do centro da membrana e todo esse efeito parece ser simultâneo à concentração de grupos finais carbonila, os quais aumentam no centro e passam a catalisar o processo degradativo. Essa teoria pode ser sugerida na membrana Bio-Gide, a qual mostrou padrão centrífugo de degradação

e explica em parte a falta de degradação na membrana Marquette, a qual apresenta-se de caráter porosa.

É sobrepujante dizer que o processo de degradação hidrolítica pode proporcionar a redução da massa molar, perda de tensão e perda de massa, simultaneamente. Neste contexto, primeiramente a água infiltra pelo polímero e compromete a integridade de suas cadeias poliméricas causando cisão por hidrólise e a degradação do polímero. Este fenômeno é de crucial importância, pois determina o tipo e a intensidade da resposta biológica ao biomaterial implantado, pois a ocorrência de partículas poli, oligo e monoméricas liberadas durante a degradação do polímero in vivo está diretamente correlacionada com mudança no tipo e intensidade da resposta inflamatória.

Além disso, a própria fagocitose dos fragmentos remanescentes, também atua como importante fator na modificação da resposta inflamatória. A fagocitose modifica o processo funcional do macrófago, que é o pivô na resposta inflamatória no tecido e na reação de corpo estranho. As células gigantes observadas nesta fase são formadas pela fusão de macrófagos. A fagocitose de fragmentos também pode causar morte celular e a liberação do conteúdo destas células mortas pode causar reação inflamatória aguda.²² É importante destacar, que a medida em que ocorre, o quadro inflamatório contribui para a formação do tecido de granulação na área inflamada e secreção de citocinas VEGF, e TGF-1 e, em conjunto, proporcionam anfigênese e formação neovascular na área a ser regenerada, bem como atuam na diferenciação celular, a qual inclui a área periosteal. Essas teorias criam explicação plausível, para o desenvolvimento e reparo perimembranar à medida em que a membrana se dissolve.

Diferentemente dessas perspectivas, a degradação e reação imune não foi observada na membrana Marquette. O fenômeno da falta de reação imune não é clara. Contudo, segundo Takata, Wang e Miyauchi²³ a baixa adesão celular sobre uma membrana, pode estar relacionada à sua reduzida capacidade de adsorver proteínas, ao seu baixo grau de hidratação e à sua topografia.

Interessante, a membrana Marquette é polimérica desenvolvida a partir de um gel de gelatina, proteína comumente solúvel obtida a partir da hidrólise parcial do colágeno. Para sua obtenção, inicialmente, foi realizado pré-tratamento químico com rompimentos das ligações não-covalentes, condição que favorece a desorganização da estrutura macromolecular e rompimento das pontes de hidrogênio. Essa última situação proporciona desestabilidade na tripla hélice proteica, mas com a capacidade de produzir géis estáveis em temperaturas abaixo de 40 °C - como ocorre na temperatura corpórea -, sendo que este gel é termorreversível. Por estar completamente desnaturada, a gelatina pode apresentar-se como agente emulsificante.²⁴

A emulsificação é processo químico onde transforma agente polar em apolar. Esse fenômeno proporciona um núcleo hidrofóbico o qual repulsa eletricamente a água da área membranar, minimizando o fenômeno de hidrólise.²⁴

Associado a este processo, deve-se ressaltar que os compostos gelatinosos são materiais muito biocompatíveis, impedindo adesão de proteínas do sistema complemento, condição sine qua non para atração de processo

inflamatório local. Talvez essa condição, bem como seu armazenamento e a porosidade possam ter influenciado o resultado neste estudo, uma vez que o processo inflamatório e a degradação (hidrolítica) foram minimizadas.

Essas condições tornam a membrana Marquette, insuficiente para RTO, uma vez que impede o desenvolvimento para a formação periosteal, e há necessidade de sua remoção cirúrgica, o que aumenta a morbidade.

CONCLUSÃO

O menor grau de fibrose ao redor da membrana e maior taxa de reabsorção foi encontrada na Bio-Gide. Portanto, nas condições reproduzidas neste estudo, a membrana Marquette não se mostrou superior no ponto de vista de biocompatibilidade e de absorção. Fator que pode estar associado a este resultado é a arquitetura do scaffold, pois o tamanho e a direção das suas porosidades afetam diretamente a migração e interação celular da região devido à particularidade que cada tecido possui, como os tipos de células, pH ou suprimento sanguíneo.

Contribuição dos autores

Conceituação: Josemael de Oliveira Ribas Filho

Análise formal: Elora Sampaio Lourenço

Investigação: Fernanda Piraja Figueiredo

Metodologia: Sandra Oliveira de Araújo

Administração do projeto: Oscar Capistrano dos Santos

Supervisão: Igor Lima Maldonado

Redação (revisão e edição): Allan Fernando Giovanini

REFERÊNCIAS

1. Drago J, Choi JY, Lieberman JR, Huang J, Zuk PA, Zhang J, et al. Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat. *J Orthop Res*. 2003;21(4):622-9. [https://doi.org/10.1016/S0736-0266\(02\)00238-3](https://doi.org/10.1016/S0736-0266(02)00238-3)
2. Goudy S, Lott D, Burton R, Wheeler J, Canady J. Secondary alveolar bone grafting: outcomes, revisions, and new applications. *Cleft Palate Craniofac J*. 2009;46(6):610-2. <https://doi.org/10.1597/08-126.1>
3. Retzepi M, Lewis MP, Donos N. Effect of diabetes and metabolic control on de novo bone formation following guided bone regeneration. *Clin Oral Implants Res*. 2010;21(1):71-9. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2009.01805.x>
4. Dimitriou R, Mataliotakis GI, Calori GM, Giannoudis PV. The role of barrier membranes for guided bone regeneration and restoration of large bone defects: current experimental and clinical evidence. *BMC Med*. 2012;10:81. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-10-81>
5. Buser D. Vinte Anos de Regeneração óssea guiada na implantodontia. ed. São Paulo: Editora Santos, 2009.
6. Lee DH, Tamura A, Arisaka Y, Seo JH, Yui N. Mechanically Reinforced Gelatin Hydrogels by Introducing Slidable Supramolecular Cross-Linkers. *Polymers (Basel)*. 2019;11(11):1787. <https://doi.org/10.3390/polym11111787>
7. Alqahtani AM. Guided Tissue and Bone Regeneration Membranes: A Review of Biomaterials and Techniques for Periodontal Treatments. *Polymers (Basel)*. 2023;15(16):3355. <https://doi.org/10.3390/polym15163355>
8. Calciolari E, Corbella S, Gkrani N, Viganó M, Sculean A, Donos N. Efficacy of biomaterials for lateral bone augmentation performed with guided bone regeneration. A network meta-analysis. *Periodontol* 2000. 2023;93(1):77-106. <https://doi.org/10.1111/prd.12531>
9. Tayebi L, Rasouljanboroujeni M, Moharamzadeh K, Almela TKD, Cui Z, Ye H. 3D-printed membrane for guided tissue regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2018;84:148-58. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.11.027>
10. Kamoi K, Iino M, Ishiguro H. Regeneration therapy for oral disease. *Hum Cell*. 2006;19(2):76-82. <https://doi.org/10.1111/j.1749-0774.2006.00012.x>

11. Wang HL, Miyauchi M, Takata T. Initial attachment of osteoblasts to various guided bone regeneration membranes: an in vitro study. *J Periodontal Res.* 2002;37(5):340-4. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0765.2002.01625.x>
12. Grinnell F. Cellular adhesiveness and extracellular substrata. *Int Rev Cytol.* 1978;53:65-144. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)62241-x](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)62241-x)
13. Forget G, Latxague L, Héroguez V, Labrugère C, Durrieu MC. RGD nanodomains grafting onto titanium surface. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc.* 2007;2007:5107-10. <https://doi.org/10.1109/IEMBS.2007.4353489>
14. Grafahrend D, Calvet JL, Klinkhammer K, Salber J, Dalton PD, Möller M, et al. Control of protein adsorption on functionalized electrospun fibers. *Biotechnol Bioeng.* 2008;101(3):609-21. <https://doi.org/10.1002/bit.21928>
15. Boyan BD, Hummert TW, Dean DD, Schwartz Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials.* 1996;17(2):137-46. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)85758-9](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)85758-9)
16. Bakarich SE, Gorkin R, Panhuis MIH, Spinks GM. Three-dimensional printing fiber reinforced hydrogel composites. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2014;6(18):15998-6006. <https://doi.org/10.1021/am503878d>
17. Turnbull G, Clarke J, Picard F, Riches P, Jia L, Han F, et al. 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioact Mater.* 2017;3(3):278-314. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.10.001>
18. Maroulakos M, Kamperos G, Tayebi L, Halazonetis D, Ren Y. Applications of 3D printing on craniofacial bone repair: A systematic review. *J Dent.* 2019;80:1-14. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2018.11.004>
19. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol.* 2008;20(2):86-100. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2007.11.004>
20. Sheikh Z, Brooks PJ, Barzilay O, Fine N, Glogauer M. Macrophages, Foreign Body Giant Cells and Their Response to Implantable Biomaterials. *Materials (Basel).* 2015;8(9):5671-701. <https://doi.org/10.3390/ma8095269>
21. Grizzi I, Garreau H, Li S, Vert M. Hydrolytic degradation of devices based on poly(DL-lactic acid) size-dependence. *Biomaterials.* 1995;16(4):305-11. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(95\)93258-f](https://doi.org/10.1016/0142-9612(95)93258-f)
22. Lam KH, Schakenraad JM, Groen H, Esselbrugge H, Dijkstra PJ, Feijen J, et al. The influence of surface morphology and wettability on the inflammatory response against poly(L-lactic acid): a semi-quantitative study with monoclonal antibodies. *J Biomed Mater Res.* 1995;29(8):929-42. <https://doi.org/10.1002/jbm.820290804>
23. Takata T, Wang HL, Miyauchi M. Attachment, proliferation and differentiation of periodontal ligament cells on various guided tissue regeneration membranes. *J Periodontal Res.* 2001;36(5):322-7. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0765.2001.360508.x>
24. 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 Implants Res.* 2005;16(3):369-78. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2005.01108.x>