

Biocompatibilidade e uso da membrana fibrosa da casca de ovo na regeneração óssea guiada

Marcondes Queiroz Oliveira¹

Edmar José Borges de Santana²

Moisés Sadigursky³

Resumo

A técnica da regeneração óssea guiada (ROG) fundamenta-se nos mesmos princípios da regeneração tecidual guiada (RTG) e funciona protegendo uma lesão óssea da invasão de células do tecido conjuntivo e (ou) do tecido epitelial, por meio de uma membrana ou barreira. O objetivo deste trabalho foi estudar a biocompatibilidade da membrana fibrosa da casca de ovo *in natura* (MFCO) esterilizada em autoclave para uso como membrana permanente para a técnica da ROG. Na experimentação, foram usados aleatoriamente trinta *Rattus norvegicus albinus* para o grupo I, e quinze para o grupo II. O grupo I foi subdividido em 1, 2 e 3, e o grupo II em 4, 5, e 6, que foram avaliados respectivamente em uma, duas e três semanas. Os resultados permitiram concluir que a MFCO é biocompatível conforme a ausência de infiltrado linfoplasmocitário nos tecidos e que funciona como barreira, como mostra a produção de osso, apesar dos resultados não significantes estatisticamente entre o grupo de controle e o sham $p=0,257$, $p=0,317$ e $p=0,317$ para uma, duas e três semanas respectivamente, usando-se o teste de Wilcoxon.

Palavras-chave: Biocompatibilidade - Membrana fibrosa da casca de ovo - Regeneração óssea guiada.

INTRODUÇÃO

A técnica da regeneração tecidual guiada (RTG) fundamenta-se no princípio de proteger uma determinada área destruída do periodonto de inserção da invasão de células do tecido conjuntivo propriamente dito ou do tecido epitelial, depois do ato cirúrgico, usando-se uma membrana ou barreira (KARRING et al., 1993). A regeneração óssea guiada (ROG) é uma técnica derivada da RTG, que utiliza os mesmos princípios, condutas e membranas, e está sujeita às mesmas vantagens e desvantagens. As membranas mais utilizadas para as duas técnicas

têm sido as sintéticas não absorvíveis, do tipo politetrafluoretileno expandido (ePTFE Gore Tex[®]), as absorvíveis de ácido polilático (Guindor[®]), de acordo com Bohning, Davenport e Jeansonne (1999), e as biológicas absorvíveis, como o colágeno, conforme Verschueren e colaboradores (2005). Recentemente, membranas com nano cristais têm sido pesquisadas por Liao e colaboradores (2005). De qualquer modo, nenhum tipo de membrana, qualquer que seja a sua origem, preencheu completamente todos os requisitos exigidos para a sua função. A vantagem de a membrana de ePTFE permanecer no tecido sem

¹ Faculdade de Odontologia - Departamento de Propedêutica e Clínica Integrada - Universidade Federal da Bahia.

² Faculdade de Odontologia - Departamento de Propedêutica e Clínica Integrada - Universidade Federal da Bahia

³ Faculdade de Medicina - Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal - Universidade Federal da Bahia

Correspondência para / Correspondence to:

Marcondes Oliveira

Rua Monte Conselho, 689, apt. 202, Rio Vermelho.

CEP: 41940-370 Salvador - Bahia- Brazil.

Tel: (71) 8130-6851. E-mail: marconde@ufba.br.

degradabilidade é neutralizada pela necessidade de um segundo ato cirúrgico, e a vantagem da degradação própria da membrana reabsorvível contrasta com a impossibilidade de se controlar temporariamente a sua reabsorção.

Apesar dos inconvenientes, os dois tipos de membranas têm sido usados com sucesso na ROG, no aumento de massa óssea, na cobertura de implantes, na proteção de enxertos ósseos, na pesquisa experimental (VERSCHUEREN et al., 2005) e na RTG.

No presente momento as pesquisas caminham na direção da busca de melhorar as propriedades dos dois tipos de membranas, tanto para a ROG como para RTG. Entretanto, esse entendimento é equivocado, porque, na técnica da ROG, o único interesse é a regeneração do osso, e as ações se efetivam em áreas afastadas da confluência com o meio externo, diferentemente da RTG, na qual existe um elo entre o meio interno e o tecido epitelial. Assim, a pesquisa dirigida para a ROG está encontrando soluções corretas, apoiadas em conceitos científicos sólidos, mas abordada de maneira equivocada. Entendemos que o esforço da pesquisa deveria ser direcionado na busca de uma membrana permanente, que pudesse evitar os inconvenientes das atuais, independentemente do tipo, origem e ação no tecido.

O objetivo deste trabalho foi estudar a biocompatibilidade da membrana fibrosa da casca de ovo esterilizada em autoclave, com vistas ao seu uso como membrana permanente para a técnica da ROG.

MATERIAIS E MÉTODOS

Ovos da *Gallinea galli gallus domestica* foram limpos com água e sabão, lavados em uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, postos em vasilhame de vidro e mantidos em fluxo laminar por 20 minutos. Após esse tempo, a casca foi quebrada suavemente em um dos pólos, para a remoção do conteúdo interno e limpeza com água destilada. A membrana fibrosa interna da casca de ovo (MFCO) foi removida manualmente, cortada em pedaços de 3,0cm,

imersa em uma solução de álcool a 70° por duas horas (renovada a cada 30 minutos), lavada com água destilada nos intervalos, dobrada, secada e inserida em pacotes estéreis para esterilização em autoclave (Validator Plus-Siemens, Germany - program 3).

Para a experimentação, foram usados quarenta e cinco *Rattus norvegicus albinus*, machos, com entre 250g e 280g de peso, divididos aleatoriamente nos grupos I, com trinta animais e II com quinze. Os animais do grupo I serviram para avaliar a biocompatibilidade da MFCO no tecido conjuntivo subcutâneo (E) e ao grupo sham (Sh), formando subgrupos de dez animais (1, 2 e 3); enquanto o grupo II serviu para avaliar a formação do osso (experimental e sham), constituindo-se subgrupos de cinco animais (4, 5 e 6). Ambos os subgrupos serviram para avaliação em uma, duas e três semanas, respectivamente.

Para induzir e manter a anestesia, foi aplicada, em cada animal, injeção intramuscular com uma associação de ketamina (100 mg/Kg) e xilazina (5 mg/kg). Em cada animal do grupo experimental I, foi feita a tricotomia na região dorsal mediana e a antisepsia com álcool iodado a 2,0%. O ato cirúrgico se realizou em condições de assepsia e, em cada animal, foram realizadas duas incisões de 2,0cm, aprofundadas até a fásia do músculo *Latissimus dorsi*, uma na região dorsocefálica, que serviu para implantação da MFCO, e outra na região dorsocaudal, que serviu ao grupo sham. Em seguida, as feridas foram aproximadas e as bordas suturadas com fios de seda 3-0 em ponto simples. No grupo II, foi usada a tíbia da perna direita traseira para o experimental e a da esquerda para o sham, nas quais foram realizadas incisões de 2,0cm na pele da face interna, aprofundadas até o perióstio. O retalho foi afastado, o perióstio disjuncionado e, com uma broca (broca KOMER- Germany e motor W&H- Áustria) em motor de baixa rotação, foram feitas aberturas ósseas de 0,4cm no sentido longitudinal do osso e 0,2cm de largura, sob intensa irrigação. Cada defeito ósseo foi coberto por uma membrana de 1,5cm e estabilizada nas extremidades com suturas de fios reabsorvíveis,

exceto para o grupo sham. O periósteo e o tecido muscular foram repostos e suturados com fio reabsorvível, e a pele foi suturada com fio de nylon 3-0 em ponto simples.

Depois de vencidos os tempos estabelecidos para o experimento de cada grupo, os animais foram mortos com superdose de tiopental (Thiopentax- Cristalia- Brasil), e as peças retiradas, fixadas em formol tamponado a 10,0% durante uma semana, processadas para cortes em parafina e coradas pela hematoxilina e eosina. As peças do tecido ósseo foram desmineralizadas em ácido nítrico a 10% pelo tempo de cinco horas, processadas e coradas igualmente às demais.

A avaliação histológica para a caracterização da biocompatibilidade foi feita obedecendo-se ao exame da interface material-tecido conjuntivo, avaliando-se a presença da inflamação e sua intensidade de acordo com Stanford (1980). Os critérios foram os que seguem: 1- Em duas semanas: reação tecidual mínima ou nenhuma. O tecido deve apresentar-se bem organizado e livre de reação inflamatória, onde é exposto ao material; 2- Em duas semanas: reação tecidual moderada. No tecido, ocorre a presença de algumas células inflamatórias e, nas adjacentes ao material-teste, as estruturas teciduais devem ser mantidas, podendo exibir pequeno acúmulo de neutrófilos, macrófagos, linfócitos, plasmócitos e ocasionais células gigantes; 3- Em duas semanas: reação tecidual severa. A reação tecidual é distinta com perda das estruturas e inflamação, além de acúmulo de neutrófilos e linfócitos. A interpretação aceita a biocompatibilidade (A), se reação é ligeira ou nula, identificada de duas até doze semanas; não se aceita a biocompatibilidade (B), se a reação for crescente de moderada a severa, ou se for moderada de duas até doze semanas; não se aceita a biocompatibilidade se a reação for moderada em duas semanas e persistir até doze semanas (C); se a reação for moderada em duas semanas e decrescer de duas até doze semanas (D) aceita-se a biocompatibilidade; e se a reação for severa em algum período, é inaceitável a biocompatibilidade (E).

O tipo predominante de célula envolvida na resposta inflamatória reconhecida pela

microscopia de luz foi considerado para cada espécime tecidual. A média contada por campo de imersão foi determinada para cada tipo (neutrófilo, eosinófilo, macrófago, célula gigante, linfócito, fibroblasto). Foram considerados dez campos de observação, e a média dos valores obtidos foi, então, calculada para cada tipo celular.

A avaliação do defeito ósseo foi feita por meio dos critérios estabelecidos por Crump e colaboradores (1996): 0 - Ausente, nenhuma evidência de osso formado; 1- Presente, e o novo osso formado ocupa menos de 50% do defeito (distância entre as bordas); 2 - Avançado, e novo osso presente ocupa mais que 50% do defeito (distância entre as bordas); 3 - Predominante, e o novo osso formado ocupa todo o defeito, mas a espessura é menor que o normal; 4 - Completo, e o novo osso formado ocupa todo o defeito, restabelecendo a espessura original. A avaliação estatística dos resultados foi realizada definindo-se o valor de $p=0,05\%$ e usando-se o teste "t" de Student e o teste de Wilcoxon.

RESULTADOS

As observações clínicas das feridas cirúrgicas dos animais dos grupos I e II experimentais e sham, ao longo dos experimentos, não evidenciaram supuração, necrose ou resposta que indicasse anormalidade.

Grupo I

A membrana permaneceu íntegra no tecido, sem que houvesse qualquer indício de degradabilidade. As Tabelas 1, 2 e 3 resumem os valores numéricos médios dos diversos tipos celulares dos grupos experimentais e sham do grupo I, indicando a intensidade do infiltrado inflamatório (polimorfonucleares neutrófilos, macrófagos, linfócitos, eosinófilos e células gigantes multinucleadas) e incluindo os fibroblastos, células não imunes. A presença de polimorfonucleares neutrófilos foi quase inexistente nos tecidos adjacentes às membranas na primeira semana e foi nula em todos os demais tempos experimentais. A avaliação estatística entre o número de fibroblastos da

primeira semana do grupo sham, quando comparado ao dos grupos experimentais em uma, duas e três semanas, revelou $p=0,0025$; $p=0,003$ e $p=0,003$, respectivamente. O número de macrófagos não foi estatisticamente significativo entre o grupo sham de uma semana e o grupo experimental de uma e duas semanas $p=0,64$; $p=0,11$ respectivamente, mas foi significativo estatisticamente entre o sham de uma semana e o experimental de três semanas $p=0,00$. Os resultados da avaliação da presença e intensidade da inflamação estão expostos na Tabela 4. Na primeira semana do grupo experimental (E-1), não foram identificados os linfócitos e plasmócitos. Por isso, o critério para a aceitação foi definido como 1 (quantidade mínima de linfócitos ou plasmócitos é exigida para o critério 2). A interpretação dos resultados para todos os grupos foi aceitável (A), caracterizada como ligeira ou nenhuma reação em duas e três semanas.

No **Grupo E-1**, o exame histológico revelou, nas áreas adjacentes à membrana, duas zonas: a interna, densamente povoada de fibroblastos, macrófagos, vasos sanguíneos neoformados e algumas células gigantes aderidas à membrana; e a externa, povoada com menor número de fibroblastos, macrófagos e vasos. Dentre essas células, os fibroblastos foram maioria, quando comparados com o número de macrófagos. Na zona interna, observou-se, em algumas áreas de alguns espécimes, a presença de neutrófilos. A maior parte do componente fibroso da matriz extracelular estava representada por fibrilas colágenas aleatoriamente dispersas e poucos feixes organizados. A zona externa, mais ampla que a interna, apresentou variação em um mesmo espécime e entre diferentes espécimes do mesmo grupo. Os linfócitos e plasmócitos não foram identificados. O grupo Sh-1 revelou um tecido conjuntivo que sediava intensa densidade de fibroblastos, macrófagos e vasos sanguíneos neoformados. A população de fibroblastos e macrófagos variou nos espécimes estudados, mas, em todos eles, essas células foram as predominantes. A matriz extracelular fibrosa mostrou-se desprovida de organização. Entretanto, nas zonas mais distante da

proliferação, esse não foi inteiramente o quadro. Os neutrófilos foram identificados em pequeno número, e os tipos celulares encontrados podem ser analisados na Tabela 1.

O **Grupo E-2** exibiu histologicamente a membrana envolta por duas zonas: uma interna e outra externa. Na zona interna, junto à membrana, foram identificadas algumas células gigantes, grande quantidade de fibroblastos, moderada quantidade de macrófagos e muitos vasos sanguíneos neoformados. A matriz extracelular dessa zona foi composta de colágeno em organização, formando uma cápsula com maior ou menor espessura, composta de macrófagos, numa matriz extracelular incipiente. Em alguns espécimes, a cápsula não foi observada, ou se apresentava interrompida por áreas de pouca densidade de macrófagos. A zona externa sediou grande quantidade de fibroblastos paralelamente distribuídos, alguns macrófagos e matriz extracelular com colágeno em organização e com algum paralelismo. O exame histológico do grupo Sh-2, revelou a presença predominante de fibroblastos, um número mínimo de macrófagos e uma pequena quantidade de vasos sanguíneos, com poucos hiperemiados, em uma matriz extracelular rica de fibras colágenas em processo de organização. A Tabela 2 revela as informações sobre os números de macrófagos e fibroblastos.

No **Grupo E-3**, microscopicamente, no conjuntivo adjacente à membrana, foram observadas duas zonas distintas: uma interna, aderida à membrana, e outra externa, contígua à primeira. Na zona interna, próxima da membrana, foram identificadas células gigantes, macrófagos e principalmente grande quantidade de fibroblastos, mas não em todos os espécimes. Essa zona, de variada espessura, mostrou células em intensa atividade e inúmeros vasos sanguíneos que alternaram em quantidade ao longo da extensão da membrana. A matriz extracelular revelou-se rica em fibras colágenas bem organizadas, mas em incompleto *cross-linking*, apesar do arranjo paralelo à membrana. Na zona externa, a quantidade de fibroblastos e macrófagos foi pequena, e os feixes colágenos assumiram uma orientação no sentido da membrana. O grupo Sh-3 exibiu

Tabela 1 - Contagem dos tipos celulares por campo em imersão no tecido conjuntivo, no grupo sham e experimental implantado a MFCO no tempo de uma semana.

Grupo Sham (Sh) e Experimental (E). Tecido conjuntivo. Uma semana												
Animais	Sh-1 E-1		Sh-1 E-1		Sh-1 E-1		Sh-1 E-1		Sh-1 E-1		Sh-1 E-1	
	Neutrófilo		Macrófago		Fibroblasto		Linfócito		Cel. Gigante		Eosinófilo	
1	0,3	0,4	32,5	18,9	33,0	39,9	0	0,3	0,1	0,5	0,4	
2	0	8,9	17,3	20,9	36,4	78,8	0	0	0	0,2	0,3	
3	0	0,6	22,7	18,3	46,8	48,5	0	0	0	0,1	0	
4	0	0	17,8	14,5	31,3	53,7	0	0	0	0	0	
5	0	0	18,6	18,1	35,9	99,9	0	0,1	0,2	0,4	0,9	
6	0	0	15,5	19,0	24,3	56,3	0	0	0	0,2	0	
7	2,1	0,2	11,0	15,7	36,6	80,4	0	0	0	0,6	0,1	
8	0	0	9,0	15,0	34,8	94,9	0	0	0	1,3	0	
9	0	0,2	10,1	15,4	35,6	56,5	0	0,1	0	0,3	0	
10	0	0	11,8	12,3	31,2	34,4	0	0	0	0,3	0	
C/cam	0,24	1,03	16,6	16,8	34,5	64,3	0	0,05	0,03	0,39	0,17	
			3	1	9	3						

Nota: MFCO = Membrana fibrosa da casca do ovo; S = Semana; Sh = Sham; E = Experimental; Cel. Gigante = Célula gigante; C/cam = Média do número de células por campo.

Tabela 2 - Contagem dos tipos celulares por campo em imersão no tecido conjuntivo, no grupo sham e experimental implantado a MFCO no tempo de duas semanas.

Grupo Sham (Sh) e Experimental (E). Tecido conjuntivo. Duas semanas.														
Animais	Sh-2 E-2		Sh-2 E-2		Sh-2 E-2		Sh-2 E-2		Sh-2 E-2		Sh-2 E-2		Sh-2 E-2	
	Neutrófilo		Macrófago		Fibroblasto		Linfócito		Cel. Gigante		Eosinófilo			
1	0	1,3	13,0	30,6	37,0	64,7	0	0,2	0	0	0	0	0,8	
2	0	0	16,4	17,2	44,7	48,5	0	0	0	0	0	0	0	
3	0	0	12,2	21,4	48,3	45,3	0	0	0	0,2	0,2	1,0		
					5	2								
4	0	0	11,3	19,0	51,6	48,4	0	0,2	0	0,2	0	10,1		
5	0	0	23,2	13,4	45,6	49,2	0	0	0	0	0	0,3		
6	0,2	0	7,3	11,3	23,4	73,1	0	0	0	0	0	0		
7	0,1	0	20,0	10,4	40,9	62,6	0	0	0	0,6	0,2	0		
8	0,2	0	10,1	16,0	50,7	57,4	0	0	0	1,1	0	0,9		
9	0,3	0	19,7	13,3	43,0	59,2	0	0	0	0,3	0	0,1		
10	0	0	15,2	37,1	46,7	92,1	0	0	0	0,1	0	2,7		
C/cam	0,08	0,13	13,2	18,9	43,2	60,0	0	0,04	0	0,25	0,04	1,59		
			0	7	0	4								

Nota: MFCO = Membrana fibrosa da casca do ovo; S = Semana; Sh = Sham; E = Experimental; Cel. Gigante = Célula gigante; C/cam = Média do número de células por campo.

microscopicamente uma variada quantidade de vasos nos espécimes estudados. Nas áreas de menor densidade vascular, foi maior a presença de fibras colágenas em organização e, nas áreas de maior vascularização, a matriz colágena foi menos organizada. Comparativamente, os fibroblastos foram numericamente mais abundantes que os macrófagos, como revelam as informações da Tabela 3.

Grupo II

A avaliação do defeito ósseo feito pelos critérios de Crump e colaboradores (1996) está representado na Tabela 5, e a presença de osso excedente na Tabela 6. Não houve significância estatística entre a produção de osso nos grupos sham e experimentais nas semanas estudadas ($p=0,257$, primeira semana, $p=0,317$, a segunda semana e $p=0,317$, a terceira semana).

No **Grupo E-4**, a resposta histológica óssea foi semelhante à do grupo sh-4, mas, em dois dos espécimes, o osso trabecular preencheu toda a extensão do defeito, com grande avanço na direção da cortical óssea oposta. Em quatro dos espécimes, houve produção excedente de osso trabecular sobre a cortical oposta ao defeito e sobre a cortical contígua ao defeito. Os resultados histológicos do grupo Sh-4 revelaram, na área do defeito, a presença de trabéculas ósseas neoformadas que ocupavam todo o espaço da porção medular, em direção à cortical oposta ao do defeito. A periferia das trabéculas e os espaços entre elas foram preenchidos por células semelhantes às precursoras de osteoblastos. A superfície do defeito mostrou-se ricamente povoada de células semelhantes aos osteoblastos, intensa vascularização, feixes colágenos finos e pouca neoformação trabecular. Em um dos espécimes, a população celular e os feixes colágenos foram maiores que as trabéculas produzidas.

O **Grupo E-5**, histologicamente, revelou resultados semelhantes aos do grupo sh-5, exceto pelo fato de, em dois dos espécimes, o novo osso produzido no defeito interligou-se com a cortical oposta, e o osso excedente sobre a cortical original foi identificado em todos os espécimes. Histologicamente, no grupo Sh-5, houve nova formação óssea dos tipos trabecular

e lamelar, preenchendo o defeito em maior quantidade na área voltada para o interior. Em dois dos espécimes, houve produção de tecido cartilaginoso e de osso trabecular excedente sobre a cortical oposta e lateralmente ao defeito.

No **Grupo E-6**, a observação histológica foi semelhante à do grupo sh-6. Entretanto, em um dos espécimes, o osso trabecular produzido fundiu-se com o osso cortical oposto ao do defeito, em quatro dos espécimes houve produção de osso excedente, um desses com presença de tecido cartilaginoso. No grupo Sh-6, foi observada, histologicamente, a presença pequena quantidade de osso trabecular povoado de osteoblastos em suas adjacências, nas proximidades da cortical oposta ao defeito, e a presença de osso lamelar que preenchia completamente o defeito, mas com espessura menor que o osso original. Não foi observado osso excedente, tampouco tecido cartilaginoso.

DISCUSSÃO

A resposta do tecido conjuntivo à membrana fibrosa da casca do ovo (MFCO), suportada pelos critérios estabelecidos por Stanford (1980), pode ser considerada biocompatível, uma vez que a resposta tecidual foi negativa para linfócitos, plasmócitos e positiva para neutrófilos somente na primeira semana. Os resultados histológicos do nosso estudo com o uso da MFCO mostraram ligeira resposta inflamatória, semelhante aos descritos por Dupoirieux e colaboradores (2001), com uma MFCO hidrolisada, (BOHNING; DAVENPORT; JEANSONNE, 1999), com uma membrana de ácido poliláctico (DUPOIRIEUX et al., 1999), com uma membrana de PTFE (ITO et al., 1999) e com a membrana de chitosam associada a hidroxiapatita.

Como a composição da MFCO é colagênica, sua estrutura molecular se afasta de muitos tipos de membranas (CHUNG et al., 1997; PARK et al., 1998; ITO et al., 1999; UEYAMA et al., 2002; HUNG et al., 2001; KIKUCHI et al., 2004), mas se aproxima das membranas de colágeno biológico (YI et al.,

Tabela 3 - Contagem dos tipos celulares por campo em imersão no tecido conjuntivo, no grupo sham e experimental implantado a MFCO no tempo de três semanas.

Grupo Sham (Sh) e Experimental (E). Tecido conjuntivo. Três semanas												
Animais	Sh-3 E-3		Sh-3 E-3		Sh-3 E-3		Sh-3 E-3		Sh-3 E-3		Sh-3 E-3	
	Neutrófilo		Macrófago		Fibroblasto		Linfócito		Cel. Gigante		Eosinófilo	
1	0	0	5,4	11,2	28,2	50,3	0	0	0	0	0,1	4,7
2	0	0	3,8	16,0	21,7	47,3	0	0	0	0	0,1	0,4
3	0	0	5,1	18,2	30,2	52,0	0	0	0	0,1	0	0,2
4	0	0	3,8	19,2	21,4	54,3	0	0	0	0,1	0,1	3,3
5	0	0	4,1	11,2	35,5	50,3	0	0	0	0	0,1	4,7
6	0	0	2,3	11,7	20,8	45,6	0	0	0	0,1	0	0,8
7	0	0	3,6	9,6	25,8	44,1	0	0	0	0	0	0,1
8	0	0	4,3	9,1	28,4	53,3	0	0	0	0	0	0,1
9	0	0	4,0	21,6	21,4	49,5	0	0	0	0,4	0	1,1
10	0	0	2,6	11,5	26,7	77,0	0	0	0	0	0	4,2
C/cam	0	0	3,9	13,9	26,0	52,3	0	0	0	0,07	0,04	1,96
				3	1	7						

Nota: MFCO = Membrana fibrosa da casca do ovo; S = Semana; Sh = Sham; E = Experimental; Cel. Gigante = Célula gigante; C/cam = Média do número de células por campo.

Tabela 4 - Avaliação histológica, em microscopia de luz, da resposta do tecido conjuntivo subcutâneo à membrana fibrosa da casca de ovo (MFCO) quanto à presença e intensidade da inflamação.

Animais	Tecido conjuntivo subcutâneo					
	1 semana		2 semanas		3 semanas	
	Sh-1	E-1	Sh-2	E-2	Sh-3	E-3
1	(0,3) 1	(0,7) 1	(0,0) 1	(1,5) 1	(0,0) 1	(0,0) 1
2	(0,0) 1	(8,9) 1	(0,0) 1	(0,0) 1	(0,0) 1	(0,0) 1
3	(0,0) 1	(0,6) 1	(0,0) 1	(0,2) 1	(0,0) 1	(0,0) 1
4	(0,0) 1	(0,0) 1	(0,0) 1	(0,0) 1	(0,0) 1	(0,0) 1
5	(0,0) 1	(0,1) 1	(0,0) 1	(0,0) 1	(0,0) 1	(0,0) 1
6	(0,0) 1	(0,0) 1	(0,2) 1	(0,0) 1	(0,0) 1	(0,0) 1
7	(2,1) 1	(0,2) 1	(0,1) 1	(0,0) 1	(0,0) 1	(0,0) 1
8	(0,0) 1	(0,0) 1	(0,2) 1	(0,0) 1	(0,0) 1	(0,0) 1
9	(0,3) 1	(0,3) 1	(0,3) 1	(0,0) 1	(0,0) 1	(0,0) 1
10	(0,0) 1	(0,0) 1	(0,0) 1	(0,0) 1	(0,0) 1	(0,0) 1

Fonte: STANFORD, 1980.

Nota : 1= reação tecidual mínima; 2 = reação tecidual moderada; 3 = reação tecidual severa

Tabela 5 - Avaliação histológica em microscopia de luz do novo osso formado em defeito de 4mm x 2mm com e sem uso da membrana fibrosa da casca de ovo (MFCO) na função de barreira.

Animais	Tecido ósseo					
	1 semana		2 semanas		3 semanas	
	Sh-4	E-4	Sh-5	E-5	Sh-6	E-6
1	3	2	*	4	3	4
2	3	2	4	4	3	4
3	3	1	3	4	3	4
4	2	3	3	3	4	3
5	3	3	3	3	4	4

Nota: Adaptado de Crump e colaboradores (1996) : 0 = ausente, nenhum osso novo formado; 1 = presente, osso novo ocupando menos de 50% do defeito; 2 = avançado, osso novo ocupando mais de 50% do defeito; 3 = predominante, osso novo formado preenchendo todo o defeito, mas com espessura menor que o normal; 4 = completo, osso novo preenchendo todo o defeito e restabelecendo a espessura original; Sh= sham; E= experimental; * = perdido.

Tabela 6 - Avaliação histológica em microscopia de luz de novo osso excedente formado nas laterais dos defeitos e nas corticais opostas a eles nos grupos sham e experimentais.

Animais	Tecido ósseo					
	1 semana		2 semanas		3 semanas	
	Sh - 4	E - 4	Sh - 5	E - 5	Sh - 6	E - 6
1	S	S	*	S	N	S
2	S	N	S	S	N	N
3	S	S	N	S	N	S
4	S	S	S	S	N	S
5	S	S	N	S	N	S

Nota: Sh = sham; E = experimental; S = presença de osso excedente nas corticais; N = ausência osso excedente nas corticais; * = perdido.

2004), com a vantagem de não ser atacada pela collagenase.

A biocompatibilidade de um produto como uma membrana depende de muitos fatores físicos e biológicos, inclusive a presença e o tamanho de poros, a rugosidade, o tipo de processamento e a capacidade de liberar ou não moléculas imunogênicas. O processo de preparo da MFCO estudada parece não resultar em qualquer tipo de interferência na sua trama fibrosa, ou alterar as suas propriedades biocompatíveis, e, contrariamente à membrana de borracha estudada por Apinhasmith e

colaboradores (2003), sofreu grande alteração. A adição de hidroxicarbonato de apatita em uma membrana de ácido polilático resultou em melhores índices de proliferação celular, conforme Maeda, Kasuga e Hench (2006), assim como a adição de hidroxiapatita nanocarbonatada a uma membrana de colágeno tinha auxiliado na sua absorção (LIAO et al., 2005). A MFCO fabricada por solubilização não sofreu alteração na sua biocompatibilidade (YI et al., 2004); entretanto, a MFCO tratada com pepsina e ácido acético revelou resposta tecidual aceitável, mas suas propriedades físicas

foram inferiores às do politetrafluoretileno, conforme Dupoirieux e colaboradores (2001), enquanto mudanças nas estruturas moleculares do chitin foram sugeridas para a efetivação da sua biocompatibilidade (KOSTOPOULOS et al., 2001). Os poros presentes na MFCO podem servir para estocar citocinas e fatores de crescimento, à semelhança dos poros da membrana de colágeno estudada por Taguchi e colaboradores (2005), que funcionaram como armadilhas para as proteínas e o poliuretano, com poros estudados por Zhang e colaboradores (2004) em tecido vascular.

Seguramente, os poros da MFCO estudada serviram de ancoragem ao coágulo e à fixação da fibrina, sua degradação pelos macrófagos, facilitando a proliferação fibroblástica, o que concorda com as informações de Hunt, Hopf, Hussain (2000). Nos primeiros momentos e dias, os passos da coagulação e da inflamação dos tecidos adjacentes à MFCO foram conduzidos, possivelmente, com plaquetas que liberaram PDGF, fator de crescimento epidérmico derivado de plaquetas (PDEGP), fator de crescimento transformador beta um e beta dois (TGF $\hat{\alpha}_1$ e $\hat{\alpha}_2$) e fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), peptídeos quimiotáticos para neutrófilos, monócitos e mitogênicos para fibroblastos, em concordância com as informações de Deuel, Kawahara (1991) e de Hunt, Hopf, Hussain (2000), resultando na população de fibroblastos encontrada na primeira e segunda semana dos tecidos adjacentes às membranas implantadas. Esses resultados foram diferentes daqueles obtidos pelos experimentos de Ueyama e colaboradores (2002), que não constataram inflamação com a membrana de alginato, apesar de confirmar a biocompatibilidade. Entendemos que é importante a participação das células do processo imune inato na reparação de ferida, assim como o seu declínio nas semanas subsequentes.

No nosso estudo, a presença dos neutrófilos e macrófagos foi maior nos grupos experimentais que nos sham. A função dos neutrófilos e macrófagos em feridas não infectadas é a produção de citocinas e fatores de crescimento para estimular fibroblastos e células

endoteliais. Os macrófagos são importantes também na fagocitose de restos celulares de tecidos lesados na digestão da fibrina, facilitando o povoamento de fibroblastos (ROSENBERG; GALLIN, 1999; HUNT; HOPF; HUSSAIN, 2000) e na invasão de capilares (TONNESEN; FENG; CLARK, 2000), eventos que foram desenvolvidos completamente. Os macrófagos são células produtoras de muitos fatores de crescimento, dentre os quais: PDGF, que é mitógeno para fibroblastos (CLARK, 1993); interleucina 6 (IL-6) e interleucina 1 (IL-1) (SCHÄFFER; BARBUL, 1998); interleucina 6, 10, 12 (IL-6, IL-10 e IL-12) e TNF α (SCHÄFFER; BARBUL, 1998; OBERHOLZER, A.; OBERHOLZER, C.; MOLDAWER, 2000).

Certamente fatores de crescimento e citocinas funcionaram ao longo do processo de cura do tecido adjacente à MFCO estudada, uma vez que, na fase proliferativa, o processo de diferenciação celular envolve a proliferação dos fibroblastos, uma nova matriz extracelular, incluindo o componente fibroso e o amorfo. Esses eventos foram identificados nas áreas de regeneração dos grupos experimentais com a MFCO, que exibiram povoamento de fibroblastos nessa fase e nas fases subsequentes, revelando número estatisticamente significativo dessas células quando comparado ao dos grupos sham, exceto na terceira semana, em que o número dessas células foi semelhante. Esses dados concordam com os de Tonnesen, Feng e Clark (2000), de Hunt, Hopf e Hussain (2000) e de Schultz e colaboradores (2003).

Os resultados experimentais com a MFCO permitem aceitar a idéia de que esse material pode permanecer dentro dos tecidos, evitando-se um novo ato cirúrgico. Nesse caso, a MFCO funcionaria como uma membrana permanente. De qualquer modo, pelo menos para a regeneração óssea guiada (ROG), a rotina de remover a membrana parece pouco racional. Qualquer que seja a membrana, a sua ação é impedir que as células do epitélio e do conjuntivo cheguem aos sítios de recuperação do osso/periodonto, assegurando o espaço para o repovoamento celular (KARRING et al., 1993) na regeneração óssea guiada (RTG), ou

na regeneração tecidual guiada (ROG). Os defeitos ósseos criados na tíbia e cobertos pela MFCO foram repovoados pelas células e depois preenchidos por osso trabecular e lamelar ao final de três semanas, da mesma maneira que o grupo sham se comportou. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados por Crump e colaboradores (1996), que usaram, no osso calvária, defeitos de 3,5mm e membranas de politetrafluoretileno (PTFE) e ácido polilático; por Rompen e colaboradores (1999), que usaram perfurações em calvária, e por Ohnishi e colaboradores (2000), com uma membrana de PTFE em mandíbula de rato, embora esses autores considerassem que a permanência da membrana induz a perda de osso e, por isso, recomendam a sua remoção. A produção de osso nos defeitos cobertos pela MFCO, na primeira e na segunda semana do grupo experimental, foi semelhante ao encontrado no grupo sham, predominando o osso trabecular. Na terceira semana dos nossos experimentos, a produção de osso foi também semelhante entre os grupos experimentais e sham, com predominância de osso lamelar, resultados concordantes com os de Bohning, Davenport e Jeansonne (1999), e de Gordh e colaboradores (1998). A explicação encontrada para a igualdade de desempenho dos dois grupos, no nosso estudo, foi, possivelmente, o fato de os defeitos no grupo sham terem sido cobertos pelo perióstio, que funcionou como uma barreira ou membrana, de modo que o defeito ósseo criado não ficou disponível para a povoação de fibroblastos no seu interior. No estudo de Park e colaboradores (1998), os defeitos ósseos de 5,0mm foram preenchidos por osso quando cobertos por membrana associada ao fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF). Contrariamente, uma insignificante produção de osso no interior de defeitos de 6,0mm em calvária de rato foi encontrada por Dupoirieux e colaboradores (1999), enquanto Dupoirieux, Neves e Pourquier (2000) encontraram pouco preenchimento de osso em defeitos de 6,0mm no osso calvária, mesmo quando um fragmento de perióstio foi interposto entre o defeito e a membrana.

Dahlin e colaboradores (1994) demonstraram que o espaço criado pela membrana, quando preenchido por coágulo sanguíneo, oferece regeneração óssea mais efetiva, conclusões semelhantes às encontradas por Rompen e colaboradores (1999) e por Lundgren, Lundgren e Taylor (1998). Os defeitos ósseos cobertos com a MFCO foram beneficiados, possivelmente pela grande quantidade de líquido medular aflorado no momento da execução do defeito e durante a colocação da membrana. A importância do coágulo sanguíneo na cura de feridas ósseas foi confirmada indiretamente através dos experimentos de Dupoirieux, Neves e Pourquier (2000), nos quais defeitos em calvária de ratos, cobertos com membrana de PTFE, formaram espaços não preenchidos com coágulo sanguíneo e, assim, não obtiveram preenchimento ósseo, mesmo no grupo em que se interpôs um fragmento de perióstio. Esses autores concordam que a função da membrana é criar espaço para ser preenchido por coágulo sanguíneo e oferecer ambiente favorável às células osteogênicas. No nosso estudo com a MFCO, o coágulo possibilitou a formação de osso excedente, mesmo porque, ao final de três semanas, somente o grupo experimental ainda o apresentava nas proximidades dos defeitos.

Nossos resultados da cobertura do defeito com a MFCO mostraram que a produção óssea foi maior que a encontrada por Crump e colaboradores (1996), pois, nos seus experimentos, apenas um dos espécimes obteve avaliação 4, enquanto que, com a MFCO, apenas um não obteve essa avaliação, resultados inversos aos de Dupoirieux, Neves e Pourquier (2000) em estudo na calvária de ratos. De qualquer modo, deve ser considerado que a calvária oferta pouco líquido medular.

No nosso experimento com a MFCO sobre defeito ósseo, foi identificada, no grupo experimental e no de controle, a formação de osso excedente (osteogênese periosteal), de modo semelhante aos resultados de Ito e colaboradores (1999) com uma membrana de quitosan repousada sob o osso.

Dupoirieux, Neves e Pourquier (2000) sugeriram que o perióstio da tíbia possui o maior

potencial de formar osso; entretanto, parece-nos que a riqueza do volume de líquido medular da tíbia é o fator mais importante, conforme sugerem os experimentos de Gordh e colaboradores (1998) em suas pesquisas com enxerto de tíbia em calvária e de Viljanen, Gao e Lindholm (1997), que usaram fragmento de tíbia no interior do tecido muscular. Viljanen, Gao e Lindholm (1997) identificaram também a proliferação de células condrogênicas, o que também foi observado em nossos experimentos.

A MFCO é colagênica, não degradável, não reabsorvível, não sofre ação da collagenase, diferentemente das demais membranas de colágeno, que podem ser modificadas para alterar a sua resistência e solubilidade.

CONCLUSÕES

Considerando os resultados histológicos da resposta dos tecidos à membrana fibrosa da casca de ovo (MFCO), dentro das condições experimentais, é possível concluir que a MFCO é biocompatível e pode ser usada para as técnicas de regeneração óssea guiada (ROG) e regeneração tecidual guiada (RTG). Considerando a sua não degradabilidade e os princípios que regem a aplicação na ROG, é sugestivo que a membrana pode usada permanentemente nos tecidos, eliminando-se o inconveniente de um segundo ato cirúrgico. Entretanto, novas pesquisas devem ser desenvolvidas no sentido de aprofundar todo o potencial que a MFCO oferece para os propósitos estudados e outros.

Biocompatibility and use of the fibrous membrane of the egg shell in guided bone regeneration

Abstract

The guided bone regeneration technique (GBR) is based on the same principles of the guided tissue regeneration (GTR) and protects an osseous injury from cells deriving out of connective and/or epithelial tissue, by means of a membrane or barrier. The objective of this study had been to research biocompatibility of the "in natura" eggshell fibrous membrane (EFM) sterilized by autoclave to use it as a permanent membrane for the RBG technique. The experiment had thirty Rattus norvegicus albinus in group I and fifteen in group II. The rats from group I had been used to check for biocompatibility, and the ones from group II to evaluate the membrane or barrier. Both groups had subgroups (1, 2, 3 and 4, 5, 6) for experiment and sham, which were evaluated respectively in one, two and three weeks. The results allow us to assert that the EFM is biocompatible according to the infiltrate of plasma cells and lymphocytes absence in the tissues and that it works as a barrier, as evidenced in the osseous production, despite the statistically non significant results between the groups control and sham $p=0,257$, $p=0,317$ and $p=0,317$, respectively for one, two and three weeks, through Wilcoxon's test.

Keywords: *Biocompatibility- Eggshell fibrous membrane -Guided bone regeneration.*

REFERÊNCIAS

APINHASMITH, W. et al. Effects of autoclave sterilization on properties of dental rubber dam as related to its use as barrier membrane in guided tissue membrane regeneration. *J. Periodont. Res.*, Copenhagen, v.38, n.5, p.538-542, Oct. 2003.

BOHNING, B.P.; DAVENPORT, W.D.; JEANSONNE, B.G. The effect of guided tissue regeneration on the healing of osseous defects in rat calvaria. *J. Endod.*, Baltimore, v.25, n.2, p.81-84, Feb. 1999.

CHUNG, C.P et al. Biological effects of drug loaded biodegradable membranes for guided bone regeneration. *J. Periodont. Res.*, Copenhagen, v.32, n.1, pt-2, p.172-175, Jan. 1997.

- CLARK, R.A.F. Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair. **Am. J. Med. Sci.**, Hagerstown, v.306, n.1, p.42-48, 1993.
- CRUMP, T.B. et al. Influence of three membrane types on healing of bone defects. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v.84, n.4, p.365-374, Oct. 1996.
- DAHLIN, C. et al. Restoration of mandibular nonunion bone defects: an experimental study in rat using an osteopromotive membrane method. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Copenhagen, v.23, n.4, p.237-242, Aug. 1994.
- DEUEL, G.F.; KAWAHARA, R.S. Growth factors and wound healing: platelets-derived growth factors as a model cytokine. **Annu. Rev. Med.**, Palo Alto, v.42, p.567-584, 1991.
- DUPOIRIEUX, L. et al. Comparative study of three different membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Copenhagen, v.30, n.1, p.58-62, Feb. 2001.
- DUPOIRIEUX, L. et al. The effect of pentosan polysulphate on bone healing a rat cranial defects. **J. Craniomaxillofac. Surg.**, Edinburgh, v.5, n.27, p.314-320, Oct. 1999.
- DUPOIRIEUX, L.; NEVES, M.; POURQUIER, D. Comparison of pericranium and eggshell as space fillers used in combination with guided bone regeneration: an experimental study. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v.58, n.1, p.40-46, Jan. 2000.
- GORDH, M. et al. Osteopromotive membranes enhance onlay integration and maintenance in the adult rat skull. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Copenhagen, v.27, n.1, p.67-73, Feb. 1998.
- HUNG, W.S. et al. Cytotoxicity and immunogenicity of sacchachitin and its mechanism of action skin wound healing. **J. Biomed. Mater. Res.**, Hoboken, v.56, n.1, p.93-100, 2001.
- HUNT, T.K.; HOPE, H.; HUSSAIN, Z. Physiology of wound healing. **Adv. Skin Wound Care**, Philadelphia, v.13, n.2, p.6-11, 2000. Suppl.
- ITO, M. et al. Effect of hidroxyapatite content on physical properties and connective tissue reactions to a chitosan-hidroxyapatite composite membrane. **J. Biomed. Mater. Res.**, Hoboken, v.45, n.3, p.204-208, June 1999.
- KARRING, T. et al. Development of the biological concept of guided tissue regeneration-animal and human study. **Periodontol.** 2000., Copenhagen, v.1, p.26-35, 1993.
- KIKUCHI, M. et al. Development of guided bone regeneration membrane composed of α tricalcium phosphate and poly (L lactide-co-glycolide-co- α caprolactone) composites. **Biomaterials**, Oxford, v.25, n.28, p.5979-5986, Dec. 2004.
- KOSTOPOULOS, L. et al. Role of chitin beads in the formation of jaw bone by guided tissue regeneration: an experiment in the rats. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v.12, n.4, p.325-331, Aug. 2001.
- LIAO, S. et al. A three-layered nano-carbonated hidroxyapatite/collagen/PLGA composite membrane for guided tissue regeneration. **Biomaterials**, Oxford, v.26, n.36, p.7564-7571, Dec. 2005.
- LINDBLAD, W.J. Collagen expression by novel cell populations in the dermal wound environment. **Wound Repair Regen.**, Malden, v.6, n.3, p.186-193, May 1998.
- LUNDGREN, A.; LUNDGREN, D.; TAYLOR, A. Influence of barrier occlusiveness on guided bone augmentation: an experimental study in rat. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v.9, n.4, p.251-260, Aug. 1998.
- MAEDA, H.; KASUGA, T.; HENCH, L.L. Preparation of poly(L-lactic-acid) polysiloxane-calcium carbonate hybrid membranes for guided bone regeneration. **Biomaterials**, Oxford, v.27, n.8, p.1216-1222, Mar. 2006.
- OBERHOLZER, A.; OBERHOLZER, C.; MOLDAWER, L.L. Cytokine signaling-regulation of immune response in normal and critically ill stage. **Crit. Care Med.**, Philadelphia, v.28, n.4, p.3-12, Apr. 2000. Suppl.

- OHNISHI, H. et al. Histochemical investigation of the bone formation process by guided bone regeneration in rat jaws: effect of PTFE membrane application periods on newly formed bone. **J. Periodontol.**, Chicago, v.71, n.3, p.341-352, Mar. 2000.
- PARK, Y.J. et al. Controlled release of platelet-derived growth factor from poly (L-lactide) membranes for guided tissue regeneration. **J. Control. Release**, Amsterdam, v.51, n.2/3, p.201-211, Feb. 1998.
- ROMPEN, E.H. et al. The influence of cortical perforation and of space filling with peripheral blood on the kinetics of guided bone regeneration: a comparative histometric study in the rat. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v.10, n.2, p.85-94, Apr. 1999.
- ROSENBERG, H.F.; GALLIN, J.I. Inflammation. In: WILLIAM, P. **Fundamental immunology**. 4th.ed. Philadelphia: Lippincott, 1999. p.1051-1066.
- SCHÄFFER, M.; BARBUL, A. Lymphocyte function in wound healing and following injury. **Br. J. Surg.**, Bristol, v.85, n.4, p.444-460, Apr. 1998.
- SCHULTZ, G.S. et al. Wound bed preparation: a systematic approach to wound management. **Wound Repair Regen.**, Malden, v.11, n.1, p.1-28, Mar. 2003.
- STANFORD, J.W. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. **Int. Dent. J.**, London, v.30, n.2, p.141-188, June 1980.
- TAGUCHI, Y. et al. A histological evaluation for guided bone regeneration induced by a collagenous membrane. **Biomaterials**, Oxford, v.26, n.31, p.6158-6166, Nov. 2005.
- TONNESEN, M.G.; FENG, X.; CLARK, R.A. Angiogenesis in wound healing. **J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.**, New York, v.5, n.1, p.40-46, Dec. 2000.
- UEYAMA, Y. et al. Usefulness as guided bone regeneration membrane of the alginate membrane. **Biomaterials**, Oxford, v.23, n.9, p.2027-2033, May 2002.
- VERSCHUEREN, D.S. et al. The effects of guided tissue regeneration (GTR) on modified Le Fort I osteotomy healing in rabbits. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Copenhagen, v.34, n.6, p.650-655, Sept. 2005.
- VILJANEN, V.V.; GAO, T.J.; LINDHOLM, T.S. Producing vascularized bone by ectopic induction and guided regeneration: a silicone membrane - isolated latissimus dorsi island flap in a rat model. **J. Reconstr. Microsurg.**, New York, v.13, n.3, p.207-214, Apr. 1997.
- YI, F. et al. Soluble eggshell membrane protein: preparation, characterization and biocompatibility. **Biomaterials**, Oxford, v.25, n.19, p.4591-4599, Aug. 2004.
- ZHANG, Z. et al. Pore size, tissue ingrowth, and endothelialization of small diameter microporous polyurethane vascular prostheses. **Biomaterials**, Oxford, v.25, n.1, p.177-187, Jan. 2004.

Recebido em / Received: 01/10/2008
Aceito em / Accepted: 28/11/2008