DANIEL ISAAC SENDYK

Avaliação radiográfica e histológica comparativa entre uma nova membrana eletrofiada de PCL/poli(rotaxona) e uma membrana de colágeno suíno na regeneração óssea guiada de defeito crítico em calvária de ratos Wistar

São Paulo

2014

DANIEL ISAAC SENDYK

Avaliação radiográfica e histológica comparativa entre uma nova membrana eletrofiada de PCL/poli(rotaxona) e uma membrana de colágeno suíno na regeneração óssea guiada de defeito crítico em calvária de ratos Wistar

Versão Corrigida

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

Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofaciais.

Orientador: Profa. Dra. Maria Cristina Zindel Deboni.

São Paulo

2014

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

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

Sendyk, Daniel Isaac.

Avaliação radiográfica e histológica comparativa entre uma nova membrana eletrofiada de PCL/poli(rotaxona) e uma membrana de colágeno suíno na regeneração óssea guiada de defeito crítico em calvária de ratos Wistar / Daniel Isaac Sendyk; orientadora Maria Cristina Zindel Deboni. -- São Paulo, 2014.

59 p. : il. : fig. tab. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofaciais. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Regeneração óssea. 2. Osso e Ossos - Regeneração. 3. Cicatrização. 4. Membranas. 5. Biomateriais. I. Deboni, Maria Cristina Zindel. II. Título.

Sendyk DI. Avaliação radiográfica e histológica comparativa entre uma nova membrana eletrofiada de PCL/poli(rotaxona) e uma membrana de colágeno suíno na regeneração óssea guiada de defeito crítico em calvária de ratos Wistar. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / / 2015

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Aos meus pais, **Susan e Wilson**,

Inspirações da minha vida; vidas das minhas inspirações e cujo amor, amparo e abrigo tornam todos os sonhos possíveis.

Às minhas irmãs, **Michelle e Alessandra**,

Como caçula, foram-me sempre exemplos marcantes de força, dedicação e amor.

Ao meu avô **Marek**,

Entusiasta da minha formação como cirurgião, e cuja paixão pela odontologia, me influenciou profundamente.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Profa. Dra. Maria Cristina Zindel Deboni**, que desde os bancos da graduação, participou da construção de todos os meus projetos. Pela paciência acolhedora com a qual conduziu a orientação deste trabalho, e por ter forjado as bases da minha formação como docente e cirurgião.

À **Profa. Dra. Maria da Graça Naclério-Homem**, que me acolheu na disciplina de Cirurgia, incentivou minha trajetória na pós-graduação, e permitiu-me sonhar com uma carreira universitária.

Ao **Prof. Dr. Marcos Akira D'Ávila**, e sua aluna de doutorado **Tais Helena Costa Salles**, por confiarem ao nosso grupo os testes biológicos para a caracterização da membrana de PCL/poli(rotaxona).

À **Profa. Dra. Luciana Corrêa**, pela dedicação e disponibilidade com a qual nos auxiliou na interpretação das lâminas histológicas.

Ao **Prof. Dr. José Luiz Piratininga**, pela orientação e confiança na condução da clínica de graduação.

Aos professores da disciplina de Cirurgia Odontológica e Bucomaxilofacial **Prof. Dr. Marcos Vianna Gayotto**, **Profa. Dra. Marina Cleia Palo Prado**, **Prof. Dr. Fernando**

Melhem Elias e Profa. Dra. Andréia Aparecida Traina Hanna, por todos os ensinamentos e pelo ambiente profissionalmente privilegiado do qual desfrutamos.

À **Dra. Vera Pozzani**, pelos conselhos, orientações e ensinamentos.

À **Natacha Kalline de Oliveira**, que participou intensamente de todas as etapas deste projeto, e cuja amizade e motivação, foram essenciais para sua concretização.

Aos amigos da pós-graduação, **Daniel Falbo Martins de Souza, Fabiana Ferreira Alves, Mariana Aparecida Brozski, Marcello Roberto Manzi, Matheus Furtado de Carvalho e Rubens Carmino Junior**, pelo companheirismo, amizade e camaradagem com os quais compartilhamos esta trajetória.

À **Danielle Schwartzman**, que muito além de compreender minha ausência, ampara meus revezes, compartilha minha euforia e estimula, de forma incondicional, a construção dos meus sonhos.

Aos amigos de longa data, **Henrique Fukushima, Renan Yudi Kato, Bruno Matuck, Ligia Drovandi Rotundo, Marcos Paulo Daquila Miranda, Karina Novaes, Marcelo Guerra, Fábio Lopes, Camila Gallo Cabral e Rodrigo Flores**, pelas produtivas discussões sobre odontologia e sua inegável influência na minha formação.

Aos familiares cirurgiões dentistas, **Claudio Luiz Sendyk, Eliana Sendyk Masijah e Vanessa Sendyk Masijah**, pelo carinho, estímulo e apoio na nossa convivência.

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia, **Aparecida Conceição de Souza**, **Edison Henrique Vicente**, **Natália Conceição Afonso** e **Roseli de Andrade**, pela dedicação com a qual conduzem as clínicas de graduação, pós graduação e pelo amparo entre tantos relatórios e prazos.

Ao **Serviço de Biblioteca** da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, e em especial a **Glauci Elaine Damasio Fidelis**, pelo cuidado na diagramação e revisão desta dissertação.

À **CAPES**, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, por conceder-me uma bolsa de estudos.

À todas as pessoas que, direta ou indiretamente, ajudaram a construir este trabalho.

*“Quando a mente é ampliada por uma nova ideia, ela nunca retornará
ao seu tamanho original”.*

Oliver Wendell Holmes

RESUMO

Sendyk DI. Avaliação radiográfica e histológica comparativa entre uma nova membrana eletrofiada de PCL/poli(rotaxona) e uma membrana de colágeno suíno na regeneração óssea guiada de defeito crítico em calvária de ratos Wistar [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Corrigida.

Dentre as diversas possibilidades de reconstrução de tecidos ósseos atroficos, a regeneração óssea guiada é uma das mais promissoras. Neste contexto, muitas membranas reabsorvíveis tem sido desenvolvidas e precisam ser testadas como parte de sua caracterização. O objetivo do presente estudo foi avaliar radiográfica e histologicamente em um estudo *in vivo*, se uma nova membrana polimérica eletrofiada de PCL/poli(rotaxona) demonstra comportamento semelhante a uma membrana de colágeno, comercialmente consagrada, quanto à promoção de regeneração óssea guiada. Foi realizado defeito crítico de 8mm de diâmetro na calvária de 60 ratos Wistar machos. Em dois grupos iguais (n=20) os defeitos foram recobertos aleatoriamente por uma membrana de colágeno suíno ou por uma membrana polimérica mista de policaprolactona (PCL) e poli(rotaxona). Em um terceiro grupo (n=20) os defeitos não foram recobertos e permaneceram apenas com o coágulo. Os animais sofreram eutanásia em 7, 14, 21 e 42 dias pós operatórios. Espécimes da região foram radiografadas e preparadas para análise histológica. Radiograficamente, os defeitos recobertos pela membrana de colágeno suíno apresentaram diminuição mais significativa da área radiográfica dos defeitos de acordo com a progressão dos períodos pós-operatórios do que nos outros grupos. A histomorfologia do reparo mostrou agrupamentos mais expressivos de células gigantes no grupo PCL/poli(rotaxona) sugerindo resposta à corpo estranho. Na histomorfometria, a neoformação óssea foi significativamente mais intensa e com osso neoformado mais maduro no grupo Colágeno. Concluímos que para um modelo de regeneração óssea guiada, a membrana de PCL/poli(rotaxona) não superou a membrana de colágeno.

Palavras-chave: Regeneração Óssea. Cicatrização. Ratos Wistar. Membrana. Polímero.

ABSTRACT

Sendyk DI. Radiographic and histological evaluation between a new electrospinning PCL/polyrotaxane membrane and a porcine collagen membranes in a guided bone regeneration model in Wistar rat's critical sized calvaria defects [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Corrigida.

The need to rebuild lost bone tissue, shows up as one of the great challenges of modern dentistry. Among several possibilities, guided bone regeneration is one of the most established techniques. In this context, many resorbable membranes have been developed and need to be tested as part of their characterization. The aim of this study was to evaluate by an *in vivo* model, if a new electrospinning PCL/polyrotaxane polymer membrane promotes similar guided bone regeneration when compared to a collagen membrane. An 8mm diameter critical defect was made in 60 male Wistar rats calvaria. In two equal groups (n = 20) the defects were randomly covered with a porcine collagen or a PCL/polyrotaxane membranes. In a third group (n = 20) the defects remained uncovered and just the blood clot occupied the defect. The animals were euthanized at 7, 14, 21 and 42 days post-operative. Specimens were x-rayed and prepared for histological analysis. Radiographically, the defects covered by porcine collagen membrane, showed more significant reduction in defect area, according to postoperative period evolution. Histomorphology showed intense giant cells presence in the PCL/polyrotaxane group, suggesting a foreign body response. The histomorphometric analysis showed new and mature bone formation more intense in collagen group. Under the limits of this study, the collagen membrane performance in guided tissue regeneration was far superior to the PCL/polyrotaxane membrane.

Key words: Bone regeneration. Wound healing. Wistar rat. Membrane. Polymer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1- Procedimentos cirúrgicos experimentais	34
Figura 4.2- Micrografia eletrônica de varredura apresentando a morfologia das fibras de PCL/poli(rotaxona) eletrofiadas	34
Figura 5.1- Imagem das áreas radiográficas das calvárias dos animais considerando os grupos e períodos de observação	40
Figura 5.2- Gráfico das médias das áreas das imagens radiográficas.....	40
Figura 5.3- Aspectos histológicos do reparo do defeito ósseo – períodos de 7 e 14 dias	44
Figura 5.4- Aspectos histológicos do reparo do defeito ósseo – períodos de 21 e 42 dias	45
Figura 5.5- Aspectos histológicos do reparo do defeito ósseo – período de 42 dias	46
Figura 5.6– Gráfico das médias das áreas de neoformação óssea	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1-	Distribuição das amostras finais nos grupos e períodos experimentais ...	38
Tabela 5.2-	Distribuição dos valores médios $\pm$ desvio-padrão nas mensurações da área radiográfica dos defeitos ósseos comparativamente entre grupos e períodos	39
Tabela 5.3-	Descrição dos aspectos da histomorfologia considerando as variáveis do reparo segundo os grupos e períodos	43
Tabela 5.4-	Dados descritivos em média $\pm$ desvio-padrão da mensuração da área de neoformação óssea comparativamente intergrupos para cada período de observação	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BOC	Enxerto ósseo bovino
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
ePTFE	Politetrafluoretileno expandido.
ICB-USP	Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
PCL	Policaprolactona
PEG	Polietileno glicol
PLA/PGA	Ácido polilático/ ácido poliglicólico
ROG	Regeneração Óssea Guiada
PCL/Protax	policaprolactona/poli(rotaxona)

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento (porcentagem)
>	Maior que
<	Menor que
=	Igual a
≤	Menor que ou igual a
g	Grama
mg	Miligrama
mm ²	Milímetro quadrado
μm ²	Micrômetro quadrado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISTA DA LITERATURA.....	17
2.1 Membranas poliméricas não biodegradáveis	17
2.2 Membranas poliméricas biodegradáveis	19
2.3 Eletrofiação de polímeros	21
2.4 Estudos comparativos entre membranas poliméricas	22
2.5 Polímeros de PCL/poli(rotaxona)	24
2.6 Membranas de colágeno suíno	26
2.7 Defeito crítico e estudos experimentais em animais	27
3 PROPOSIÇÃO	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
5 RESULTADOS	38
6 DISCUSSÃO	49
7 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	54
ANEXO	60

1 INTRODUÇÃO

Com o advento da implantodontia, a necessidade de reconstrução de tecidos ósseos perdidos e atróficos, mostrou-se um dos grandes desafios da odontologia moderna, estimulando pesquisadores a desenvolverem as mais variadas técnicas, afim de transpor esse obstáculo. Dentre as diversas possibilidades, a regeneração óssea guiada, prática periodontal clássica, mostrou-se uma das mais promissoras.

Proposta por Nyman et al. em 1982, seu objetivo é impedir mecanicamente a formação mais rápida do tecido conjuntivo para o interior de um defeito ósseo, facilitando a osteogênese e, naturalmente, a regeneração tecidual. Para obter tal feito, uma série de barreiras biológicas foram propostas, como as clássicas membranas de politetrafluoretileno expandido (ePTFE). Todavia, casos de exposições da barreira podem levar à sua remoção prematura, comprometendo a técnica regenerativa. Ademais, a necessidade de um segundo estágio cirúrgico para sua remoção é um inegável transtorno para o paciente.

Nesse cenário, o avanço da bioengenharia permitiu o desenvolvimento de várias membranas reabsorvíveis, objetivando transpor as limitações das barreiras clássicas e alcançar uma performance clínica ainda mais previsível, segura e menos incômoda ao paciente. Inicialmente, as membranas poliméricas de PLA/PGA mostraram-se tão eficientes quanto as de ePTFE, todavia sua degradação hidrolítica associava-se com a reabsorção de parte do osso regenerado, comprometendo-a (Hurzeler et al., 1997; Becker et al., 2009).

As membranas de colágeno surgiram na literatura como um substituto natural, que promove a integração tecidual e a transposição de nutrientes, porém sua rápida degradação pela atividade enzimática de macrófagos e leucócitos polimorfonucleares, reduzem substancialmente sua resistência ao colapso, necessitando de substitutos ósseos para manter sua posição original (Zitzmann et al., 1997; Sela et al., 2003; Becker et al., 2009).

Assim, em busca de uma membrana ideal, propusemo-nos testar polímeros consagrados na engenharia tecidual, o policaprolactona (PCL) e o poli(rotaxona), por meio de uma blenda polimérica eletrofiada, em um modelo de regeneração óssea guiada, e avaliamos seu comportamento biológico comparativamente a uma membrana de colágeno comercial.

2 REVISTA DA LITERATURA

Os procedimentos de enxertia em defeitos ósseos em dentes com comprometimento periodontal, apresentavam resultados insatisfatórios, devido a rápida invasão epitelial na área do defeito. A regeneração óssea guiada, proposta por Nyman et al. (1982) foi desenvolvida para transpor esse obstáculo. A técnica envolve a adaptação de uma membrana sobre um defeito ósseo afim de proteger o coágulo e criar um espaço isolado, apoiando assim o crescimento de células osteogênicas sem concorrência com outros tecidos, restringindo a entrada do epitélio gengival e tecido conjuntivo (Dahlin et al., 1988; Handelsman; Celetti., 2004; Schwarz et al., 2006).

A consagração da regeneração óssea guiada na literatura clássica e sua previsibilidade, a elevou como técnica padrão para a clínica cirúrgica, quando há a necessidade de criar tecido ósseo em implantes dentais com deiscências (Becker et al., 1991; Schwarz et al., 2006).

A regeneração óssea guiada pode ser obtida pela utilização de barreiras reabsorvíveis ou não-reabsorvíveis, combinada ou não com substitutos ósseos.

2.1 Membranas poliméricas não biodegradáveis

Uma vasta quantidade de estudos clínicos, experimentais e relatos de caso dos últimos 30 anos, demonstraram altas taxas de sucesso com a aplicação de membranas poliméricas para regeneração óssea guiada. A grande maioria desses trabalhos, discutem o uso do politetrafluoretileno expandido (ePTFE), uma membrana não absorvível, utilizada de forma isolada ou em combinação com enxertos ósseos (Rosen; Reynolds, 2001).

Dahlin et al., (1991) realizaram um estudo com pacientes apresentando reabsorção de crista óssea e defeito palatino que poderiam levar a fenestração de um futuro implante. As fenestrações que eram cobertas com uma membrana de ePTFE mostraram quantidade de tecido ósseo neoformado mais significativa

quando comparada a fenestrações contralaterais em que pouco ou nenhuma formação óssea foi notada.

Um estudo multicêntrico empregando implantes colocados em alvéolos após exodontias imediatas em combinação com barreiras de ePTFE mostrou que quando ocorre exposição prematura das membranas e sua remoção antes da reabertura dos implantes, a quantidade de tecido ósseo neoformado é menor do que nos casos onde ela permanece no leito (Becker et al., 1994).

Jovanovic et al., (1992) realizaram um estudo clínico para avaliar o potencial de regeneração óssea da membrana de ePTFE em implantes com deiscência. Dezenove implantes dentários com roscas expostas foram estudados. Três membranas foram expostas e removidas prematuramente. As membranas restantes foram removidas, sem complicações, após 6 meses. Em 14 implantes, as deiscências foram completamente fechadas com osso neoformado; 4 implantes demonstraram preenchimento ósseo parcial e 1 implante apresentou preenchimento parcial com tecido fibroso não mineralizado.

Quatro centros clínicos, utilizando o sistema Branemark, participaram de um estudo prospectivo no qual 55 implantes foram colocados com membranas de ePTFE devido a defeitos ósseos locais, como deiscências e fenestrações. A altura média dos defeitos iniciais foi de 4,7mm. Após o tempo de cura, a altura do defeito remanescente foi para 1,1mm. Houveram exposições prematuras de 6 membranas (Dahlin et al., 1995).

Andersson et al., (1992) mostraram que implantes que tiveram suas roscas expostas e receberam recobrimento por membrana de ePTFE revelaram um ganho de 81% de osso. O completo recobrimento das roscas foi possível quando o tempo de reparo e osseointegração foi isento de complicações (exposição da membrana). O resultado indica que a técnica de regeneração óssea guiada com membranas de ePTFE é altamente eficaz quando livre de complicações.

Augthun et al., (1995) desenvolveram um trabalho no qual 20 implantes foram colocados com membranas de ePTFE em alvéolos de 15 pacientes. Exposição da membrana ocorreu em 10 (66%) pacientes após 6 e 24 semanas. Análise histológica de 15 tecidos removidos mostraram regeneração óssea em 3 pacientes, formação de tecido conjuntivo com tecido ósseo em 8 pacientes, tecido conjuntivo fibroso em 2 pacientes e tecido de granulação inflamatória em outros 2.

Segundo os autores, o alto índice de exposição da membrana em implantes imediatos, deve ser levando em consideração.

2.2 Membranas poliméricas biodegradáveis

A necessidade de um segundo tempo cirúrgico para remoção das membranas não reabsorvíveis, e o elevado índice de exposição das barreiras de ePTFE, levou ao desenvolvimento de membranas absorvíveis que apresentassem a mesma resistência mecânica do polímero não absorvível, com tempo de absorção suficiente para promover neoformação óssea.

Uma técnica regenerativa para defeitos periodontais foi descrita por Simion et al., (1997), na qual o polímero de poli (DL-lactico) foi vertido *in situ* para formar uma barreira personalizada diretamente sobre o enxerto ósseo, resultando em sucesso clínico expressivo. Uma vez que o polímero não se degrada de forma significativa por 5 a 6 meses, os mesmos benefícios de estabilidade do coágulo, manutenção do espaço e exclusão celular podem também ser adquiridos em procedimentos de regeneração óssea guiada com implantes. De acordo com essa possibilidade, uma barreira de ácido polilático/ ácido poliglicólico (PLA/PGA), utilizado em combinação com um enxerto ósseo, revelou-se eficiente no tratamento de deiscências e fenestrações ao redor de implantes .

Um trabalho piloto de Polson et al., (1995) avaliou a regeneração tecidual guiada em defeitos de bifurcações classe II em molares inferiores após o uso de ácido polilático como uma barreira biodegradável. Clinicamente, as barreiras se fragmentaram e se deslocaram em 3 a 6 semanas. A profundidade de sondagem, a localização da margem gengival e do nível de inserção vertical e horizontal, melhoraram clinicamente de forma significativa. Além disso, tecido de granulação substancial, algumas vezes estava presente entre a superfície da barreira e da raiz.

Em um estudo multicêntrico, do mesmo autor (Polson et al., 1996) avaliou-se a regeneração tecidual guiada em defeitos de furca classe II em molares superiores e inferiores usando uma barreira biodegradável de ácido polilático. Após uma fase inicial de higienização, retalhos cirúrgicos foram rebatidos e as raízes foram raspadas e alisadas. O perímetro do defeito foi medido, e uma barreira

personalizada foi aplicada diretamente sobre o osso e o dente que circundam o defeito. Novamente avaliou-se a profundidade de sondagem, localização da margem gengival e nível de inserção vertical e horizontal. Clinicamente, as barreiras se fragmentaram e se deslocaram em 3 a 6 semanas. Tecido de granulação substancial, às vezes era presente entre a superfície da barreira e da raiz. Houve melhora clínica e estatisticamente significativa em todos os parâmetros, em concordância com os seus achados iniciais

Um estudo piloto descreveu uma técnica na qual um polímero de poli (DL-lactido) (AtrisorbTM), foi aplicado *in situ* como uma barreira sobre um enxerto de osso desmineralizado e liofilizado em raízes tratadas com ácido cítrico. No acompanhamento e reentrada cirúrgica após 4,5 meses, ocorreu o recobrimento ósseo das raízes (Rosen et al.,1998). Em continuidade, o grupo de pesquisa utilizou uma membrana do polímero com enxertos de osso desmineralizado e liofilizado, acrescentados de sulfato de cálcio e de tetraciclina em pacientes com lesões de furca. Após as orientações e a prática de higiene oral adequada, as lesões foram tratadas cirurgicamente pela aplicação da membrana e do enxerto. No pós-operatório de 6 meses após a cirurgia, houve aumento significativo dos níveis de inserção e diminuição na profundidade de sondagem. Os resultados sugerem que o uso combinado de enxerto e membranas de poli (DL-lactido) em superfícies radiculares, pode melhorar o prognóstico de dentes com lesões periodontais (Rosen; Reynolds, 1999).

Películas biodegradáveis elaboradas por coagulação de uma solução de poli (DL-lactido) em N-metil-2-pirrolidona em pastilhas de polietileno poroso banhadas em solução salina, foram confeccionadas como um filme semi sólido nas dimensões de 10mm² e implantadas por via subcutânea em coelhos para testar seu efeito biológico como barreiras. O estudo envolveu a análise histológica e cromatográfica para variações de peso, utilizando como controle negativo um filme plástico. O peso molecular do polímero diminuiu a um ritmo relativamente constante, no entanto, não houve nenhuma perda de massa polimérica significativa após o período de observação de 5 meses de sua implantação. Nenhuma diferença histológica foi notada ao redor das barreiras poliméricas e do controle de plástico até 6 meses, quando então houve um ligeiro aumento de células gigantes multinucleadas em torno dos fragmentos dos filmes de polímero. Os autores consideraram a membrana biocompatível (Coonts et al., 1998).

Quanto à resposta à corpo estranho à biomateriais, Ghanaati et al. (2010), avaliando a presença de tamanhos de grânulos de beta tricálcio fosfato, em um estudo *in vivo*, mostrou que ocorreu indução de formação de células gigantes multinucleadas associadas ao biomaterial, e que elas poderiam influenciar a angiogênese por indução de fatores de crescimento do endotélio vascular.

Um estudo avaliou a regeneração óssea guiada ao redor de implantes colocados na maxila atrófica de macacos. Em um lado, os implantes instalados foram associados a uma membrana de ePTFE, como controle, e no outro os implantes foram cobertos com uma membrana polimérica de poli (DL-lactido). Os resultados mostraram que o grupo controle apresentou uma neoformação óssea ao redor dos implantes mais significativa. Os autores acreditam que a degradação hidrolítica do polímero de poli (DL-lactido) está associado com a reabsorção de parte do osso regenerado (Hurzeler et al., 1997).

Um estudo avaliou a regeneração óssea guiada promovida por uma nova membrana a base de estrôncio de hidroxiapatita em pó e misturado com uma solução de gelatina. As membranas foram avaliadas *in vitro* com células da medula óssea de ratos e *in vivo*, em defeitos bilaterais na calvária de ratos, para compará-la à membranas de colágeno. As membranas de hidroxiapatita apresentaram maior elasticidade e resistência mecânica, é biocompatível e em 4 semanas, a microtomografia e a análise histomorfométrica, revelaram uma significativa maior formação óssea, quando comparada ao grupo controle (Hao et al., 2013).

2.3 Eletrofiação de polímeros

Estudos mais atuais têm mostrado que membranas sintetizadas a base de polímeros, formadas a partir de nanofibras, podem ser obtidas por processos de eletrofiação, que facilita a fabricação de suportes ou “scaffolds” fibrosos de biomateriais (Garg; Bawlin, 2011).

A eletrofiação é reconhecida como uma técnica eficiente para a fabricação de nanofibras de polímero, devido à sua versatilidade e potencial para aplicações em diversos campos. Fibras são geradas através da aplicação de um campo

elétrico em uma solução polimérica que apresentam diversas características, como elevada área de superfície em relação ao volume, alta porosidade e a capacidade de manipular a composição de nanofibras, a fim de obter as propriedades e funções desejadas. No campo da engenharia tecidual, o crescimento, proliferação e diferenciação de células mesenquimais humanas em biomateriais, visando aplicações em organismos vivos é um tema de grande relevância clínica com a proposta de recuperar tecidos perdidos. Nesse caso, fibras obtidas por eletrospinning podem ser aplicadas como reforço em matrizes resultando em “*scaffolds*” com propriedades adequadas às aplicações desejadas (Kulkarni et al., 2010; Garg; Bowlin, 2011; Kong; Ziegler, 2014).

Quatro componentes são necessários para o processo: uma fonte de alta tensão; um tubo capilar, que pode ser uma agulha de pequeno diâmetro; uma bomba de infusão; e uma placa coletora aterrada. A alta voltagem é necessária para criar um jato da solução de polímero eletricamente carregado para fora do capilar. O campo elétrico aplicado induz o carregamento sobre a superfície do líquido, que gera um campo de tensões eletrostáticas no fluido, induzindo à formação do jato polimérico. Antes do jato atingir a placa coletora, ocorre a evaporação do solvente e o polímero na forma de fibras é recolhido como uma rede de fibras não-tecido (*non-woven*) (Kulkarni et al., 2010).

2.4 Estudos comparativos entre membranas poliméricas biodegradáveis e não biodegradáveis

Um estudo comparou os efeitos das membranas poliméricas reabsorvíveis e não reabsorvíveis em um modelo experimental de regeneração óssea guiada em calvária de coelhos. Dois parafusos de titânio foram inseridos no osso de cada lado da linha média: sendo um coberto com uma membrana biodegradável (ácido polilático) e o outro por uma membrana não reabsorvível (ePTFE). Após 6 meses a análise histológica mostrou que houve neoformação óssea sob ambas as membranas com nenhum sinal de infecção ou exposição. Houve uma maior quantidade de neoformação e de altura óssea na membrana de ePTFE, o que

sugeriu que as membranas não reabsorvíveis devem ser utilizadas para se obter um maior volume e altura óssea em regeneração tecidual guiada (Ito et al., 2001).

Um trabalho de Gineste et al. (2005), comparou histologicamente três barreiras biodegradáveis: PLA/PGA, copolímero de ácido cítrico e colágeno do tipo-7, para tratamento de deiscências periodontais criadas cirurgicamente em cães. Oito deiscências de três paredes foram criadas nas mandíbulas de seis animais e aleatoriamente designadas para receber as três barreiras. Um defeito foi deixado sem barreira para servir de controle. As análises histomorfométricas após 4 e 12 semanas mostrou que os grupos tratados com membranas apresentaram um aumento estatisticamente significativo de neoformação óssea e inserção conjuntiva, quando comparados com o controle. No entanto, não houve diferença estatística entre as três barreiras.

Os efeitos da regeneração óssea guiada com membrana não reabsorvíveis (ePTFE) e reabsorvíveis (ácido polilático) ao redor de implantes de titânio revestidos com hidroxiapatita e não revestidos foram avaliados em defeitos cirúrgicos de 3mm de altura e largura criados em tíbias de coelhos. As membranas foram colocadas de forma aleatória em ambos os tipos de implante. Após 4 meses, a avaliação histomorfométrica mostrou que a porcentagem média de osseointegração tendia a aumentar nos implantes tratados com hidroxiapatita, independentemente do tipo de membrana (Ito et al., 1998).

Jung et al. (2006) desenvolveram um estudo em coelhos com o objetivo de testar um hidrogel sintético feito de polietileno glicol (PEG) como uma barreira biodegradável para a regeneração óssea guiada, comparativamente a uma membrana não reabsorvível de ePTFE. Quatro defeitos de 6mm de diâmetro foram criados na calvária e aleatoriamente três preenchimentos foram empregados: com hidroxiapatita e tricálcio fosfato cobertos com uma membrana PEG; com hidroxiapatita e tricálcio fosfato cobertos com uma membrana ePTFE; com hidroxiapatita e tricálcio fosfato sem a aplicação da membrana (controle positivo). O quarto defeito foi mantido apenas com coágulo. Após 4 semanas a análise histomorfométrica mostrou valores significativamente maiores de osso neoformado para os dois grupos de membrana, em comparação ao controle positivo. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos que utilizaram membranas.

2.5 Polímeros de PCL e poli(rotaxona)

A literatura é escassa sobre o desenvolvimento de membranas poliméricas eletrofiadas com blendas de PCL/Poli(rotaxano). Os dois polímeros apresentam propriedades importantes à diversas aplicações da área médica, como por exemplo para um sistema de liberação controlada de fármacos, recobrimento de cânulas uretrais e na engenharia tecidual para o crescimento de tecido epidérmico, muscular, ósseo e cartilaginoso (Okumura e Ito 2001; Akari e Ito 2007; Meng et al., 2010; Gautun et al., 2014).

Os polímeros de poli(rotaxona) são um dos tipos de nanomateriais mais intensamente investigados no campo da bioengenharia. Sua estrutura esquemática compreende um eixo linear, sobre o qual se encontram vários anéis de rosca. O nome poli(rotaxona) é derivado de duas palavras latinas: *rota*, que corresponde a roda, e *axis*, que corresponde a eixo (Akari; Ito, 2007). A maioria dos poli(rotaxano)s são obtidos da inserção de ciclodextrina em diferentes cadeias poliméricas, a vantagem da ciclodextrina, é que ela é altamente disponível em grandes quantidades, biodegradável e biocompatível, além disso, já foi descrito efeito ósseo anabólico a partir de seus derivados, característica de extrema importância para engenharia de biomateriais (Garcia-Rio et al., 2014).

O poli(rotaxona) tem sido utilizado em estudos moleculares, para confecção de moléculas biodegradáveis para posterior liberação de fármaco ou ainda preparo de proteínas moleculares impressas no polímero, utilizadas para purificar misturas de proteínas (Guo et al., 2013; Tamura et al., 2013).

Uma revisão apresentou as principais aplicações dos polímeros de poli(rotaxona) na biotecnologia, como distribuição de drogas, de material genético e no campo da engenharia tecidual. Os autores o consideram um biomaterial promissor devido, principalmente, à sua baixa citotoxicidade, seu tamanho controlável e sua arquitetura única (Li; Li, 2011).

Hidrogéis de polietileno glicol reticulados por um poli(rotaxano) hidrolisável contendo partículas de hidroxiapatita foram desenvolvidos como “*scaffolds*” para regeneração óssea. Cinco arcabouços com várias composições de poli(rotaxona), partículas de polietileno glicol e hidroxiapatita, foram preparadas para se analisar a adesão celular de osteoblastos de ratos *in vitro*, mostrando resultados promissores,

e posteriormente, implantadas no subcutâneo de ratos. Quanto a análise histológica, os osteoblastos ficaram dispostos ao longo da superfície do polímero e foi observado tecido osteóide na região, revelando o forte potencial osteocondutor desse polímero (Fujimoto et al., 2005).

O PCL (policaprolactona) é um polímero linear, hidrófobo, e apresenta uma elevada resistência mecânica (Gautam et al., 2013). Devido à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, o PCL é amplamente estudado para aplicação na distribuição de drogas e na engenharia tecidual. A sua compatibilidade com uma vasta gama de fármacos, permite a distribuição uniforme da droga na matriz, e sua degradação à longo prazo, permite a liberação do fármaco por vários meses subsequentes (Gautam et al., 2013).

O objetivo de um estudo realizado por Wu, et al. em 2014, foi desenvolver um “scaffold” biodegradável, biocompatível e com capacidade de osteoindução. Dois tipos de compósitos fibrosos foram produzidos por eletrofiação: colágeno tipo I / poli (ϵ -caprolactona) (COL / PCL) e colágeno tipo I / poli (ϵ -caprolactona) / hidroxiapatita em nanoescala (COL / PCL / ANS). Após um teste de imersão em um fluido corporal simulado, os “scaffolds” foram avaliados em cultura de células e microscopia eletrônica de varredura do ligamento periodontal quanto a adesão e variabilidade de morfologia celular. Os resultados mostraram que as células aderiram a um ou outro tipo de carreador e inicialmente eram ligeiramente fusiformes sendo que gradualmente se tornavam mais achatadas, indicando uma capacidade para preenchimento dos poros das fibras. Ambos os suportes poliméricos promoveram proliferação celular. No entanto, a análise em tempo real da reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa, mostrou que a expressão dos marcadores relacionadas com os ossos, fosfatase alcalina e de osteocalcina, foi regulado positivamente apenas para os “scaffolds” de COL / PCL / nHA-SBF, indicando que este biomaterial demonstrou a capacidade de induzir a diferenciação osteogênica das células do ligamento periodontal.

2.6 Membranas de colágeno suíno

Diversos estudos foram dirigidos, nas últimas duas décadas, para investigar a regeneração óssea guiada promovida por membranas de colágeno suíno, especialmente os tipos I e III. As vantagens desse biomaterial incluem função hemostática, permitindo uma estabilização precoce da ferida, propriedade quimiotáticas para atrair fibroblastos e semipermeabilidade, facilitando a transferência de nutrientes (Postlethwaite et al., 1978; Schwarz et al., 2007). Todavia, as membranas de colágeno possuem uma rápida biodegradação por atividade enzimática de macrófagos, leucócitos polimorfonucleares e bactérias periodontopatogênicas, resultando em uma pobre resistência mecânica ao colapso (Rothamel et al., 2005; Becker et al., 2009). Por essa razão, as membranas de colágeno são usualmente utilizadas conjugadas a material de enxertia, o que garante suporte a membrana, preservando a sua posição original (Zitzmann et al., 1997; Becker et al., 2009).

Sela et al. (2003), propuseram um estudo para avaliar a degradação enzimática de bactérias periodontais patogênicas em membranas de colágeno comercialmente consagradas. A rápida degradação pela atividade enzimática de macrófagos e leucócitos polimorfonucleares, *P. Gingivallis* e *T. denticola* reduzem substancialmente sua resistência ao colapso.

Para avaliar a degradação precoce de membranas de colágeno quando expostas ao meio bucal, um grupo de pesquisadores realizou 24 perfurações e 24 retalhos no palato de 8 gatos. Discos de membranas de colágeno reticuladas e não reticuladas foram colocadas ou sob as perfurações (experimental) ou cobertas pelo retalho (controle), e distribuídas aleatoriamente. Nenhuma das membranas mostrou-se resistente à degradação quando expostas ao ambiente bucal (Tal et al., 2008).

A utilização de membranas de colágeno absorvíveis sobre enxerto ósseo autógeno em bloco intra oral associada a osso bovino inorgânico particulado sobre defeito ósseo localizado, em maxila, tanto em região anterior quanto posterior em pacientes adultos candidatos a realizar implantes dentários mostrou que pode ocorrer um aumento de 34,28% de formação óssea (Proussaefs; Lozada, 2003).

Um estudo prospectivo clínico avaliou a longo prazo, o resultado de implantes colocados simultaneamente com a regeneração óssea guiada (ROG) utilizando membranas reabsorvíveis e não-reabsorvíveis. Durante os procedimentos de colocação dos implantes, foram utilizadas membranas de colágeno (CM) ou de politetrafluoretileno expandido (e-PTFE) combinadas com osso desmineralizado bovino (DBBM). Um grupo de pacientes serviu como controle, nos quais os implantes estavam totalmente circundados por osso sem a necessidade de quaisquer procedimentos de regeneração óssea guiada. Análises clínicas e radiográficas demonstraram que após um período de 12-14 anos, a diferença da taxa de sobrevivência entre os grupos membrana e controle não foram estatisticamente significativas e ficaram em índices acima de 91%. Assim, a instalação de implantes simultaneamente aos procedimentos de ROG, é uma terapia previsível e segura (Jung et al., 2013).

Schwarz et al. (2008) realizaram um estudo com defeitos ósseos em cães após instalação de implantes osseointegrados para avaliar o padrão de expressão imunohistoquímica da regeneração óssea guiada (ROG), utilizando diferentes tipos de membranas com enxerto ósseo (BOC) em combinação com membranas de colágeno naturais, reticuladas, reforçada com titânio, de politetrafluoretileno expandido (ePTFE), ou BOC sozinho. Após 1, 2, 4, 6, 9 e 12 semanas de reparação tecidual submersa, blocos dissecados das regiões implante/membrana mostraram que a angiogênese, reatividade de antígeno para osteocalcina e formação de novo osso, surgiram a partir da medula óssea e invadiram as áreas deiscentes ao longo da superfície do implante e enxerto. Um aumento significativo de contato osso/implante foi observado em todos os grupos. Todas as membranas investigadas promoveram regeneração em um nível equivalente.

2.7 Defeitos críticos e estudos experimentais em animais

Defeito crítico, é a ferida de menor tamanho possível, que não possui capacidade natural de reparo durante o tempo de vida normal de um animal (Schmitz; Hollinger, 1986). O defeito crítico não possui a capacidade de regeneração espontânea assim algum tipo de intervenção terapêutica como a

aplicação de enxerto ósseo autógeno é necessária para que o reparo ocorra (Spicer et al., 2012).

A reparação de um defeito ósseo tem início nas bordas da ferida, que se tornam mais espessas com a formação de osso lamelar para o centro do defeito. Todavia, o processo de reparo em um defeito crítico ósseo não evolui para o centro da ferida, e a formação de tecido conjuntivo fibroso ocupa o lugar que a neoformação óssea deveria ocupar (Schmitz; Hollinger, 1986).

Além das dimensões outros fatores podem interferir com a quantidade e a qualidade da reparação. Dentre eles podemos descrever a localização anatômica do defeito e a mobilidade das bordas da ferida óssea. Por exemplo, pequenas movimentações de fragmentos ósseos ou do biomaterial enxertado, quando submetidos a cargas mecânicas, podem levar ao insucesso da reparação (Carter et al., 1988; Gomes; Fernandes, 2011). Além disso, a estrutura interna do tecido ósseo, o suprimento sanguíneo, o envolvimento do osso cortical e a presença ou ausência do periósteo também pode interferir com a reparação tecidual óssea (Schmitz; Hollinger, 1986).

Apesar de controverso na atualidade os modelos animais ainda são necessários para o estudo de biomateriais antes de ensaios clínicos. Ratos, camundongos, coelhos, cachorros, porcos, ovelhas e cabras, são exemplos de espécies consagradas na literatura como modelos experimentais. Os roedores, todavia, são os que mais têm sido utilizados nas pesquisas sobre reparação tecidual óssea por apresentar fácil reprodutibilidade, disponibilidade além de um custo acessível (Spicer et al., 2012).

A calvária do rato mostra-se como um modelo adequado para a avaliação da regeneração óssea orientada por biomateriais ou substâncias provenientes de bioengenharia (Schmitz; Hollinger, 1986; Gomes; Fernandes, 2011). A estrutura da calvária permite a realização de um defeito padronizado, reprodutível e que pode ser avaliado facilmente por meio de exames de imagens e análises histológicas. Sua localização anatômica oferece um campo visual satisfatório para o acesso cirúrgico e do manejo operatório. A dura-máter e a camada subcutânea fornecem suporte mecânico adequado para os materiais ali implantados, dispensando a necessidade de fixações. A calvária do rato permite a comparação entre as diversas substâncias que podem ser enxertadas em um modelo de defeito ósseo crítico, com o objetivo de avaliar o reparo de lesões extensas. Esse modelo

entretanto não é adequado para a avaliação da resposta de biomateriais frente a cargas mecânicas (Gomes; Fernandes, 2011).

O diâmetro ideal para ser considerado um defeito ósseo crítico em calvária de ratos é ainda muito discutido pela literatura (Schmitz; Hollinger, 1986). Alguns autores divergem entre 5, 6 ou 8mm de diâmetro sendo que os defeitos ósseos de 5 e 6 podem ser considerados semicríticos e os de 8mm são críticos (Schmitz; Hollinger, 1986; Efeoglu et al., 2009; Gomes; Fernandes, 2011; Spicer et al., 2012).

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar radiográfica e histologicamente em um estudo *in vivo* se uma nova membrana polimérica eletrofiada de PCL/poli(rotaxona) demonstra comportamento semelhante a uma membrana de colágeno, comercialmente consagrada, quanto à promoção de regeneração óssea guiada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (Anexo A) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo sob o protocolo nº 20 de 2013, estando de acordo com os princípios éticos de experimentação animal estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Os animais utilizados nesse estudo foram aclimatizados e mantidos no biotério do Laboratório de Biologia Oral do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Todos os procedimentos cirúrgicos experimentais foram realizados no Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia, Prótese e Traumatologia Maxilofaciais da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

As radiografias das calvárias foram realizadas no Laboratório de Radiologia da disciplina de Radiologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. O preparo e as análises histológicas foram processadas junto ao Laboratório de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Geral do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

4.1 Material

Setenta (70) ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos, com peso entre duzentos e duzentos e cinquenta gramas (200g – 250g), e idade aproximada de quarenta e cinco (45) dias provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB – USP) foram selecionados para o estudo. Durante todo o período da pesquisa, os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno ventiladas, forradas com maravalha de madeira esterilizada, com ciclo dia/noite de 12/12 horas e alimentados com ração para roedores (Labina for Rodents - Purina®) e água *ad libitum*.

4.2 Métodos

4.2.1 Procedimentos cirúrgicos

Após a pesagem de cada um dos animais, para o cálculo da dose referente aos medicamentos de sedação, anestesia, analgesia e antibioticoterapia, os mesmos foram mantidos em gaiolas individuais e separados dos demais para realização da anestesia. Cada animal foi anestesiado isoladamente, visando à redução do estresse aos demais animais que seriam submetidos ao mesmo procedimento. A anestesia geral foi obtida pela injeção por via intramuscular, na pata traseira direita de cada animal, do anestésico de cloridrato de ketamina (Dopalen® - Vetbrands) na dose de 0,8mg/kg de peso do animal associado ao relaxante muscular cloridrato de xilazina (Rompum® - Bayer AS) na dose de 0,3mg/kg de peso. Profilaxia antibiótica foi realizada por via intramuscular com benzilpenicilina benzatina (Roche®) na dose 150.000 UI/kg.

4.2.1.1 Descrição da técnica cirúrgica

Os animais foram posicionados sobre a bancada e após tricotomia, antissepsia com digluconato de clorexidina a 2% e isolamento por meio de campos estéreis foram realizados.

Uma incisão retilínea foi praticada na região mediana do crânio de cada animal com cerca de dois centímetros, estendendo-se da região nasofrontal até a protuberância occipital. A pele, o tecido subcutâneo, o músculo temporal e o periósteo foram divulsionados até a completa exposição dos ossos parietais. Em seguida, o defeito ósseo foi realizado com uma broca trefina em aço de 8mm de diâmetro (Sistemas de Implantes Nacionais - SIN®), adaptada a um contra-ângulo em motor de baixa rotação (Driller®) e irrigação constante com soro fisiológico a 0,9% (Figura 4.1).

Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos. No grupo PCL/Protax (n=20) o defeito crítico foi recoberto por uma membrana eletrofiada de PCL/poli(rotaxona) produzida, experimentalmente, pela Faculdade de Engenharia Mecânica (Departamento de Engenharia de Materiais - UNICAMP), Campinas (SP), Brasil. No grupo Colágeno (n=20), o defeito foi recoberto por uma membrana de colágeno suíno (BioGideTM) e no grupo Controle (n=20) o defeito crítico foi mantido apenas por coágulo sem recobrimento por membranas.

Por fim, realizou-se a síntese da pele com fio de sutura de seda 3-0 (Ethicon®).

4.2.2 Preparo das membranas eletrofiadas de PCL/poli(rotaxona)

A membrana de PCL/poli(rotaxona) é uma blenda polimérica (mistura física de dois ou mais polímeros) composto pela poli (ϵ – caprolactona) ou PCL e pelo poli(rotaxano). A poli (ϵ – caprolactona) é um polímero da classe dos poliésteres alifáticos. O poli(rotaxano) um polímero complexo obtido a partir de macromoléculas de ciclodextrinas, foi fornecido pela UBE Latin America Serviços Ltda (SeRM A1000). Foram misturadas soluções de clorofórmio (Merck-Alemanha), acetona (Synth-Brasil), PCL e posteriormente o poli(rotaxano) e agitadas (Agitador Nova Ética, Modelo 114), durante 2 horas a 23 °C. As blendas foram eletrofiadas a partir de método usual preconizado pelo Departamento de Materiais da Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Estadual de Campinas (Salles et al. 2014). Uma seringa de 10 mL e agulhas com 0,7 mm de diâmetro, com uma bomba de infusão (kdScientific, Modelo KDS-100), uma fonte de alta tensão (Testtech) e uma placa coletora aterrada foi utilizada para a eletrofiação. A solução obtida acima foi eletrofiada a uma tensão positiva de 15 e 20 kV e vazão de 5mL/h. A imagem da microscopia eletrônica de varredura (MEV) da membrana está representada pela figura 4.2. Após a obtenção das membranas, as mesmas foram esterilizadas por meio de Radiação Gama no Instituto de Pesquisas em Energia Nuclear (IPEN) – São Paulo, Brasil.

Figura 4.1 - Procedimentos cirúrgicos experimentais. **A:** Incisão na região mediana do crânio. **B:** Divulsão dos tecidos por planos. **C:** confecção de um defeito ósseo com uma broca trefina de 8mm. **D:** Remoção do fragmento ósseo. **E:** Colocação da membrana de PCL/poli(rotaxona). **F:** sutura

Figura 4.2 - Micrografia eletrônica de varredura apresentando a morfologia das fibras de PCL/poli(rotaxona) eletrofiadas em 5ml/h.

4.2.3 Pós operatório

Cinco animais de cada grupo sofreram eutanásia em câmara de CO₂ nos períodos de 7, 14, 21 e 42 dias pós operatórios. Após a eutanásia, os crânios foram dissecados e espécimes da calvária contendo as regiões dos defeitos foram fixados em formol a 10% para os procedimentos de radiografias e preparo histológico.

4.2.4 Radiografias dos espécimes

Previamente ao processamento laboratorial para análise histológica, todas as peças cirúrgicas foram radiografadas. As imagens radiográficas foram obtidas em filme odontológico periapical (Kodak Insight™ – Eastman Kodak Company – EUA) empregados em aparelho de raios X odontológico modelo Timex 70E - Gnatus®. Para padronização das imagens radiográficas, as amostras de todos os grupos e períodos foram posicionadas da mesma maneira sobre o filme radiográfico periapical, com auxílio de um suporte confeccionado com cera utilidade, tipo cefalostato, em uma distância focal de 4,5 cm e tempo de exposição radiográfica de 3,2 segundos.

A revelação de todas as películas radiográficas foi realizada em conjunto, na Câmara Escura da Disciplina de Radiologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, seguindo critérios estabelecidos de tempo e temperatura.

A análise radiográfica consistirá da mensuração da área e perímetro dos defeitos ósseos por meio de um software específico para interpretação de imagens (ImajeJ®). A análise das imagens foi realizada por um único observador de forma cega.

4.2.5 Processamento das amostras

Após a fixação das peças cirúrgicas em solução de formol tamponado a 10% por quarenta e oito (48) horas, os crânios foram imersos em solução de EDTA 10% (pH 7,4) durante 6 semanas para descalcificação do tecido ósseo.

A região da ferida foi seccionada ao meio, exatamente no plano sagital mediano da calvária do rato, resultando em duas partes da ferida: o lado esquerdo e o direito. Cada lado da ferida foi incluído em parafina e, posteriormente, dois cortes parassagitais foram realizados com espessura de 4,5µm e submetidos à coloração de Hematoxilina-Eosina (HE).

A análise histológica se constituiu de quatro cortes histológicos de cada animal onde foram observados os aspectos morfológicos de toda a extensão do defeito nas regiões de bordas e central de cada lado da ferida.

4.2.5.1 Análise histomorfológica

Os cortes histológicos foram analisados por microscópio de luz convencional (Olimpus™ CH2 – Olympus Optical Co. Ltd – Japan), sob foco fixo e clareza de campo, com aumento final de 400X.

A análise dos aspectos histomorfológicos do reparo ósseo foi realizada por um patologista de forma cega considerando a presença das seguintes características do reparo: infiltrado neutrofílico e linfocitário, presença de material exógeno, edema, necrose, presença de tecido de granulação, áreas de hemorragia, presença de células gigantes, osteoclastos, tecido osteóide e neoformação óssea. Os parâmetros descritos anteriormente foram ponderados por meio de uma escala arbitrária classificada de zero a quatro (0 = ausente; 1 = pouco; 2 = moderado; 3 = intenso e 4 = muito intenso).

4.2.5.2 *Análise histomorfométrica*

A metodologia de estudo histomorfométrico foi realizada de forma que cada corte histológico da ferida fosse dividido em três regiões de observação: anterior (próxima ao osso nasal), centro e posterior da ferida (próxima ao osso occipital).

Imagens de cada região do corte histológico (aumento de 400x) foram obtidas por meio de uma câmera tipo CCD (Sony®) acoplada a um microscópio (Jeol®) e uma placa de digitalização de imagens (Captivator®). Em seguida, essas imagens foram transferidas para um software de morfometria digital (ImageLab 2000®).

Por meio das ferramentas disponíveis no software, as regiões correspondentes às trabéculas ósseas neoformadas nas regiões anterior, central e posterior foram delineadas por meio da ferramenta “desenho em cada um dos quatro (4) cortes histológicos de cada lâmina, permitindo estimar a evolução do reparo pela medida da área da neoformação óssea.

A quantidade de tecido ósseo neoformado foi obtido pela soma das áreas de neoformação óssea dos lados direito e esquerdo da ferida nos quatro (4) cortes das regiões anterior, central e posterior de cada lâmina.

4.2.6 *Análise estatística*

Foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk para se determinar se o conjunto dos dados obtidos pelas mensurações de área do defeito nas radiografias e os dados da histomorfologia e histomorfometria apresentavam distribuição normal ou não. Os dados apresentaram padrões não paramétricos e os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney foram aplicados utilizando o programa estatístico BIOSTAT 5.0. O nível de significância foi considerado quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Do total inicial de 70 ratos, oito (8) morreram no dia seguinte ao procedimento cirúrgico experimental e dois (2) no momento da anestesia. A amostra final foi constituída de 60 animais, distribuídos em três grupos (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 – Distribuição das amostras finais nos grupos e períodos experimentais.

Grupo	7 dias	14 dias	21 dias	42 dias
Colágeno	4	5	5	5
PCL/Protax.	4	5	7	5
Controle	5	5	5	5

No período pré-operatório, o peso dos animais em todos os grupos, variou de 240g a 250g e, no dia da eutanásia, variou de 260g a 320g. Nenhum animal mostrou sinais de infecção na região da ferida cirúrgica. Todas feridas se encontravam limpas, e a pele da região da incisão não apresentava deiscências visíveis ou exposição da membrana ao meio externo.

5.1 Análise das Imagens Radiográficas

A tabela 5.2 apresenta a comparação entre as áreas dos defeitos ósseos nos três grupos experimentais. A figura 5.1 apresenta as imagens radiográficas das calvárias obtidas dos animais considerando os grupos e períodos de observação. e, a figura 5.2 apresenta um gráfico para ilustrar a diminuição da área do defeito. Para os valores da média do defeito ósseo e o correspondente desvio padrão, apresentados na tabela 5.2 e no figura 5.2, foi utilizada a unidade de medida pixel/mm², disponível no software de análise.

Tabela 5.2 - Distribuição dos valores médios $\pm$ desvio-padrão das mensurações da área radiográfica dos defeitos ósseos comparativamente entre grupos e períodos.
N= 60 (mm²)

Grupo	Período	n	Média $\pm$ DP (mm ²)	(p)
Colágeno	7d	4	54,03 $\pm$ 6,79	0,16
PCL/Protax.		4	52,89 $\pm$ 2,05	
Controle		5	56,44 $\pm$ 1.31	
Colágeno	14d	5	48,20 $\pm$ 4,49	0,20
PCL/Protax.		5	52,72 $\pm$ 7,34	
Controle		5	54,55 $\pm$ 4,39	
Colágeno	21d	5	44,67 $\pm$ 3,62	0,01
PCL/Protax		7	51,34 $\pm$ 3,56	
Controle		5	52,95 $\pm$ 3,06	
Colágeno	42d	5	38,97 $\pm$ 4,02	0,006
PCL/Protax.		5	46,63 $\pm$ 4,99	
Controle		5	53,20 $\pm$ 2,09	

Teste de Kruskal-Wallis. Significância $p \leq 0,05$.

Figura 5.1- Média das áreas da imagem das radiográficas dos defeitos das calvárias dos animais considerando os grupos e períodos de observação.

Figura 5.2- Médias e desvio-padrão (mm²) das áreas da imagem radiográfica do defeito nos diferentes períodos experimentais. Teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Significante quando $p < 0,05$. **A** = estatisticamente diferente em relação ao Grupo Colágeno em cada período experimental.

5.2 Análise Histomorfológica

Período de 7 dias

Tanto o grupo Colágeno quanto o grupo PCL/Protax apresentaram um infiltrado neutrofílico e linfocitário mais intenso quando comparados ao controle. Entre si, o grupo Colágeno apresentou uma atividade neutrofílica mais expressiva ($p=0,03$). A presença de osteoclastos foi ligeiramente mais intensa mas não significativa nos grupos Colágeno e Controle. Houve diferença significativa entre os grupos Colágeno e Controle para a formação de tecido de granulação ($p=0,01$). Houve semelhança de resultados para necrose, e neoformação óssea e células gigantes. Figura 5.3 A, B e C.

Período de 14 dias

A presença de células gigantes foi mais intensa no grupo PCL/Protax e significativa ($p=0,009$). O processo inflamatório no grupo Colágeno e PCL/Protax manteve-se moderado, com redução da intensidade comparativamente ao período anterior. As áreas de necrose, tecido de granulação e hemorragia foram similares em todos os grupos. O grupo Colágeno apresentou uma atividade osteoclástica mais intensa, bem como áreas de neoformação óssea e tecido osteóide mas não significativo. Figura 5.3 D, E e F.

Período de 21 dias

Houve uma redução no processo inflamatório em todos os grupos. A presença de células gigantes foi mais intensa e significativa para o grupo PCL/Protax ($p=0,009$). As áreas de necrose, tecido de granulação e hemorragia foram similares em todos os grupos. Houve uma atividade osteoclástica ligeiramente maior no grupo Controle. E houve áreas de neoformação óssea e tecido osteóide mais significativas no grupo Colágeno ($p=0,01$). Figura 5.4 A, B e C.

Período de 42 dias

A presença de células gigantes foi intensa e significativa ($p=0,01$) no grupo PCL/Protax. A atividade osteoclástica foi significativamente maior para o grupo Controle ($p=0,02$). A formação de tecido osteóide e neoformação de tecido ósseo maduro foi mais expressiva para os grupo Colágeno ($p=0,01$). O infiltrado inflamatório, as áreas de hemorragia, necrose e tecido de granulação, foram similares em todos os grupos. As figura 5.4 D, E e F mostram estes aspectos. As diferenças mais marcantes do reparo ocorrido em 42 dias nos grupos Colágeno e PCL/Protax estão apresentadas na figura 5.5 A e B.

Tabela 5.3. Distribuição das medianas (valor Máximo-Mínimo) quanto aos grupos e períodos dos escores quanto aos critérios utilizados na histomorfologia do reparo.

	Neutrófilos	Linfócitos	Material Exógeno	Edema	Necrose	Tec. Granulação	Hemorragia	Células Gigantes	Osteoclasto	Tecido Osteóide	Osso neoformado
Colágeno											
7d	3 (6-1)	1 (2-0)	4 (4-4)	1(2-0)	1(2-0)	2(2-1)	1(3-0)	3(3-0)	3(4-1)	1(2-1)	1(2-1)
14d	1(2-0)	1(1-0)	4(4-4)	0(1-0)	0(0-0)	2(3-1)	1(1-0)	0(1-0)	1(2-1)	2(2-1)	3(3-2)
21d	1(2-1)	1(2-1)	4(4-4)	0(1-0)	0(0-0)	1(1-1)	0(1-0)	0(2-0)	1(2-1)	2(3-2)	3(4-2)
42d	1(1-1)	1(2-1)	4(4-4)	0(0-0)	0(0-0)	1(1-0)	0(1-0)	0(0-0)	1(1-0)	3(4-3)	3(4-3)
PCL/Protax											
7d	1(2-0)	1(2-1)	4(4-4)	1(1-1)	1(1-0)	3(3-2)	2(3-1)	1(3-1)	1(3-1)	1(2-1)	1(1-1)
14d	1(3-1)	1(2-1)	4(4-4)	1(1-1)	0(1-0)	2(3-1)	1(3-1)	3(3-2)	1(1-1)	2(2-1)	2(2-2)
21d	1(1-1)	1(2-1)	4(4-4)	1(1-1)	0(0-0)	1(1-1)	0(2-0)	4(4-3)	1(3-1)	1(1-1)	1(2-1)
42d	1(1-1)	1(2-1)	4(4-4)	0(1-0)	0(0-0)	1(2-1)	1(2-0)	3(3-2)	1(2-1)	1(1-1)	1(2-1)
Controle											
7d	1(2-1)	1(1-1)	0(0-0)	2(2-1)	1(1-0)	3.5(4-3)	3(3-2)	0.5(1-0)	3(3-3)	1(1-1)	1(2-1)
14d	1(3-1)	1.5(2-1)	0(0-0)	2(2-1)	0(0-0)	2(3-1)	2(3-2)	1.5(2-0)	1(1-1)	2(2-1)	2(2-1)
21d	1(1-1)	1(1-1)	0(0-0)	1(1-1)	0(1-0)	1(1-1)	3(3-3)	1.5(2-0)	2.5(3-2)	2(2-1)	2(2-1)
42d	1(1-1)	1(2-1)	0(0-0)	0(2-0)	0(0-0)	1(2-1)	2.5(3-2)	1(2-0)	2(3-2)	1.5(2-1)	1.5(2-1)

Figura 5.3- Aspecto histológico do reparo do defeito ósseo: Período de 7 dias, em **A** grupo Colágeno mostra maior infiltrado inflamatório neutrofílico (asterisco); em **B** Grupo PCL/Protax apresentou maior quantidade de tecido de granulação (seta); em **C** grupo Controle, organização do tecido de granulação (seta). Período de 14 dias, em **D** grupo Colágeno mostra áreas de tecido osteóide (asteriscos); em **E** grupo PCL/Protax neoformação óssea (seta); em **F** grupo Controle com área de formação óssea (seta). Hematoxilina e eosina, aumento original objetiva 2,5X

Figura 5.4- Aspecto histológico do reparo do defeito ósseo: Período de 21 dias, em **A** grupo Colágeno mostra neoformação de tecido osteóide (seta); em **B** Grupo PCL/Protax apresentou formação de tecido ósseo (asterisco) e agrupamento de células gigantes (seta); em **C** grupo Controle, tecido ósseo neoformado (seta). Período de 42 dias, em **D** grupo Colágeno mostra intensas áreas de tecido osteóide (seta) e osso maduro (asterisco); em **E** grupo PCL/Protax mostra agrupamentos de células gigantes (seta) e neoformação óssea (asterisco); em **F** grupo Controle com neoformação óssea (seta). Hematoxilina e eosina, aumento original, objetiva 2,5X.

Figura 5.5- Aspecto histológico do reparo do defeito ósseo: Período de 42 dias, em **A** grupo Colágeno mostra interface membrana (seta) / tecido ósseo neoformado (asterisco) ; em **B** Grupo PCL/Protax mostra interface membrana (seta) / tecido ósseo neoformado (asterisco) e agrupamentos de células gigantes (seta descontinua). Hematoxilina e eosina, aumento original, objetiva 40X.

5.3 Análise Histomorfométrica

As médias das áreas de neoformação óssea mensurada nos cortes das três áreas do defeito (anterior, central e posterior) em mm² estão apresentados na tabela 5.4. Os dados foram comparados intergrupos. A figura 5.6 apresenta um gráfico para ilustrar as diferenças da neoformação óssea.

Tabela 5.4 – Dados descritivos em média $\pm$ desvio padrão da mensuração da área de neoformação óssea (mm²), comparativamente intergrupos para cada período de observação.

Grupo	Período	n	Média $\pm$ DP (mm ²)	(p)
Col. Suin.	7d	4	6.555.174 $\pm$ 2.211.985	< 0.0001
PCL/Protax.		4	2.388.630 $\pm$ 1.682.431	
Controle		5	2.002.248 $\pm$ 1.546.855	
Col. Suin.	14d	5	23.531.780 $\pm$ 7.903.867	< 0.0001
PCL/Protax.		5	4.284.823 $\pm$ 1.720.451	
Controle		5	3.781.093 $\pm$ 848.838	
Col. Suin.	21d	5	57.560.558 $\pm$ 6.914.596	< 0.0001
PCL/Protax.		7	6.283.293 $\pm$ 1.720.541	
Controle		5	4.327.812 $\pm$ 1.039.345	
Col. Suin.	42d	5	92.776.242 $\pm$ 27.735.363	< 0.0001
PCL/Protax.		5	29.586.218 $\pm$ 11.846.547	
Controle		5	34.352.947 $\pm$ 14.205.839	

Teste de Kruskal-Wallis. Significância $p \leq 0,05$.

Figura 5.6 – Distribuição das médias e desvio padrão das áreas totais de neoformação óssea em μm^2 . Teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Significante quando $p < 0,05$. **A** = estatisticamente diferente em relação ao Grupo Colágeno em cada período experimental.

6 DISCUSSÃO

Polímeros reabsorvíveis e sua aplicação em modelos de regeneração óssea guiada, têm sido sistematicamente estudados e analisados na literatura científica. A biocompatibilidade, resistência mecânica adequada e um período de reabsorção suficiente e controlado, tem conduzido vários centros de pesquisa a buscar o desenvolvimento de uma membrana polimérica ideal (Hao et al., 2013). A fabricação nacional destes biomateriais, entretanto, ainda é incipiente, o que vem estimulando pesquisadores brasileiros a procurarem formas de produção mais simples e de menor custo.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária preconiza para qualquer produto de uso biológico no Brasil, diversas avaliações *in vitro* e *in vivo* pré-clínicas como parte da caracterização de biomateriais antes de ensaios clínicos e de sua produção em larga escala e comercialização. A presente pesquisa integra uma parte inicial dos estudos e testes preliminares necessários para se caracterizar uma nova membrana de PCL/poli(rotaxona) produzida experimentalmente pelo Departamento de Engenharia de Materiais da Faculdade de Engenharia Mecânica da UNICAMP.

Todos os testes biológicos executados tem o objetivo de, a partir de seus resultados, verificar a viabilidade de utilização de um biomaterial ou propor alterações a engenharia de materiais para o seu aprimoramento e customização para aplicações clínicas ideais. Neste estudo a membrana foi empregada isoladamente porque o objetivo era testá-la comparativamente a uma membrana de um polímero natural sem a interferência do efeito de outros substitutos ósseos.

A confecção de defeitos ósseos em calvárias de ratos Wistar é um modelo de estudo clássico na literatura, devido à sua fácil reprodutibilidade e padronização experimental. As dimensões do defeito ósseo, para que este possa ser considerado crítico, foi tema controverso entre vários autores de estudos em animais. (Schmitz; Hollinger, 1986; Efeoglu et al., 2009; Gomes; Fernandes, 2011; Spicer et al., 2012). Optamos pelo defeito de 8mm de diâmetro, pois a literatura aponta sua incapacidade de neoformação óssea total no período observacional de 42 dias .

As cirurgias experimentais, todavia, não estão isentas de deficiências e fragilidades inerentes à técnica, como deiscências de sutura, infecções e, em especial, as exposições da membrana, que tanto nas poliméricas, quanto nas colagênicas, pode levar a um comprometimento significativo do resultado final (Tal et

al., 2008; Becker et al., 2009). Neste estudo apesar de todos os cuidados com a cadeia de antissepsia e com a técnica cirúrgica, não podemos negar que pequenas deiscências de sutura, imperceptíveis pelos operadores, possam ter acontecido e levado a exposições mínimas da membrana o que poderia explicar parcialmente a resposta a corpo estranho mais prolongada no grupo da membrana PCL/Protax.

Os três tipos de análise, radiográfica histomorfológica e histomorfométrica mostraram resultados coerentes e que se completaram. Os resultados das análises e interpretações radiográficas mostram que o grupo Colágeno apresentou uma redução mais acentuada nos valores de área, sendo estatisticamente significativa para os períodos de 21 e 42 dias, o que corroborou com os achados histológicos. Todavia, cabe salientar que a imagem radiográfica isoladamente é um método subjetivo e limitado para se avaliar a neoformação óssea. A radiografia mostra uma imagem bidimensional, sujeita a distorção e sobreposições de imagens. Com o advento das microtomografias, provavelmente será possível identificar com mais precisão o padrão de neoformação óssea nesse defeitos (Schortinghuis et al., 2003).

A avaliação histomorfológica mostrou que o osso neoformado em todos os grupos estava maduro, organizado e exibiu trabéculas coalescentes. Em 7 e 14 dias, o grupo Colágeno apresentou um infiltrado inflamatório mais intenso, que reduz a partir de 21 dias e neoformação óssea expressiva em todos os períodos. Em 14, 21 e 42 dias, encontrou-se no grupo PCL/Protax uma intensa atividade de células gigantes, que sugere uma reação de corpo estranho.

Em todos os períodos experimentais, remanescentes das duas membranas foram encontrados, o que está de acordo com a literatura, na qual material exógeno é observado nos diversos períodos de avaliação (Polimeni et al., 2008). Os resultados histomorfométricos mostraram que o grupo Colágeno apresentou um maior volume de osso neoformado com relação aos outros grupos, sendo essa diferença estatisticamente significativa para todos os períodos experimentais. Além disso, a análise histológica nos permitiu observar que o reparo ósseo ocorreu de forma centrípeta, ou seja, das bordas para o centro da ferida. Foi interessante notar, que apesar de haver uma maior neoformação óssea no período observacional de 42 dias, a formação óssea foi maior entre 7 e 14 dias, do que entre 21 e 42 dias, mostrando que em um defeito crítico, o crescimento ósseo tende a estabilizar-se.

Apesar das limitações das interpretações radiográficas, em conjunto com a histomorfometria e a histomorfologia, obtivemos uma complementação de análises, reduzindo erros inerentes à subjetividade das avaliações.

Verificamos que os dados comparativos entre os grupos Controle e PCL/Protax foram muito próximos, e portanto, a membrana de PCL/poli(rotaxona) não promoveu uma regeneração óssea guiada expressiva. Em outras palavras, a membrana de PCL/poli(rotaxona) promoveu a regeneração óssea guiada de forma significativamente inferior quando comparada a uma membrana de colágeno.

Além disso, notamos que agrupamentos de células gigantes foram encontradas de forma mais intensa no grupo PCL/Protax. A permanência de células gigantes em um estágio tardio do reparo, podem levantar a hipótese de uma resposta individualizada da espécie dos animais pelo próprio tipo de polímero utilizado. As nanopartículas de sua formação e a porosidade da membrana provavelmente devem ser fatores influenciam uma resposta inflamatória crônica maior.

Em um primeiro momento, esta reação à corpo estranho poderia ser considerada como um resultado negativo quanto a biocompatibilidade dessa membrana. Alguns autores como Ghanaati et al. (2010) demonstraram que o papel da reação à corpo estranho para biomateriais, deve ser reconsiderado, uma vez que a presença de células gigantes com características histoquímicas específicas, poderiam estar relacionadas a um estímulo para a formação vascular. Observamos que nos cortes histológicos da membrana de PCL/poli(rotaxona) parece ter ocorrido um aumento da vascularização. Entretanto, este fato não foi objeto de análise neste estudo, mas poderia ser uma proposição futura a utilização de marcadores histoquímicos e imunohistoquímicos que possam comprovar estes achados.

A literatura sobre a utilização de uma membrana polimérica sintética eletrofiada de PCL/Protax para propósitos de regeneração óssea é inexistente. Assim, os dados originais obtidos aqui não devem desencorajar a bioengenharia, mas sim estimular que os estudos avancem para o aprimoramento das características desses e de novos polímeros. Naturalmente, estudos *in vitro* serão necessários para complementar e nossos resultados e suplantam dúvidas quanto ao verdadeiro efeito biológico do comportamento da membrana de PCL/poli(rotaxona) e sua biocompatibilidade com células ósseas e/ou com outras linhagens celulares específicas do reparo.

As membranas eletrofiadas de PCL/poli(rotaxona) no modelo proposto podem não ter demonstrado um desempenho efetivo para a terapia da regeneração óssea guiada quando empregada isoladamente. Todavia, melhorias quanto a padronização na sua produção ou quanto a sua estrutura física, poderiam leva-la a ser estudada como arcabouço biomimético ou como carreadora de outras substâncias promotoras de regeneração óssea guiada.

7 CONCLUSÃO

Nos limites desse estudo, podemos concluir que para um modelo de regeneração óssea guiada, a membrana de PCL/poli(rotaxona) não superou a membrana de colágeno.

REFERÊNCIAS¹

Akari J, Ito K. Recent advances in the preparation of cyclodextrin-based polyrotaxanes and their application to soft materials. *Soft Matter*. 2007;3, 1456-1473.

Andersson B, Odman P, Widmark G, Wass A. Anterior tooth replacement with implants in patients with a narrow alveolar ridge form. A clinical study using guided tissue regeneration. *Clin Oral Implants Res*. 1993 Jun;4(2):90-8.

Augthun M, Yildirim M, Spiekerman H, Biesterfeld S. Healing bone defects in combination with immediate implants using the membrane technique. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1995 Jul-Aug;10(4):421-8.

Becker W, Becker B, Handelsman M, Ochsenbein C, Albrektsson T. Guided tissue regeneration for implants placed into extraction sockets. A study in dogs. *Journal Periodontol*. 1991 Nov;62(11):703-9.

Becker W, Dahlin C, Becker BE, Lekholm U, Van Steenberghe D, Higuchi K, Kultje C. The use of e-PTFE barrier membranes for bone promotion around titanium implants placed into extraction sockets: a prospective multicenter study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1994 Jan;9(1):31-40.

Becker J, Al-Nawas B, Klein MO, Schliephake H, Terheyden H, Schwarz F. Use of a new cross-linked colagens membrane for the treatment of dehiscence-type defects at titanium implants: a prospective, randomized-controlled double-blinded clinical multicenter study. *Clin Oral Implants Res*. 2009 Jul;20(7):742-9.

Carter D, Beaupre G, Giori N, Helms J. Mechanobiology of skeletal regeneration. *Clin Orthop Relat Res*, 1998 Oct; 355: 41-55.

Coonts B, Whitman S, O'Donnell M. Biodegradation and biocompatibility of a guided tissue regeneration barrier formed from a liquid polymer material. *J Biomed Mater Res*. 1998 Nov;42(2):303-11.

Dahlin C, Andersson L, Linde A. Bone augmentation at fenestrated implants by an osteopromotive membrane technique. A controlled clinical study. *Clin Oral Implants Res*. 1991 Oct-Dec;2(4): 159-65.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Dahlin C, Lekholm U, Becker W. Treatment of fenestration and dehiscence bone defects around oral implants using the guided tissue regeneration technique: A prospective multicenter study. *Int J Oral and Maxillofac Implants*. 1995 May-Jun;10(3):312-8.

Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plastic Reconstructive Surgery*. 1988 May; 81(5):672-6.

Efeoglu C, Burke JL, Parsons AJ, Aitchison GA, Scotchford C, Rudd C, et al. Analysis of calvarial bone defects in rats using microcomputed tomography: potential for a novel composite material and a new quantitative measurement. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2009 Dec;47(8):616-21.

Fujimoto M, Isobe M, Yamaguchi S, Amagasa T, Watanabe A, Ooya T, Yui N. Poly(ethylene glycol) hydrogels cross-linked by hydrolyzable polyrotaxane containing hydroxyapatite particles as scaffolds for bone regeneration. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2005;16(12):1611-21.

Garcia-Rio L, Otero-Espinar F, Luzardo-Alvarez A, Blanco-Mendez J. Cyclodextrin based rotaxanes, polyrotaxanes and polypseudorotaxanes and their biomedical applications. *Curr Top Med Chem*. 2014;14(4):478-93.

Garg K, Bowlin G. Electrospinning jets and nanofibrous structures. *Biomicrofluidics* Sep 2011;13:403-11.

Gautam S, Chou C, Dinda A, Potdar P, Mishra N. Surface modification of nanofibrous polycaprolactone/gelatin composite scaffold by collagen type I grafting for skin tissue engineering. *Master Sci Eng C Mater Bio Appl*. 2014 Jan;1:402-9.

Gautam S, Dinda A, Mishra N. Fabrication and characterization of PCL/gelatin composites nanofibrous scaffolds for tissue engineering applications by electrospinning method. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013 Apr;33(3):1228-35.

Ghanaati S, Barbeck M, Orth C, Willershausen I, Thimm BW, Hoffmann C, Rasic A, Sader RA, Unger RE, Peters F, Kirkpatrick CJ. Influence of β -tricalcium phosphate granule size and morphology on tissue reaction in vivo. *Acta Biomater*. 2010 Dec;6(12):4476-87.

Gineste L, Gineste M, Blunche L, Guilhem A, Elefterion A, Frayssinet P, Duran D, Wang H. Histomorphometric comparison oh three bioabsorbable GTR barrier membranes in the canine model. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2005; 25(1): 61-71.

Gomes PS, Fernandes MH. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Lab Anim*. 2011 Jan;45(1):14-24.

Guo M, Hu X, Fan Z, Liu J, Wang X, Wang Y, Mi H. Imprinted polymers with cyclodextrin pseudopolyrotaxanes as pseudo-supports for proteins recognition. *Talanta*. 2013 Feb;15:209-16.

Handelsman M, Celetti R. Alveolar ridge augmentation using membranes. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2004 Feb;16(1):33-9.

Hao J, Acharya A, Chen K, Chou J, Kasugai S, Lang NP. Novel bioresorbable strontium hydroxyapatite membrane for guided bone regeneration. *Clinical Oral Implants Research*, 2013 Nov 5. Epub ahead of print.

Hurzeler M, Quinones C, Schupbach P. Guided bone regeneration around dental implants in the atrophicalveolar ridge using a bioresorbable barrier. An experimental study in the monkey. *Clin Oral Implants Res*. 1997 Aug;8(4):323-31.

Ito K, Nanba K, Murai S. Effects of bioabsorbable and non-resorbable barrier membrane on bone augumentaion in rabbit calvaria. *Journal of Periodontol*. 1998 Nov; 69(11):1229-37.

Ito K, Yamada Y, Ishigaki R, Nanba K, Nashida T, Saito S. Effects of guided bone regeneration with non-resorbable and bioabsorbable barrier membranes on osseointegration around hydroxyapatite-coated and uncoated treated titanium implants placed into a surgically-created dehiscence type defect in rabbit tibia: a pilot study. *J of Oral Sci*. 2001 Mar;43(1):61-7.

Jovanovic S, Spiekermann H, Richter E. Bone regeneration around titanium implants in dehiscd defects sites. A clinical study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1992 Summer;7(2):233-45.

Jung R, Fenner N, Hammerle C, Zitzmann N. Long-term outcome of implants placed with guided tissue regeneration (GBR) using resorbable and non-resorbable membranes after 12-14 years. *Clin Oral Implants Res*. 2013 Oct;24(10):1065-73.

Jung R, Zwahlen R, Webber F, Molenberg A, Van Lenthe G, Hammerle C. Evaluation of an in situ formed synthetic hydrogel as a biodegradable membrane for guided bone regeneration. *Clin Oral Implants Res*. 2006 Aug;17(4):426-33.

Kong L, Ziegler GR. Molecular entanglement and electrospinnability of biopolymers. *J Vis Exp*. 2014 Sep;3(91), e51933.

Kulkarni M, Greiser U, O'Brien T, Pandit A. Liposomal gene delivery mediated by tissue-engineered scaffolds. *Trends Biotechnol* 2010 Jan;28(1):28-36.

Li JJ, Zhao F, Lin J. Polyrotaxanes for application in life Science and biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011 Mar;90:427-443.

Meng Z, Zheng L, Zheng Y. Fabrication and characterization of three-dimensional nanofiber membrane of PCL-MWCNTs by electrospinning. *Mater Scie Eng*. 2010;7:1014-21.

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 May;9(3):257-65.

Okumura Y, Ito K. The polyrotaxane gel: a topological gel by figure-of-eight cross-links. *Adv Matter*, 2001 Apr; 3(7):132-8.

Polimeni G, Koo KT, Pringle GA, Agelan A, Safadi FF, Wikesjo UM. Histopathological observations of a polylactic acid-based device intended for guided bone/tissue regeneration. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2008 May;10(2):99-105.

Polson A, Garrett S, Stoller N. Guided tissue regeneration in human furcation defects after using a biodegradable barrier: a multi-center feasibility study. *J Periodontol*. 1996 May;66(5):377-85.

Polson A, Southsrd G, Dunn R, Polson AP, Billen J, Laster L. Initial study of guided bone regeneration in class II furcation defects after use of a biodegradable barrier. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1995 Feb;15(1):42-55.

Postlethwaite AE, Seyer JM, Kang AH. Chemotactic attraction of human fibroblasts to type I, II and III collagens and collagen-derived peptides. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1978 Feb;75(2):871-5

Proussaefs P, Lozada J. The use of resorbable collagen membrane in conjunction with autogenous bone grafts and inorganic bovine mineral for buccal/labial alveolar ridge augmentation: a pilot study. *J Prost Dent*. 2003 Dec;90(6):530-8.

Rosen P, Reynolds M, Bowers G. A technique report on the in situ application of Atrisorb as a barrier of combination therapy. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1998 Jun;18(3):249-55.

Rosen P, Reynolds M. Polymer-assisted regenerative therapy: Case reports of 22 consecutively treated periodontal defects with a novel combined surgical approach. *J Periodontol*. 1999 May;70(5):554-61.

Rosen P, Reynolds M. Guided bone regeneration for dehiscence and fenestration defects on implants using an absorbable polymer barrier. *J Periodontol*. 2001 Feb;72(2):250-6.

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 Jun;16(3):369-78.

Salles T, D'Ávila M, Kiang C. Eletrofiação de nanofibras de blendas de policaprolactona (PCL)/Poli(rotaxano)s a partir de soluções de clorofórmio/acetona. *Anais do XIV Simpósio Latino Americano em Polímeros*. ; 12-16 out. 2014; Porto de Galinhas, BR. Porto de Galinhas: [s.n.]; 2014.

Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibularfacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res*. 1996 Apr;(2015):299-308.

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*. 2006 Aug;17(4):403-9.

Schwarz F, Rothamel D, Herten M, Wustefeld M, Sager M, Ferrari D, Becker J. Immunohistochemical characterization of guided bone regeneration at a dehiscence-type defect using different barrier membranes: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res*. 2008 Apr;19(4):402-15.

Scortinghuis J, Ruben J, Meijer H, Bronckers AL, Raghoobar G, Stengaga B. Microradiography to evaluate bone growth into a rat mandibular defect. *Arch Oral Biol* 2003 Feb;48(2):155-60.

Sela M, Kohavi D, Krausz E, Steinberg D, Rosen G. Enzymatic degradation of collagens membranes by periodontal bacteria. *Clin Oral Implants Res.* 2003 Jun;14(3):263-8

Simion M, Misitano U, Gionso L, Salvato A. Treatment of dehiscence and fenestration around dental implants using resorbable and non resorbable membranes associated with bone grafts. *Int J Oral and Maxillofac Implants.* 1997 Mar-Apr;12(2):159-67.

Spiecer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen J, Kasper F, Mikos A. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc.* 2012 Oct;7(10):1918-29.

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. *Clinl Oral Implants Res.* 2008 Aug;19(8):760-6.

Tamura A, Ikeda G, Seo J, Tsuchiya K, Yajima H, Sasaki Y, Akiyoshi K, Yui N. Molecular logistics using cytocleavable polyrotaxanes for the reactivation of enzymes delivered in living cells. *Sci Rep.* 2013;3: 2252. doi: 10.1038.

Wu X, Miao L, Yao Y, Wu W, Liu Y, Chen X, Sun W. Electrospun fibrous scaffolds combined with nanoscale hydroxyapatite induce osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells. *Int J Nanomedicine.* 2014 Aug;9:4135-43.

Zitzman N, Naef R, Scharer P. Resorbable versus non-resorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration. *Int J Oral and Maxillofac Implants.* 1997 Dec;12(6):220-238.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Tel. (11) 3091 7887/7863

Certificado

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **020/2013** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a). Maria Cristina Zindel Deboni Coordenador(a) da Linha de Pesquisa “**Estudo do reparo de defeitos críticos ósseos pela utilização de enxerto e membrana eletrofiada de gelatina/pvp**” do qual participam o(s) pesquisador(es) Natacha Kalline de Oliveira e Daniel Isaac Sendyk, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **14/10/2013**, com validade de **03 (três)** anos.

São Paulo, 14 de outubro de 2013

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Presidente do CEUA-FOPUSP